



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Alteraciones de la excitabilidad refleja y del control motor en esclerosis múltiple

Christopher Elliot Cabib

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



TESIS DOCTORAL

DOCTORADO EN MEDICINA

Alteraciones de la excitabilidad refleja y del control motor en esclerosis múltiple

Christopher Elliot Cabib

Dirigida por: Prof. Josep Valls Solé

2016-2017



Alteraciones de la excitabilidad refleja y del control motor en esclerosis múltiple

Tesi presentada per:

Christopher Elliot Cabib

Per obtenir el títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Dirigida per:

Prof. Josep Valls i Solé

Programa de doctorat Medicina,

Universitat de Barcelona

(2016-2017)



Creo, sin lugar a dudas, que ésta ha sido la parte más difícil de escribir de toda la tesis... Después de más de 200 bibliografías numeradas (ya sabéis de mi dificultad para recordar nombres y números!) y dejarla para el final, no ha sido la mejor idea... Intentaré no dejar de mencionar a todos los que me han acompañado en estos años de una u otra manera con su apoyo. Esta tesis, además de un documento científico, representa lo que ha sido de mí en estos años. Ha sido hecha con la espontaneidad y simple cotidianeidad del vivir en un nuevo y hermoso lugar, como lo es Barcelona. Así de simple. Creo que es similar a como muchas cosas suceden en la vida, al menos para mí... Y aunque no lo creamos, cuando ya está hecho y hemos llegado al final del camino (tesis), pues hecho está. Y ésta no ha sido la excepción.

Primero, quisiera agradecer a tantas personas que han participado con su entusiasmo y colaboración en el laboratorio de EMG y que son parte de algún “gran” rincón de esta tesis... Merche, Jordi C., Lucy, Marta F., Federica, Roberta, Pedro P., Ana Tercero, Alejandro, Mauricio, Ana Mirallave, Joao’s (L. y C.), Juan C., Nuria, Antonia, Consol, y Pablo A., y a todos los residentes de Neurología con quienes durante este período he tenido el agrado de compartir. Todos habéis participado de esta pequeña “familia” aportando con la mayor de las virtudes del conocimiento: la curiosidad. Imposible e innecesario mencionar todos aquellos momentos inolvidables en que el Dr. Valls nos ha “alimentado” de ella. A mis amigos y “colegas” en las ciencias, Marc, Azahara, Sebastián, Ana M., Merche, Pedro, Angel, Roberta, con quienes he compartido de las alegrías (y los sinsabores) del largo proceso que en momentos parece ser realizar una tesis, pero que al fin y al cabo, no es muy distinto a lo que vivimos en el día a día.

A mis mentores profesionales. A Patricio Mellado y Ricardo Fadic que despertaron mi interés profundo en la neurología clínica y en el pensamiento científico que tan “escondido” estaba en mi corteza cerebral. A Alessandro Lozza y Josep Valls-Solé, por su dedicación y paciencia infinitas para formarme en la investigación y neurofisiología clínica, un mundo poco explorado por muchos, pero que personalmente aprecio y me apasiona. No tengo palabras para agradecer vuestra guía (y amistad) en todo momento y del todo desinteresada. Quisiera agradecer en especial al equipo de Neuroinmunología, Sara Llufrí, Eloy Martínez y Albert Saiz, por la disponibilidad y confianza que depositaron en mí desde el primer minuto, y el soporte constante para poder finalizar exitosamente esta tesis. Sin ellos y la solidaria participación de sus pacientes, nada de esto sería posible.

A mi familia, que desde lejos siempre han apoyado cuanto me he propuesto por más descabellado que pueda parecer, a mi padre Roberto y mi madre María Eugenia, a mis hermanas Jocelyn y Candice, a Sergio, y a mis sobrinos David y Alessandra. Estas “locuras” siempre han nacido de (con) ustedes (jaja!). A mis amigos, que siempre me han acompañado con sus pensamientos y reflexiones...Mayra, Alexis, Carmen, Igor, Fabián, Marcelo, Miguel, Neira, Paulina, Omar, Lluís, y muchos más. A mi familia ‘europea’ (interesantemente formada por muchos de los ya mencionados), que me enseñaron lo importante de la dedicación y el cómo y el porqué de las cosas: Alessandro, Saskia, Guglielmo, Josep, Ruth, Merche, Mauricio, Giuseppe, Lucky, Alessandra M. Y a mi familia ‘catalana’, los Izquierdo-Robert: Oriol, Carles, Vicenç, Lluís, Maria Cinta y Marta’s (M. y R.), y en especial a mis queridos Laura y Nevi, gracias a vuestro cariño y paciencia incondicional hemos llegado hasta aquí. A todos, gracias totales.

ÍNDICE

I.	Listado de Abreviaturas	9
II.	Introducción	13
	1. Aspectos generales de la Esclerosis Múltiple (EM)	15
	2. Aspectos clínicos y neuroanatómicos de la EM	16
	3. Evaluación neurofisiológica de la EM	19
	3.1 Circuitos reflejos	19
	3.1.1 Reflejos tronco-encefálicos	19
	3.1.2 Reflejos espinales y de larga latencia	25
	3.2 Vías sensoriales y potenciales evocados (PEs)	29
	3.2.1 PE visuales (PEV)	29
	3.2.2 PE auditivos de tronco-encéfalo (PEAT)	30
	3.2.3 PE somato-sensoriales (PESS)	31
	3.3 Vía motora y estimulación magnética transcraneana (EMT)	32
	3.3.1 PE motores (PEM)	32
	3.3.2 Otras técnicas con EMT	33
	3.4 Integración sensitivo-motora y vías comisurales	35
	3.4.1 Paradigma de tiempo de reacción “cruzado”	36
	3.4.2 Reacción de sobresalto y circuitos subcorticales	38
	3.4.3 Inhibición transcallosa y control motor	39
III.	Hipótesis	43
IV.	Objetivos	45
V.	Métodos	47
	1. Generalidades	49
	2. Especificaciones técnicas de los estudios neurofisiológicos	50
	2.1 Excitabilidad de los reflejos tronco-encefálicos (R2c/R2, BRER, BRIP)	50
	2.2 Conducción central de las vías motora, comisural Inter-hemisférica y somato-sensorial (PEM, iSP, PESS)	51

2.3 Preparación motora y excitabilidad subcortical (paradigma de tiempo de reacción “cruzado”, sobresalto auditivo y efecto <i>StartReact</i>)	53
VI. Resultados	55
1. Abnormal Control of Orbicularis Oculi Reflex Excitability in Multiple Sclerosis. PLoS one. 2014 Aug 1;9(8):e103897. doi: 10.1371	57
2. Defective sensorimotor integration in preparation for reaction time tasks in patients with multiple sclerosis. J Neurophysiol. 2015 Mar 1;113(5)1462-9. doi: 10.1152	71
3. Enhanced mirror activity in ‘crossed’ reaction time tasks in multiple sclerosis. Clin Neurophysiol. 2016 Apr;127(4):2001-9 doi: 10.1016	83
VII. Síntesis de resultados y discusión	97
1. Trabajo 1	99
2. Trabajo 2	102
3. Trabajo 3	106
VIII. Conclusiones	111
IX. Bibliografía	115

I. Listado de Abreviaturas

EM	Esclerosis Múltiple
SNC	Sistema Nervioso Central
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
DTI	Difusion Tensor Imaging
PEs	Potenciales Evocados
OOc	Orbicularis Oculi
SBR	Somato-Sensory Blink Reflex
ms	milisegundos
BRER	Blink Reflex Excitability Recovery
BRIP	Blink Reflex Inhibition by Prepulse
MIR	Masseter Inhibitory Reflex
SP1/2	Silent Period 1 or 2
LLR	Long-Latency Reflex
EMRR	Esclerosis Múltiple Recurrente Remitente
EMPP	Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva
PEV	Potenciales Evocados Visuales
PEAT	Potenciales Evocados Auditivos de Tronco del Encéfalo
PESS	Potenciales Evocados Somato-Sensoriales
PEM	Potenciales Evocados Motores
CMAp	Compound Muscle Action Potential
FDI	First Dorsal Interosseous
EMT	Estimulación Magnética Transcraneal
iSP	Ipsilateral (Cortical) Silent Period
cSP	Contralateral (Cortical) Silent Period
SICI	Short Interval Cortical Inhibition
ICF	Intra-Cortical Facilitation
TST	Triple Stimulation Technique
EAS	Estímulo Auditivo de Sobresalto
mEMG	Mirror Electromyographic Activity
EDSS	Expanded Disability Status Scale
FA	Fractional Anisotropy
MD	Mean Diffusivity
AD	Axial Diffusivity
RD	Radial Diffusivity
SCM	Sternocleidomastoid

II. Introducción

1. Aspectos generales de la Esclerosis Múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es la más conocida de las enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central (SNC), de evolución crónica. Está mediada por un trastorno inmune sistémico, en el cual el órgano diana es mayormente la sustancia blanca del SNC. En sus etapas iniciales se manifiesta como un estado inflamatorio predominante que da como resultado desmielinización, por afectación de los oligodendrocitos, ocasionando secundariamente gliosis y daño axonal. En la fisiopatología de la EM intervienen varios procesos independientes, incluyendo inflamación, desmielinización, neurodegeneración, remielinización y reparación axonal. Parece ser que el daño axonal es el responsable de la discapacidad persistente en los pacientes (Tallantyre y cols., 2010). Su causa es desconocida, aunque probablemente multifactorial, afectando sujetos susceptibles expuestos posiblemente a algún agente ambiental. Es así como se han identificado factores genéticos (por ejemplo portadores de subtipos de HLA) y ambientales (relacionado a infección por virus de Epstein-Barr y déficit de vitamina D, entre otros) que favorecen la desregularización del sistema inmune (Martin y cols., 2001), en la cual el proceso etiopatogénico estaría mediado, inicialmente, por la actividad de las células T (Sawcer y cols., 2011).

La EM afecta aproximadamente a 2,5 millones de personas entre los 17 y 65 años alrededor del mundo y es la primera causa de invalidez no traumática en adultos jóvenes en Europa y Norte de América (Compston y Coles, 2002). Su frecuencia de presentación es variable según la zona geográfica, siendo mayor en climas fríos y regiones alejadas de los trópicos. La incidencia anual se estima entre 3,5 – 7 casos por 100.000 habitantes por año. La prevalencia es mayor en Europa y Norte de América, con valores que fluctúan entre los 250 / 100000 habitantes en Escocia, 32 – 65 / 100000 habitantes en España, y 20 – 100 / 100000 habitantes en USA, mientras en Japón es de 2 / 100000 habitantes. En la forma recurrente-remitente (EMRR), que corresponde al 80% del total, existe una afectación predominante del sexo femenino (2:1 en relación al sexo masculino), iniciándose la enfermedad en dos tercios de los casos en edad laboral entre la 2ª y 4ª décadas de vida (Sospedra y Martin, 2005), presentándose en el 7% antes de los 20 años y en un 12% después de los 50 años, lo que conlleva un alto impacto socio-económico en la población. En la variante primaria progresiva (EMPP), que corresponde al restante 20% del total, existe similar afectación por sexos.

Se estima que el 50% de los sujetos afectados necesitarán algún tipo de asistencia para caminar a los 15 años desde el debut de la enfermedad (Weinshenker y cols., 1989). La discapacidad no sólo proviene de la desmielinización en sustancia blanca, sino también del daño axonal y neuronal, y la consiguiente reestructuración en las conexiones (Trapp y cols.,

1998). Como un factor añadido a tal disfuncionalidad, un porcentaje significativo de los pacientes manifiestan fatiga muscular, posiblemente de causa multifactorial, la cual participa activamente en la discapacidad que muestran estos pacientes.

2. Aspectos clínicos y neuroanatómicos de la Esclerosis Múltiple

Desde el punto de vista exclusivamente neuroanatómico, la característica más relevante de la EM es la distribución multifocal de lesiones inflamatorias que producen desmielinización en el SNC, fácilmente reconocible con técnicas de neuroimagen convencional, como la resonancia magnética nuclear (RMN). Al daño inflamatorio desmielinizante focal inicial se añade, secundariamente y de forma progresiva, un grado variable de daño axonal, de difícil cuantificación con estudios de RMN convencional, donde sólo se puede tener una evaluación indirecta a través de la atrofia cerebral, pero reconocible con técnicas de investigación más avanzadas que incluyen el estudio ultraestructural de la sustancia gris cortical y de la sustancia blanca de aspectos aparentemente normal (Kidd y cols., 1999; Rovaris y cols., 2000; Chard y cols., 2002a). En términos generales, la distribución anatómica de las lesiones ocurre de manera aleatoria pudiendo afectar

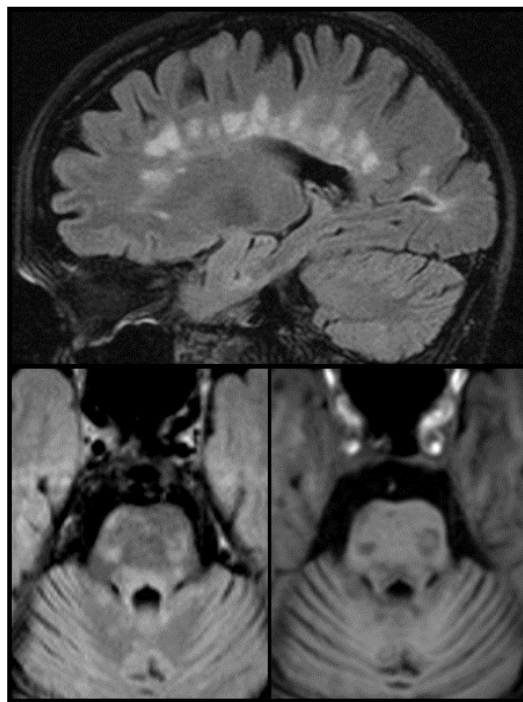


FIGURA 1. Anormalidades típicamente encontradas en el estudio de RMN convencional en un paciente con EMRR. Afectación multifocal del cuerpo calloso en patrón de “dedos de Dawson” (arriba, FLAIR) y de la protuberancia del tronco del encéfalo (abajo, FLAIR y T1).

teóricamente cualquiera de las vías centrales de conducción de información motora (vías cortico-espinal y retículo-espinal) o sensitiva (vías de cordones posteriores-lemnisco medial y espino-talámica) y de asociación (fibras comisurales y de conducción inter-hemisférica) y vías reflejas (circuitos trigémino-faciales y espinales segmentarios). En EM, el daño inflamatorio afecta con especial predilección las áreas periventricular y yuxtacortical, además del cuerpo calloso, a nivel supratentorial, mientras que el tronco del encéfalo es la estructura más

frecuentemente afectada a nivel infratentorial (Dietemann y cols., 1988; De Stefano y cols., 2001; Pelletier y cols., 2001; Chard y cols., 2002b).

La afectación que ocurre en más de un territorio del SNC en el contexto de una EM se conoce como dispersión “espacial”, y corresponde a una de las dos características relevantes para el diagnóstico de EM según los criterios actuales de McDonald (Polman y cols., 2011). Utilizando secuencias específicas de adquisición de la imagen cerebral por RMN, se pueden distinguir las lesiones con características “inflamatorias” en el momento de la exploración (presentes en secuencias ponderadas T2 y captantes de contraste paramagnético en secuencias T1) de aquellas que representan el daño secuelar de una lesión inflamatoria pre-existente (por ejemplo, tipo “*black hole*”, que no captan contraste en secuencias ponderadas T1 con gadolinio). De este modo, se han descritos típicos patrones de afectación por RMN convencional en pacientes con EM (**Figura 1**). A nivel supratentorial destaca el clásico patrón de afectación periventricular del cuerpo calloso en “dedos de Dawson” por RMN. Por otro lado, a nivel infratentorial, la RMN muestra una sensibilidad elevada en la detección de lesiones focales desmielinizantes. Sin embargo, un estudio de RMN convencional negativo no descarta la afectación de tractos nerviosos a nivel ultraestructural, solamente reconocible con técnicas de RMN que utilizan tensor de difusión (DTI, del inglés *diffusion tensor imaging*; Pierpaoli y cols., 1996; Evangelou y cols., 2000; Lenzi y cols., 2007).

Desde el punto de vista clínico, la aparición de un episodio de déficit neurológico como consecuencia de una o más lesiones inflamatorias desmielinizantes se conoce como episodio clínico o “brote”. El espectro de manifestaciones clínicas al momento de presentación incluye mayormente alteraciones de la sensibilidad (30-40%), neuritis óptica (20-30%) y alteraciones de la marcha (20%). La segunda característica relevante para el diagnóstico de EM es la recurrencia de brotes en el tiempo, que es conocida como dispersión “temporal” de lesiones. Tomando en consideración los aspectos neuroanatómicos previamente descritos, el espectro de manifestaciones clínicas en EM es muy amplio y altamente variable de individuo a individuo, siendo dependiente del patrón individual de distribución “en tiempo y espacio” de lesiones, además del daño axonal persistente sobre-agregado. Dentro de este gran rango de posibles manifestaciones que incluye síntomas y signos clínicos, en pacientes con EM es habitual observar fenómenos clínicos “positivos” de exceso de actividad y/o falta de control motor, como la espasticidad, las mioclonias, la hiperreflexia, el clonus, el dolor, las mioquimias, los espasmos o el fenómeno de L’Hermitte (Rasminsky, 1981; Waxman, 2001; Caramia y cols., 2004), y fenómenos “negativos” de falta o reducción de función, como la fatiga muscular, la lentitud motora, la falta de concentración, el deterioro cognitivo, y los déficits focales motores o sensoriales fácilmente reconocibles en la exploración neurológica. Por un lado, los

fenómenos de hiperactividad o hiperexcitabilidad han sido comúnmente atribuidos al daño focal localizado a nivel motoneuronal o axonal (Gutmann y cols., 1993). Sin embargo, algunos autores plantean que lesiones localizadas en sitio estratégico pueden alterar los mecanismos descendentes de control inhibitorio y generar, por ejemplo, fenómenos de hiperactividad distal tal como se ha descrito en el caso de la mioquimia facial (Emre Öge y cols., 1996; Sedano y cols., 2000). Esto ha sido observado en pacientes con EM que han sido estudiados con RMN

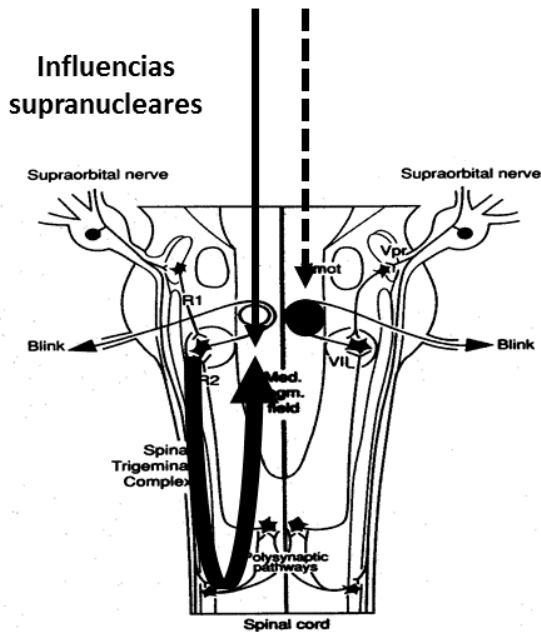


FIGURA 2. Esquema anatómico del circuito tronco-encefálico del reflejo de parpadeo. Se representan las posibles influencias descendentes supranucleares de naturaleza inhibitoria (flecha continua) y excitatoria (flecha discontinua) sobre la motoneurona facial (círculo negro) y la cadena de interneuronas (flecha curva) del reflejo trigémino-facial, respectivamente. Adaptado de: Cruccu y cols., 1991.

convencional sin observarse lesiones a nivel bulbo-protuberancial, sede de los circuitos reflejos involucrados habitualmente en la generación de la mioquimia. Por otro lado, la falta de control motor puede paradójicamente generar fenómenos “positivos” en pacientes con EM, tales como el temblor de intención y la disimetría, que se ha atribuido a una disfunción en la integración sensitivo-visual y en mecanismos compensatorios motores inadecuados (Heenan y cols., 2014). Otro ejemplo de falta de control motor que no ha sido descrito como fenómeno clínico en pacientes con EM, son los movimientos en “espejo”. Clásicamente, la lentitud en la

realización de tareas visuales y motoras en pacientes con EM ha sido atribuido al daño cognitivo y a los trastornos asociados de atención y concentración que ello conlleva (Kail y cols., 1998; De Sonnevile y cols., 2002; Stoquart-ElSankari y cols., 2010). Sin embargo, es posible observar lentitud motora en pacientes con EM en etapas iniciales de la enfermedad, cuando no hay disfunción significativa de la cognición o de la vía piramidal. En estos casos, es plausible plantear que la afectación específica de circuitos de integración sensitivo-motora pudiera explicar dicha lentitud motora.

3. Evaluación neurofisiológica de la Esclerosis Múltiple

Si bien gran parte de los aspectos relevantes para el diagnóstico y manejo clínico de los pacientes con EM pueden evidenciarse con técnicas de neuroimagen convencional, existen varios aspectos fisiopatológicos de la EM que pueden ser revelados mayormente o exclusivamente con el uso de técnicas neurofisiológicas (Leocani y cols., 2001; Thickbroom y cols., 2008; Conte y cols., 2009; Margaritella y cols., 2012). Como ya hemos mencionado con anterioridad, la afectación lesional que ocurre de manera aleatoria en pacientes con EM puede afectar teóricamente cualquiera de los tractos a nivel del SNC, sea de vías “sensoriales” (en sus distintas modalidades) como de vías “motoras” de conducción neural.

Clásicamente, el registro de “potenciales evocados” (PEs) de todas las modalidades, incluyendo los motores, es la técnica por excelencia del estudio de la EM ya que permiten cuantificar la conducción de vías del SNC. Los PEs permiten revelar la afectación específica de una vía de conducción, de utilidad significativa tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de los pacientes con EM. El estudio de los “reflejos tronco-encefálicos” es otra herramienta que se utiliza habitualmente como parte del estudio diagnóstico general o dirigido en pacientes con sintomatología craneal. Adicionalmente, los paradigmas de tiempo de reacción son una técnica experimental alternativa que permite evaluar el grado de excitabilidad e indemnidad de vías de conducción motora y en grado variable de vías sensoriales y de integración sensitivo-motora dependiendo específicamente del tipo de paradigma utilizado. A continuación se expone el marco teórico de éstas y otras técnicas neurofisiológicas que han sido utilizadas en el desarrollo de la presente tesis.

3.1 Circuitos reflejos

3.1.1 Reflejos tronco-encefálicos

Reflejo de parpadeo. Los circuitos reflejos del tronco del encéfalo han sido foco de estudio en pacientes con EM. Como se ha mencionado con anterioridad, la afectación infratentorial por lesiones desmielinizantes es una característica de esta enfermedad. Tal hecho predispone a los pacientes con EM a presentar con frecuencia síntomas y signos en territorio craneal, manifestado a nivel sensitivo como, por ejemplo, disestesias en territorio trigeminal o a nivel motor como, por ejemplo, actividad muscular facial involuntaria del tipo de las mioquimias (Silva y Pearce, 1972; Jacobs y cols., 1994; Gutmann y Gutmann, 2004). Ambos fenómenos se asocian, habitualmente, a lesión focal en alguna parte de la vía aferente (nervio trigémino), de la vía eferente (nervio facial) o de la cadena de interneuronas que forman parte del circuito trigémino-facial, como consecuencia de una brote. El circuito trigémino-facial, localizado a

nivel ponto-bulbar (**Figura 2**), contribuye, por lo tanto al control de la actividad muscular facial en respuesta a impulsos sensoriales cutáneos de la cara y cráneo. Sin embargo, ésta no es la única influencia que modifica la excitabilidad del circuito reflejo trigémino-facial. Adicionalmente, la excitabilidad de este circuito está regulada por influencias excitatorias / inhibitorias descendentes (supranucleares), provenientes de los ganglios basales y corteza cerebral de ambos hemisferios (**Fig.2**), como es sugerido por estudios realizados en pacientes con lesión vascular isquémica focal a nivel hemisférico o en pacientes con enfermedad de Parkinson que muestran alteraciones específicas trigémino-faciales (Berardelli y cols., 1983a; Girlanda y cols., 1984; Basso y cols., 1996).

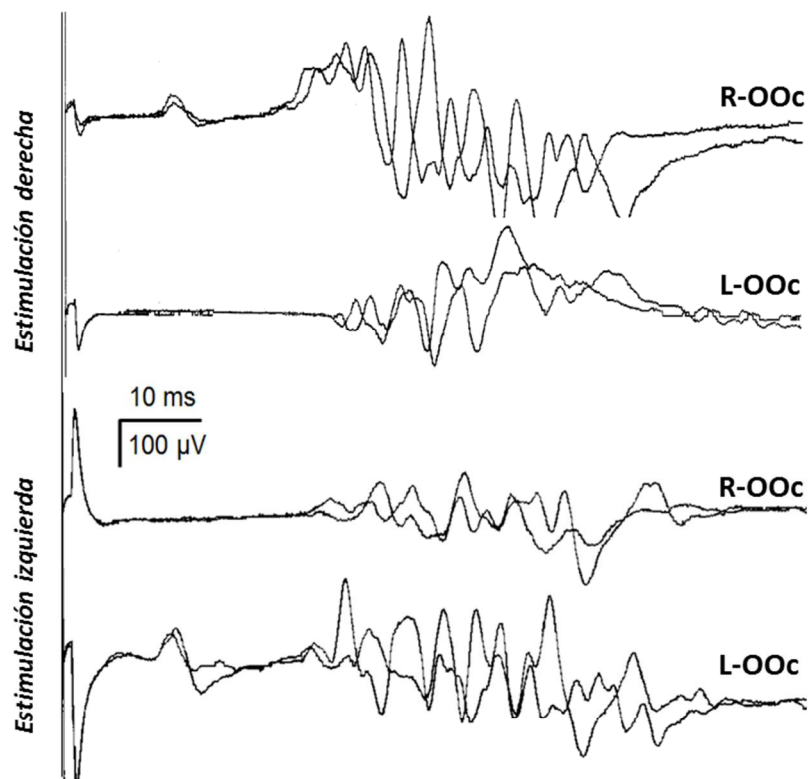


FIGURA 3. Reflejo de parpadeo por estimulación del nervio trigémino en la escotadura supraorbitaria bilateralmente, con registro de superficie desde el músculo OOc bilateralmente (R=derecho, L=izquierdo). Se obtienen respuestas tanto ipsilaterales (R1) como bilaterales (R2) a la estimulación unilateral. En condiciones normales, la respuesta R2 ipsilateral es siempre más grande que la respuesta R2 contralateral.

Desde el punto de vista neurofisiológico, el circuito reflejo trigémino-facial se estudia a través del reflejo del parpadeo (*blink reflex*; **Figura 3**). La respuesta bilateral de la musculatura palpebral (*orbicularis oculi*, OOc) se obtiene por estimulación eléctrica unilateral a nivel de las terminaciones nerviosas de cualquiera de las 3 ramas del nervio trigeminal (oftálmica, maxilar

o mandibular). En el registro electromiográfico de superficie de OOc se obtendrá una respuesta precoz, a latencia de 8 – 13 milisegundos (ms) después de la aplicación del estímulo en nervio supraorbitario, en el mismo lado que se realizó la estimulación (respuesta R1 ipsilateral), y respuestas consensuales tardías (a latencia de 30 – 40 ms) en ambos lados (R2 ipsilateral y contralateral). La respuesta R1 representa la conducción por las vías aferente y eferente con integración de impulsos a nivel de la protuberancia a través de una vía mono- o bi-sináptica no decusada. Las respuestas R2 utilizan las mismas vías aferente y eferente, pero usan una vía polisináptica, transitando por una cadena de interneuronas ubicadas en ambos

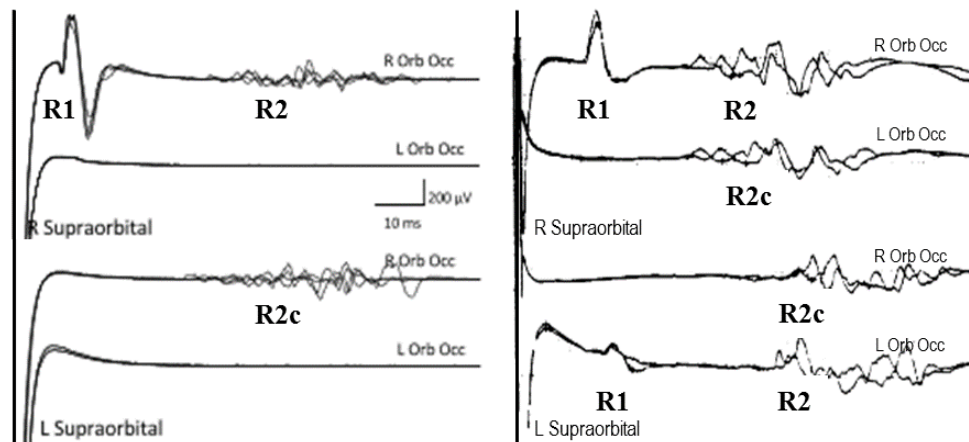


FIGURA 4. Patrones de anomalía que pueden ser encontrados en el estudio del reflejo de parpadeo (registro en orbicularis oculi-Orb Occ, R=derecho, L=izquierdo) por estimulación trigeminal del nervio supraorbitario bilateralmente (R=derecho; L=izquierdo). Izquierda: Se representa un patrón eferente con ausencia de respuestas obtenidas en Orb Occ izquierdo por estimulación de ambos lados; Derecha: Se representa un patrón aferente con retraso de respuestas obtenidas por estimulación únicamente del lado izquierdo.

lados del tronco del encéfalo, a nivel bulbar y protuberancial (vías decusada y no decusada). En resumen, el circuito del reflejo de parpadeo está representado bilateralmente a nivel tronco-encefálico, de modo que su activación permite obtener respuestas tanto en el mismo lado del rostro donde se ha aplicado el estímulo (respuestas R1) por activación de un circuito unilateral, como bilateralmente después de estimulación unilateral (respuestas R2) por activación de un circuito que es también cruzado.

El estudio del reflejo de parpadeo permite de este modo conocer el funcionamiento de las vías de conducción de un circuito exclusivamente tronco-encefálico, con participación de estructuras en protuberancia y bulbo raquídeo a ambos lados de la línea media. En presencia de una lesión focal en algún punto del circuito reflejo, obtendremos respuestas retrasadas en latencia, de amplitud reducida o abolidas en su totalidad dependiendo de la magnitud de la

lesión y del grado de interrupción en la conducción de impulsos. Además, es posible distinguir varios patrones de afectación que permiten deducir la localización aproximada de una lesión focal (**Figura 4**): el patrón aferente se observará como un retraso de todas las respuestas (R1, y R2 ipsi- y contra-lateral) ante estímulo unilateral, el patrón eferente se mostrará como un retraso de las respuestas en un lado por estímulo tanto del mismo lado como del lado contralateral, mientras que el patrón mixto corresponde a una mezcla de ambos patrones. En EM es común observar un retraso en las latencias de las respuestas del reflejo de parpadeo como consecuencia de una lesión focal localizada en alguna parte del circuito trigémino-facial (Namerrow y Etemadi, 1970; Kimura, 1970, 1975b; Khosbin y Hallett, 1981; Sanders y cols., 1985; Nazliel y cols., 2002; Klissurski y cols., 2009; Degirmenci y cols., 2013).

Adicionalmente, es posible obtener un reflejo de parpadeo por estimulación aplicada en un territorio cutáneo fuera del área trigeminal o por activación de otro campo receptivo. La estimulación eléctrica de un nervio periférico (como por ejemplo el nervio mediano en la muñeca; León y cols., 2011), o la aplicación de un estímulo acústico de baja o alta intensidad como parte de una reacción de sobresalto más generalizada (Blumenthal y Goode, 1991; Brown y cols., 1991), también generan respuestas de parpadeo (**Figura 5**). Se ha descrito un circuito reflejo para la respuesta evocada por estimulación de nervio periférico (llamado SBR, del inglés *somato-sensory blink reflex*), que involucra estructuras mesencefálicas (Miwa y cols., 1996; Leon y cols., 2011), no habiendo sido estudiado en pacientes con EM. Estas técnicas complementarias permiten evaluar de una manera alternativa la respuesta refleja por estimulación de vías aferentes diferentes a la trigeminal, siendo la magnitud de las respuestas obtenidas en OOc una medida proporcional aunque indirecta del número de axones excitables ante un estímulo sensorial.

Es interesante señalar que, a pesar de que las respuestas del reflejo del parpadeo son consensuales, es decir que aparecen en ambos lados a la estimulación unilateral, la respuesta ipsilateral al estímulo es habitualmente más compleja y de mayor amplitud que la del lado contralateral. La respuesta R2 es consecuencia de la llegada a las motoneuronas faciales de impulsos que siguen un circuito bulbo-protuberancial a través de una cadena de interneuronas, la última de las cuales debe necesariamente ser excitatoria para las motoneuronas faciales. En el lado ipsilateral al estímulo, las motoneuronas faciales habrán sido recientemente activadas por impulsos que alcanzaron el núcleo facial a través de un circuito más rápido, oligosináptico, exclusivamente protuberancial. Por ello, después del paso de impulsos excitatorios, algunas de las motoneuronas faciales pueden haber quedado sensitizadas y susceptibles de descargar de nuevo a la llegada de nuevos impulsos excitatorios con mayor facilidad que en el lado contralateral, donde no ha habido impulsos excitatorios

previos. Esta sería una de las razones por las que la respuesta R2 ipsilateral es habitualmente de mayor tamaño que la R2 contralateral (Kimura y cols., 1975; Dengler y cols., 1982; Valls-Solé y Tolosa, 1989; **Fig.3**). Este hecho permite establecer el cociente R2c/R2 como una medida de la relación de excitabilidad refleja entre lados del tronco cerebral. El cociente R2c/R2 es menor de 1 en individuos sanos (Manca y cols., 2001) y puede ser de utilidad para la evaluación del control supranuclear de la excitabilidad del circuito del parpadeo reflejo.

El nivel de excitabilidad de los circuitos trigémino-faciales puede ser evaluado mediante el examen de las consecuencias que tiene un estímulo condicionante en la respuesta a un estímulo subsiguiente.

Esta técnica, utilizada inicialmente por Kimura (1973) para el estudio de la excitabilidad del reflejo del parpadeo, se conoce como “estimulación pareada”. Se utilizan pulsos eléctricos separados por intervalos conocidos de tiempo y se relaciona la magnitud de la respuesta R2 (amplitud o área) generada por el segundo estímulo (*test*) en comparación con la respuesta obtenida por el primer estímulo (condicionante).

Representando el tamaño de

la respuesta R2 *test* como porcentaje del tamaño medio de la respuesta al estímulo condicionante se puede estimar el grado de recuperación de la excitabilidad en función del tiempo de intervalo entre estímulos, mediante lo que se denomina curva de recuperación de la excitabilidad del reflejo del parpadeo (BRER *curve*, del inglés *blink reflex excitability recovery*). Una curva BRER anormalmente desviada a la izquierda (recuperación precoz de la excitabilidad) sugiere hiperexcitabilidad en las interneuronas del circuito reflejo trigémino-facial, tal como ha sido puesto de manifiesto en diversas enfermedades neurológicas, como en la enfermedad de Parkinson o distonía, en las que se supone que la afectación de estructuras supratentoriales (ganglios basales, corteza cerebral) comporta cambios de excitabilidad en el

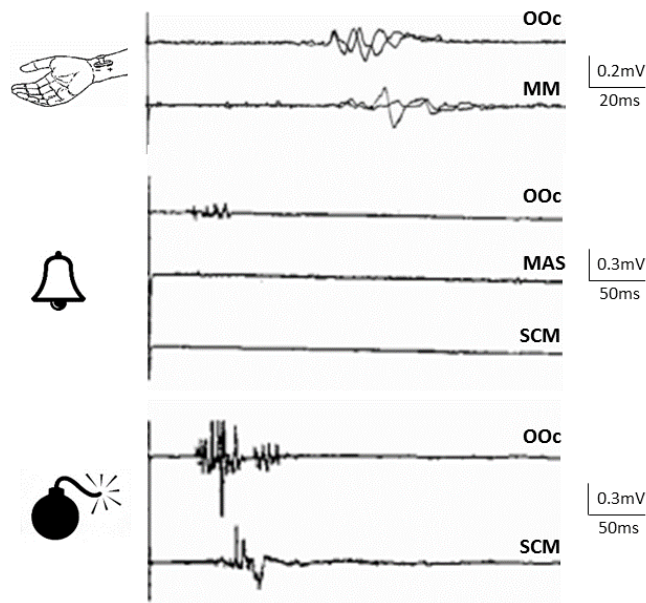


FIGURA 5. Respuestas evocadas en OOc por estímulos somato-sensorial (pulso eléctrico en muñeca) y auditivo de baja (representado por una campana) y alta intensidad o “sobresalto” (bomba). Co-registro en músculos mentalis (MM), maseterino (MAS) y esternocleido mastoideo (SCM). Adaptado de: Valls-Solé y cols., 1999, y León y cols., 2011.

circuito reflejo trigémino-facial (Kimura, 1973; Berardelli y cols., 1985, 1988; Iriarte y cols., 1988; Tolosa y cols., 1988; Cohen y cols., 1989; Pauletti y cols., 1993; Basso y cols., 1996; Basso y Evinger, 1996; Eekhof y cols., 1996). Es a destacar que la excitabilidad interneuronal está anormalmente disminuida en la enfermedad de Huntington (Esteban y Giménez-Roldán, 1975; Agostino y cols., 1987), correlacionando con la disfunción dopaminérgica nigro-estriatal opuesta a la de la enfermedad de Parkinson.

La inhibición por prepulso es otra técnica neurofisiológica que permite estudiar la excitabilidad de los circuitos tronco-encefálicos (Ison y cols., 1990; Rossi y Scarpini, 1992). Se conoce como prepulso al estímulo condicionante de intensidad subumbral para la generación de una respuesta. Cuando dicho estímulo se aplica unos ms antes de otro estímulo de la misma o distinta modalidad del que se esperaría obtener una respuesta refleja como por ejemplo un parpadeo, se observa inhibición de dicha respuesta (inhibición por prepulso del reflejo de parpadeo o BRIP, del inglés *blink reflex inhibition prepulse*). Estudios realizados en animales y humanos sugieren que el núcleo pedúnculo-pontino participaría activamente en el fenómeno BRIP (Koch y cols., 1993; Inglis y Winn, 1995; Reese y cols., 1995). En personas sanas, el BRIP es multimodal, es decir que tiene lugar por varias modalidades sensoriales pero los más usados son los prepulsos somatosensorial o acústico (Ison y cols., 1990; Valls-Solé y cols., 1999). El BRIP se ha hallado anormal en algunas enfermedades degenerativas como la enfermedad de Huntington, en algunos pacientes con enfermedad de Parkinson y en trastornos que comportan déficit atencional, como la esquizofrenia y otros trastornos psiquiátricos (Nakashima y cols., 1993; Gómez-Wong y cols., 1998; Schicatano y cols., 2000; Valls-Solé y cols., 2004; Scholes y Martin-Iverson, 2010; Kohl y cols., 2013). La anormalidad del BRIP indica una falta de control inhibitorio sobre los impulsos sensoriales a nivel de los circuitos reflejos tronco-encefálicos.

Considerando la alta frecuencia de afectación del tronco del encéfalo y las manifestaciones de hiperactividad facial en pacientes con EM, es plausible pensar que el estudio de la excitabilidad del reflejo de parpadeo pudiera revelar alteraciones a nivel subclínico. Además, es posible plantear que la afectación supratentorial de estructuras involucradas en el control del reflejo trigémino-facial como consecuencia de lesiones cerebrales en EM pueda conducir a alteraciones en la excitabilidad tronco-encefálica.

Otros reflejos tronco-encefálicos. Con técnicas neurofisiológicas se puede también investigar el funcionamiento de circuitos tronco-encefálicos diferentes al trigémino-facial. El reflejo inhibitorio maseterino (MIR, del inglés *masseter inhibitory reflex*) representa el cese de la actividad electromiográfica de superficie del músculo masetero (ocasionado por contracción

mandibular voluntaria), que consta de dos fases (SP1 y SP2, de *silent period*), y que es generado por estimulación eléctrica del nervio mentoniano (rama distal del nervio mandibular o III rama del nervio trigémino). Se obtienen respuestas consensuales (o bilaterales) para ambos componentes SP1 y SP2 por estimulación eléctrica en los dos lados del mentón, correspondientes a la activación de circuitos específicos a ambos lados del tronco-encéfalo, y que involucran la participación de fibras sensitivas y motoras que discurren a través del nervio trigémino y circuitos polisinápticos de distribución bulbo-protuberancial (Ongerboer de Visser y Goor, 1976; Cruccu y cols., 2005). Por ejemplo, en un estudio de correlación con neuroimagen realizado en pacientes con EM “definida” en etapa estable (Bettoni y cols., 1998), la alteración del MIR (especialmente del SP1) mostró una sensibilidad similar al reflejo de parpadeo para detectar lesiones tronco-encefálicas por RMN y una alta correlación con las alteraciones de los potenciales evocados auditivos de tronco-encéfalo (PEAT, ver en detalle más adelante). Sin embargo, en otro estudio de correlación por RMN de reciente publicación realizado en pacientes con EM durante un “brote” de hipoestesia facial (Koutsis y col., 2016), el MIR fue la prueba menos sensible (50%) en detectar lesiones tronco-encefálicas detrás de los potenciales evocados sensitivos de nervio trigémino y del reflejo de parpadeo que mostraron la mayor sensibilidad (100% y 66%, respectivamente). En pacientes con EM también se ha investigado la sensibilidad diagnóstica de la combinación de pruebas neurofisiológicas en la detección de la disfunción de vías y circuitos reflejos del tronco del encéfalo diferentes al trigémino-facial. Existen reportes esporádicos que muestran que realizando una “batería” de estos estudios se puede igualar y en ocasiones superar la sensibilidad de pruebas que son consideradas “estándar” (potenciales evocados y/o estudios de imagen) en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con EM. Esto se ha observado en estudios que han utilizado los llamados “potenciales evocados miogénicos vestibulares” (Gabelic y cols., 2013; Habek, 2013), que involucran la participación de la vía vestíbulo-espinal y representan un reflejo mediado por activación de los nervios craneanos VIII y XI, como también en aquellos que han utilizado técnicas de más reciente aplicación, entre ellos el “reflejo trigémino-cervical” y los “reflejos vestíbulo- o acústico-maseterinos”, que combinan la activación de los nervios craneanos V, VIII y XI e involucran activación de circuitos polisinápticos de integración bulbo-protuberancial (Di Lazzaro y cols., 1996; Magnano y cols., 2014). La aplicabilidad clínica de estas técnicas es aun materia de estudio.

3.1.2 Reflejos espinales y de larga latencia

Reflejo H y reflejo de estiramiento. El estudio del reflejo H se obtiene por estimulación eléctrica del nervio tibial posterior a nivel de la cavidad poplíteica y registro electromiográfico con

electrodos de superficie en musculatura de la pantorrilla. La latencia inicial del reflejo H representa el tiempo de conducción total requerido por los impulsos generados para ser transmitidos por vía ortodrómica a través de aferentes Ia, con la consecuente activación sináptica a nivel medular del *pool* de alfa-motoneuronas, y la conducción eferente de impulsos en el nervio tibial posterior hasta el complejo muscular soleo-gastrocnemio. El retraso del

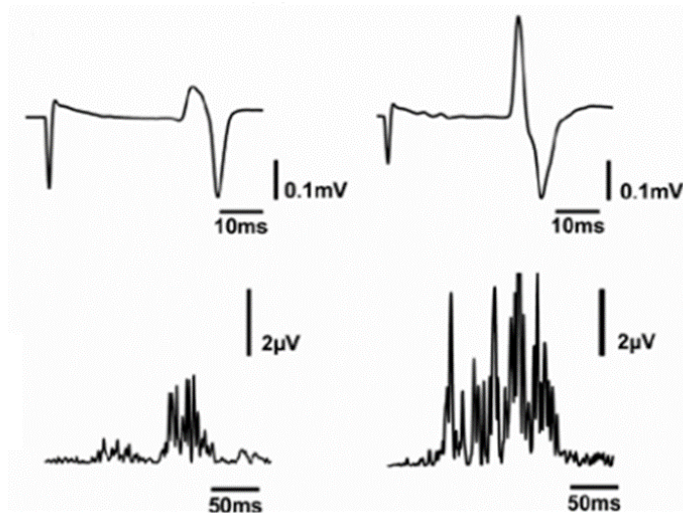


FIGURA 6. Reflejos H (arriba) y cutáneo-espinal (abajo) obtenidos en sujetos control sano (izquierda) y con espasticidad (derecha). El paciente con espasticidad muestra un significativo aumento de la amplitud de las respuestas. De: Gómez-Soriano y cols., 2012.

tiempo de conducción del reflejo H puede estar relacionado a un enlentecimiento focal a nivel aferente o eferente, tal como sucede en lesiones radicales (segmento S1) o mononeuropáticas (nervio ciático poplíteo). La amplitud del reflejo H es proporcional al número de axones finalmente activados por los impulsos aferentes y por lo tanto, representa de manera indirecta (cuando la magnitud del *input* sensorial

es sujeto bajo control) la excitabilidad del circuito reflejo a nivel medular, la cual está condicionada por influencias descendentes supra-segmentarias. Los cambios en la amplitud del reflejo H pueden ser relacionados con alteraciones en los mecanismos de regulación de la excitabilidad medular, que funcionan anormalmente en la espasticidad (**Figura 6**). Efectivamente, el reflejo H es utilizado como una medida fiable de la eficiencia de los impulsos aferentes a las motoneuronas del asta anterior medular y se relacionada con interesantes aspectos fisiopatológicos de la espasticidad (Matthews, 1966; Pierrot-Deseilligny, 1990).

Por otro lado, el reflejo de estiramiento se evoca por estiramiento pasivo del músculo y activación de vías aferentes que transfieren información propioceptiva hacia centros espinales. En pacientes con espasticidad se ha observado un aumento de la amplitud o el acortamiento de la latencia del reflejo de estiramiento (Berardelli y cols., 1983b; Powers y cols., 1988; Toft y cols., 1993). La espasticidad proviene de la hiperexcitabilidad en circuitos del reflejo de estiramiento como consecuencia del daño del tracto cortico-espinal, tal como ocurre en pacientes con lesión medular traumática de evolución crónica. La espasticidad, manifestada

como rigidez, espasmos y dolor, es un síntoma que frecuentemente afecta las extremidades inferiores en pacientes con EMPP (Zajicek y cols., 2003), y que ocurre como consecuencia de la acumulación de lesiones cerebrales, tronco-encefálicas y medulares (Swingler y Compston, 1992). Estudios realizados en pacientes con EM con espasticidad han mostrado que los parámetros neurofisiológicos (entre ellos, el reflejo H y el reflejo de estiramiento) en conjunto con parámetros biomecánicos se correlacionan de manera apropiada con los signos de la exploración clínica del tono muscular y reflejos en la articulación del tobillo (Nielsen y Sinkjaer, 1996). Efectivamente se ha observado que la modulación del reflejo H durante la marcha se encuentra alterada en pacientes con EM con espasticidad moderada (Sinkjaer y cols., 1995). Se ha observado, sin embargo, que la relación entre la amplitud máxima del reflejo H y la onda M (el potencial de acción muscular compuesto, o CMAP de *compound muscle action potential*, obtenido por estimulación del nervio tibial), conocido como cociente H/M, parece ser una variable más adecuada en la valoración de la espasticidad, ya que permite normalizar la alta variabilidad intra-individual en los parámetros del reflejo H determinados por factores técnicos. Adicionalmente, se han observado resultados contradictorios en relación a la correlación entre escalas clínicas de espasticidad y alteración de la amplitud del reflejo H. Sin embargo, es posible que la alteración en otros mecanismos reflejos (reflejo de estiramiento) y no reflejos (modulación por vías retículo- y vestíbulo-espinales) también participen en la generación de espasticidad en pacientes con EM (Leocani y cols., 2015).

Reflejos cutáneos. Es conocido que estímulos cutáneos pueden provocar reacciones reflejas complejas. El signo de Babinski es, sin lugar a dudas, uno de los reflejos cutáneos más utilizados en clínica para la demostración de disfunción en la regulación descendente de las respuestas motoras a estímulos cutáneos. Otros reflejos de utilidad clínica son los reflejos cutáneo-abdominales y el reflejo palmo-mentoniano. Existen muchos más reflejos cutáneos de poca utilidad clínica pero que han sido objeto de estudios neurofisiológicos. Entre ellos, la modulación de la actividad electromiográfica durante una contracción sostenida por estímulos en manos (Deuschl y Lucking, 1990) o el período de silencio obtenido por estímulos nociceptivos (Kofler y cols., 2004; Stetkarova y Kofler, 2013).

No existen estudios concluyentes sobre los reflejos clínicamente más utilizados (Babinski, por ejemplo) y su correlato neurofisiológico en pacientes con EM. Tampoco se han examinado otros reflejos cutáneos como el palmo-mentoniano en EM, aunque los reflejos faciales han sido utilizados en algunos estudios neurofisiológicos clínicos de interés: Por ejemplo, en enfermedades degenerativas que afectan el tronco cerebral, como es el caso de la parálisis supranuclear progresiva, Valls-Solé y cols. (1997) pusieron de manifiesto la ausencia

de reflejo del parpadeo con preservación del reflejo palmo-mentoniano a estímulos cutáneos en mano. Posteriormente, esta misma disfunción se ha observado en lesiones isquémicas de la parte alta del tronco cerebral (León y cols., 2011). Sin embargo, un estudio neurofisiológico concluyente de las alteraciones reflejas cutáneas en pacientes con EM no ha sido todavía realizado.

Reflejos de larga latencia (LLR, de long-latency reflexes). Se presentan a una latencia más tardía que el reflejo H, y se obtienen por estimulación eléctrica de un nervio periférico mixto y registro sobre un músculo

apendicular en ligera contracción isométrica. Están compuestos por 3 componentes, el segundo de ellos (LLR II) es aparentemente mediado transcorticalmente y presenta un alto grado de correlación con los tiempos de conducción de las vías somato-sensorial y motora medidos por estudios de PEs, sugiriendo tractos de conducción comunes.

De este modo, el LLR II involucra también la conducción a través de circuitos intracorticales oligo- o poli-sinápticos (Michels y cols., 1993; Santucci y cols., 1999). En pacientes con EM se ha

observado que los LLR muestran: una elevada sensibilidad incluso mayor que los PE somato-sensoriales (PESS, ver en detalle más adelante) en el diagnóstico de EM “definitiva” (Deuschl y cols., 1988), una elevada correlación en conjunto con los PESS para predecir alteraciones de la vía eferente (Matsumoto y Kaneshige, 1990), pero una baja correlación con la severidad de enfermedad (Tataroglu y cols., 2004). Efectivamente el tiempo de “relevo cortical” medido por LLR II (a cuya latencia se le sustraen los tiempos de conducción de PESS y PE motores) se encuentra prolongado en pacientes con EM en comparación con sujetos sanos, sugiriendo un retraso de la conducción en circuitos intracorticales involucrados en la integración sensitivo-motora (Bonfiglio y cols., 2006; **Figura 7**).

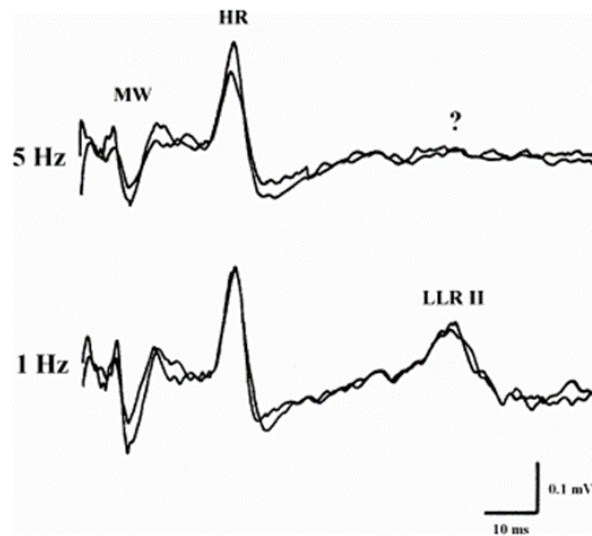


FIGURA 7. Anormalidades del LLR en un paciente con EM, observándose ausencia (trazado superior) o retraso (inferior) de la latencia del componente II obtenidas a 2 frecuencias de estimulación (5 y 1 Hz, respectivamente). Se muestran la respuesta M (MW, potencial de acción muscular compuesto) y el reflejo H (HR) que anteceden el LLR II, ambos con latencia normal. De: Bonfiglio y cols., 2006.

3.2 Vías sensoriales y potenciales evocados (PEs)

En términos generales, los PE “sensoriales” reflejan la actividad electroencefalográfica sincronizada en respuesta a la llegada al cerebro de los impulsos generados por estímulos sensoriales (visuales, eléctricos, acústicos) que son aplicados repetidamente en el tiempo en un segmento corporal o en el campo receptivo de un individuo (Cooper y cols., 2004). De este modo, en presencia de una lesión focal localizada en algún punto de una vía nerviosa, la conducción de potenciales de acción a través de ella se verá enlentecida o bloqueada dependiendo, entre otras cosas, de la magnitud de la lesión. En las lesiones desmielinizantes habitualmente se observa un alargamiento del tiempo de conducción, mientras que en la pérdida axonal se acostumbra a observar disminución de amplitud o ausencia de respuesta. En resumen, una conducción deficiente generará un PE anormal, el cual será específico de la naturaleza del estímulo y de la vía utilizada.

De manera particular, el estudio de los PEs permite establecer diseminación en el espacio de las lesiones y cuantificar la afectación específica de las vías de conducción visual, sensitiva, auditiva y motora, a través de los PE visuales (PEV), los PE somato-sensitivos o somestésicos (PESS), los PE auditivos de tronco-encéfalo (PEAT) y los PE motores (PEM), respectivamente (**Figura 8**). Su mayor utilidad en el contexto clínico de un paciente con EM se observa cuando los síntomas son atípicos sin presentarse un déficit clínico objetivo (afectación “silente”) o cuando los signos clínicos han desaparecido en el momento de la exploración neurológica. Aunque no hay un patrón de anormalidad en los PEs que sea específico de EM, los PEs representan la principal prueba complementaria neurofisiológica en el diagnóstico de EM. Los PEs se han correlacionado con variados grados de discapacidad motora y, de este modo, permiten realizar un seguimiento y monitorizar el curso clínico de la enfermedad.

3.2.1 Potenciales evocados visuales (PEV)

A pesar de que los PEV ya no forman parte de los criterios diagnósticos originales de McDonald específicamente para la EMPP (desde el año 2005), su utilidad es sustancial en la práctica clínica habitual. Se encuentran alterados en el 80% durante la evolución de la enfermedad. Los PEV tienen una sensibilidad del 95% en el contexto de un cuadro compatible con neuritis óptica (Leocani y cols., 2000), observándose de manera consistente un retraso en la latencia del componente P100 con morfología parcialmente conservada como consecuencia de una lesión predominantemente desmielinizante, lo que da cuenta del 80% de las anormalidades de PEV descritas en EM (**Fig.8A**; Takasoh y cols., 2000). Una asimetría en la latencia entre ambos ojos ($> 7.3 - 10$ ms) es una medida muy sensible de disfunción en la conducción del nervio óptico, no así la amplitud. Ocasionalmente, los PEV presentan

disminución de la amplitud en pacientes sin afectación visual clínica, que puede ser atribuido a daño axonal o desmielinizante focal (Diem y cols., 2003). Si bien la amplitud de los PEV por sí sola no es una medida confiable, aparentemente a mayor amplitud mejor pronóstico de recuperación (Hickman y cols., 2004). La ausencia de P100 puede observarse tanto en un episodio agudo de neuritis óptica como en estados avanzados de enfermedad incluso sin afectación clínica visual. PEV anormales bilateralmente se observan en el 50-70% de los casos.

3.2.2 Potenciales evocados auditivos de tronco-encéfalo (PEAT)

El estudio de los PEAT es un método preciso de localización de una lesión que afecte algún punto a lo largo de la vía aferente auditiva. Las aferencias auditivas transcurren por el nervio coclear (VIII nervio craneano) e ingresan al tronco del encéfalo a nivel bulbar alto para realizar conexiones con los núcleos cocleares bilateralmente, y continúan ascendiendo por los lemniscos laterales hacia el tálamo para finalizar en la corteza auditiva del lóbulo temporal de ambos hemisferios. El curso temporal de la progresión de los impulsos auditivos a través de estas estructuras (principalmente tronco-encefálicas) en condiciones fisiológicas, se ve representado por la obtención en los PEAT de 5 ondas (numeradas de I a V). En pacientes con EM, la mayor utilidad de los PEAT radica en poder localizar la lesión focal a nivel del tronco-encéfalo. En este contexto, los PEAT permiten: confirmar lesiones tronco-encefálicas sospechadas clínicamente, evaluar síntomas previos o recientes poco definidos (por ejemplo, diplopía o incoordinación fluctuantes) que pueden orientar a afectación tronco-encefálica, y detectar una segunda lesión asintomática en pacientes con sospecha de EM por lesión única. Los PEAT son anormales aproximadamente en el 40-50% de los casos, específicamente en el 75% de los pacientes con EM “definida” y en el 33% de aquellos con EM “posible” (Misulis y Fakhoury, 2001). En los pacientes sin sintomatología tronco-encefálica, los PEAT están alterados en el 25-33% (alteración silente o subclínica). Específicamente, las alteraciones más habituales de los PEAT en EM se encuentran en: 1. La amplitud de las ondas IV y V con normalidad de las restantes ondas (**Fig.8D**), lo que sugiere una afectación localizada a nivel del tronco-encéfalo superior; 2. La duración de los intervalos entre ondas con prolongación de los componentes I-III o I-V, que sugieren enlentecimiento de la conducción tronco-encefálica. Efectivamente, anomalías de la onda III se han correlacionado con un defecto en la discriminación de la diferencia del tiempo inter-aural en pacientes con EM (Van der Poel y cols., 1988). Por el contrario, los PEAT pueden ser normales incluso en pacientes con EM con demostrada afectación tronco-encefálica (por ejemplo, en la oftalmoplejia internuclear) cuando la vía auditiva se mantiene íntegra (Chiappa, 1988).

3.2.3 Potenciales evocados somato-sensoriales (PESS)

Las anomalías en PESS encontradas en pacientes con EM suelen ser muy variadas (**Fig.8C**; O'Riordan y cols., 1996; Leocani y cols., 2000). Se encuentran anormales hasta en el 60% durante la evolución de la enfermedad. Existe una mayor incidencia de anomalías encontradas en extremidades inferiores que en superiores (Misuli y cols., 2001). En pacientes que manifiestan el cuadro de disestesias paroxísticas se ha descrito una reducción de la amplitud del componente N19/P22 de los PESS (Toru y cols., 2005). Los PESS permiten monitorizar cambios evolutivos en individuos con EM (Leocani y cols., 2003) y también demostrar disfunción de las vías somato-sensoriales retrospectivamente incluso después de tiempos prolongados alejados del episodio desmielinizante. Aparentemente podrían ser más sensibles que la RMN en la detección de lesiones desmielinizantes ubicadas en la médula

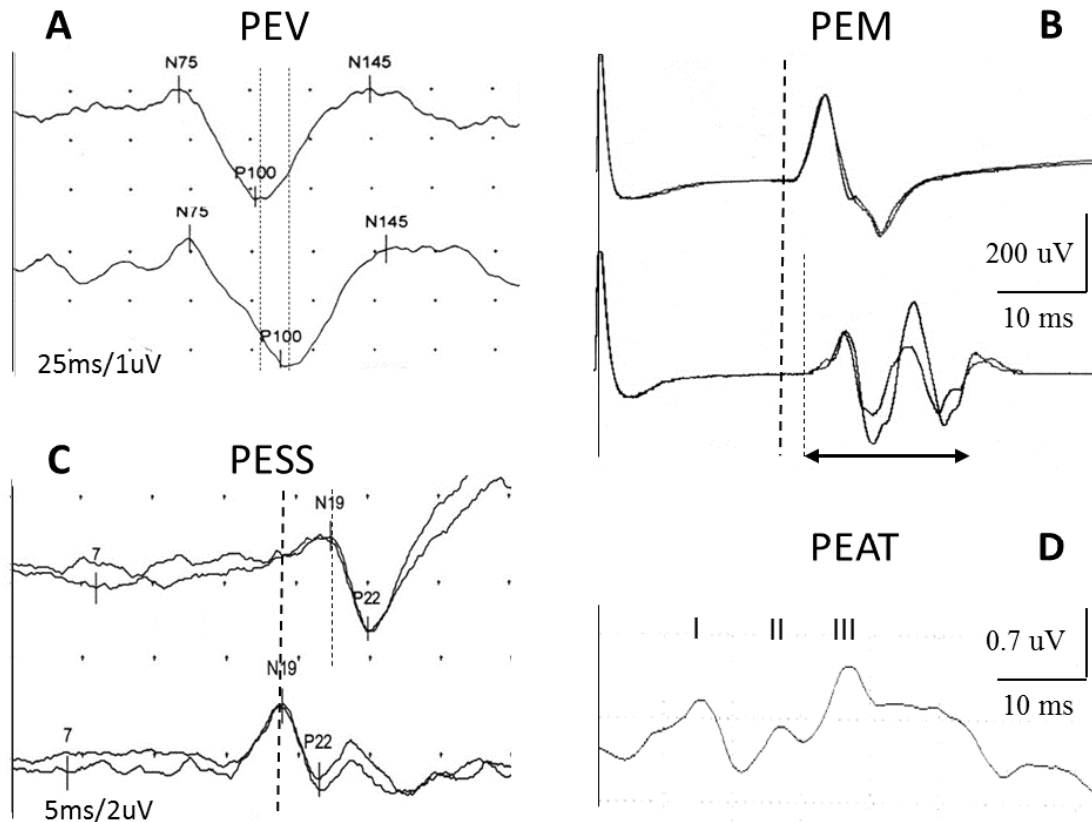


FIGURA 8. Anormalidades típicamente encontradas en el estudio de los PE en pacientes con EM. Se comparan los PE obtenidos por estimulación de ambos lados para A, B y C. Se observa mayormente un retraso en la latencia de las respuestas (PEV, PEM y PESS), y en menor grado, una discreta reducción de la amplitud de ellas con morfología dispersa (polifasia en PEM). En los PEAT (sólo se muestra el trazado por estimulación unilateral) se observa ausencia de las ondas IV y V.

espinal, aunque este tema es controvertido (Emerson, 1998). En la variante de EMPP, en la cual existe una afectación predominante de la médula espinal, posiblemente se encuentre una frecuencia más alta de alteraciones en los PESS.

3.3 Vía motora y estimulación magnética transcraneana (EMT)

La vía motora cortico-espinal (vía piramidal) puede ser estudiada neurofisiológicamente a través de la aplicación de EMT que permite activar de manera indolora la corteza motora primaria y registrar la respuesta mediante electrodos de superficie en musculatura apendicular (Barker y cols., 1985), obteniéndose los así llamados PE “motores”.

3.3.1 Potenciales evocados motores (PEM)

La afectación piramidal es frecuente manifestación en pacientes con EM tanto en un primer episodio clínico de origen desmielinizante como en las formas establecidas de EMRR y, en particular, en la variante de EMPP. Los PEM se encuentran alterados hasta en el 80% de los pacientes durante su evolución. El estudio de los PEM ha mostrado que en pacientes con EM existe un enlentecimiento de la conducción cortico-espinal de los tractos más rápidos, manifestado como un retraso de la latencia distal de los PEM, y una dispersión temporal en la conducción de las voleas descendentes por el tracto piramidal, manifestado como PEM de duración prolongada y polifásicos (**Fig.8B**; Kukowski, 1993; Brum y cols., 2016). Además, los pacientes con EM presentan una falta de facilitación de los PEM con la contracción voluntaria, posiblemente relacionado con la afectación de interneuronas espinales a causa de lesiones focales, una característica distintiva con respecto a otras enfermedades neurológicas en las cuales también se afectan los PEM (Brum y cols., 2016). Los PEM pueden ser utilizados en el contexto de un primer “brote” especialmente si el cuadro clínico incluye un síndrome medular (Gajofatto y cols., 2010), con el objetivo de identificar la existencia de disfunción y localizarla en el SNC. Además, los PEM han demostrado ser útiles en la predicción del curso clínico de los primeros episodios de origen desmielinizante (Pallix-Guyot y cols., 2011). En la variante de EMRR, es aconsejable estudiar los PEM: en pacientes diagnosticados clínicamente de EM y en los que el estudio de RMN cerebral sea normal, y en pacientes con sospecha clínica de EM en los que los hallazgos de la RMN cerebral no sean concluyentes para poder confirmar el diagnóstico. En ambos casos, la detección de lesiones subclínicas compatibles con desmielinización de la vía cortico-espinal apoyaría el diagnóstico clínico. En la variante de EMPP, los PEM podrían ser de particular utilidad en excluir procesos distintos de la EM que pudieran causar un cuadro de disfunción medular progresiva (tumor intrarraquídeo, fístula

dural espinal, etc.), contribuyendo específicamente a la identificación de la disfunción desmielinizante.

El valor de los PEs en el diagnóstico de la EM se ha visto reducido por el avance tecnológico en el uso de la RMN, la cual tiene una alta sensibilidad para la detección de lesiones subclínicas. Una batería de PE multimodales es útil en todo paciente con un cuadro clínico compatible con un primer brote de enfermedad desmielinizante, aumentando la sensibilidad en el diagnóstico de EM (60-85%) aunque no mejora la especificidad (50-85%) (Gronseth y Ashman, 2000). La baja especificidad de los PEs debe tomarse en consideración cuando se detectan anomalías fisiopatológicas en el contexto de un cuadro clínico no compatible con EM. La evidencia de la utilidad de los PEs en conjunto para evaluar el pronóstico o monitorizar el curso de la enfermedad es más bien conflictiva. Sin embargo, en un estudio de 4 años de seguimiento en pacientes con sospecha inicial de EM, los PEV, PESS y PEAT tuvieron un elevado valor predictivo positivo al encontrarse anormales en el 81% de los sujetos que evolucionaron a una EM “definitiva”, mientras que en los pacientes en que no se confirmó el diagnóstico sólo fueron anormales en el 19% (Deltenre y cols., 1982). Además, los PEV en combinación con los PEM permitirían predecir la discapacidad a largo plazo (Schlaeger y cols., 2014). Otros datos avalan la utilización de escalas globales de PEs que proporcionarían un buen rendimiento diagnóstico en la EM y cuyos resultados se correlacionan con la progresión de la enfermedad, lo que permitiría utilizarlos como medida de la neurodegeneración, predicción de la discapacidad futura y monitorización de los efectos de tratamientos modificadores del curso clínico de la EM (McGavern y cols., 2000; Fuhr y cols., 2001; Diem y cols., 2003; Kallmann y cols., 2006; Leocani y cols., 2006; Jung y cols., 2008; Kale y cols., 2009; Rico y cols., 2009; Invernizzi, 2011; Pallix-Guyot y cols., 2011; Schlager y cols., 2011; Schlaeger y cols., 2012).

3.3.2 Otras técnicas con EMT

Además de la estimación del tiempo de conducción de la vía cortico-espinal, la aplicación de un pulso magnético transcraneal permite obtener información sobre la función de aspectos específicos de la vía cortico-espinal (sincronía en la activación de las volas descendentes), de las vías de comunicación inter-hemisférica entre los haces córtico-espinales, y de la excitabilidad de la corteza motora (circuitos excitatorios e inhibitorios a nivel intracortical), mediante técnicas complementarias de EMT. Estas técnicas se pueden dividir en las que utilizan la aplicación de un pulso magnético único de aquellas de mayor complejidad técnica que requieren la aplicación de estímulos dobles o triples.

Aparte del efecto excitatorio que resulta en la obtención del PEM, la EMT por estímulo único también induce fenómenos inhibitorios (Kobayashi y Pascual-Leone, 2003): el período silente cortical ipsilateral (iSP, del inglés *ipsilateral silent period*) y el período silente cortical contralateral (cSP, de *contralateral silent period*). En ambos casos se realiza un registro de superficie desde un músculo de la mano durante contracción voluntaria isométrica. El cSP se obtiene por estimulación del hemisferio del lado contralateral al músculo activado, mientras que el iSP se obtiene por estimulación del hemisferio del mismo lado donde se obtiene el registro. En el primer caso, cuando la EMT se aplica con el músculo activado se observa un cese de la actividad electromiográfica después del PEM. La fase tardía del periodo silente es generada exclusivamente a nivel cortical, y representa la actividad de interneuronas corticales inhibitorias. Un fenómeno inhibitorio de menor duración y con ausencia de PEM se observa cuando el pulso magnético es aplicado en la corteza motora del hemisferio ipsilateral al registro, llamado iSP. Después de la estimulación de la corteza motora ipsilateral, los potenciales de acción son transferidos a través del cuerpo caloso hacia interneuronas inhibitorias en regiones homólogas de la corteza motora contralateral, para finalmente ejercer un efecto inhibitorio neto sobre la vía cortico-espinal contralateral.

Fenómenos inhibitorios y excitatorios de los estímulos magnéticos pueden ser estudiados por la aplicación de pulsos dobles de EMT de la misma o distinta intensidad. Cuando se aplica un pulso condicionante subumbral con un intervalo de 1 – 6 ms con anterioridad a un pulso *test* supraumbral aplicado sobre la misma corteza motora primaria, se obtiene una reducción o inhibición del PEM generado por el estímulo *test*. Esta técnica se conoce como inhibición intracortical a intervalo corto (SICI, de *short-interval cortical inhibition*) y se corresponde con la actividad inhibitoria mediada por receptores GABA_A a nivel intracortical (Ziemann, 2013). Por otro lado, si el estímulo condicionante es aplicado con un intervalo > 8 – 10 ms con anterioridad al estímulo *test*, se produce facilitación del PEM (ICF, del inglés *intracortical facilitation*). Posteriormente, se pueden poner de manifiesto también fenómenos de facilitación e inhibición de larga latencia (Valls-Solé y cols., 1992).

En un estudio realizado en pacientes con EMRR en fase de “brote” se encontró una reducción de la SICI y una menor duración del cSP, sugerente de una reducida inhibición intracortical en comparación con sujetos sanos (Caramia y cols., 2004). Por el contrario, en pacientes con EM en fase de “remisión” se observó una prolongación de la duración de cSP, la cual ha sido correlacionada con disfunción motora desde la extremidad explorada sin observarse diferencias en la SICI, lo que sugiere que mecanismos de excesiva inhibición intracortical contribuyen a impedir la recuperación de la discapacidad motora encontrada en esta fase de enfermedad (Nantes y cols., 2016a). En otro estudio realizado en pacientes en un

estadio similar una mayor ICF fue correlacionada con mayor discapacidad motora (Nantes y cols., 2016b).

La EMT es capaz de estimular todas las proyecciones de las alfa-motoneuronas dirigidas a un músculo intrínseco de la mano si se utiliza una intensidad de estimulación suficientemente alta. Sin embargo, el potencial de acción muscular compuesto obtenido por EMT (o PEM) es marcadamente más pequeño que el obtenido por estimulación eléctrica supramaximal de un nervio periférico (o CMAP). Esta discrepancia ocurre por el hecho de que los potenciales de unidad motora no son sincronizados del todo por la EMT. A causa de esta desincronización las volas pueden parcialmente “cancelarse” entre ellas cuando son registrados desde la superficie. La contribución de la porción de las motoneuronas espinales que es activada por la EMT puede ser estimada con relativa precisión con la técnica de triple estimulación (TST, de *triple stimulation technique*; Magistris y cols., 1998). Esta técnica permite eliminar la influencia de la desincronización en el tamaño del PEM y la influencia de las descargas repetitivas de las motoneuronas. Un estímulo cortical y dos estímulos periféricos colisionan en dos puntos del nervio periférico. Como resultado todos los potenciales de acción de las motoneuronas espinales inducidos por el estímulo cortical son sincronizados. En un estudio que incluyó pacientes con EMRR y EMPP, las alteraciones encontradas con TST se correlacionaron con el déficit motor en ambos grupos de pacientes mientras que el tiempo de conducción central fue significativamente más prolongado en pacientes con EMPP que en EMRR, sin encontrarse una asociación con el grado de afectación estructural de la médula espinal (Humm y cols., 2003).

En resumen, el estudio de los PEs proporciona medidas fiables y precisas de parámetros neurofisiológicos específicos (latencia, amplitud, etc.) que permiten establecer o descartar la disfunción neurológica en la vía examinada. La detección de disfunción subclínica constituye, en el caso de la EM, un apoyo importante para el diagnóstico. Además, según el tipo de alteración detectada, los PEs permiten sugerir las características de la lesión subyacente.

3.4 Integración sensitivo-motora y vías comisurales

La bradicinesia y la lentitud motora son características clínicas habituales en las enfermedades neurodegenerativas. Mientras la bradicinesia como tal es un aspecto básico del diagnóstico de enfermedades extrapiramidales (por ej., en la enfermedad de Parkinson), de fácil reconocimiento en la exploración clínica de la marcha y en la realización de tareas unimanuales repetitivas (por ej., *finger tapping*), una cierta lentitud motora puede involucrar diversos ámbitos del quehacer diario de un sujeto, no siendo específica de una tarea en

particular ni de una enfermedad neurológica concreta. Experimentalmente, los pacientes con EM presentan retraso en la ejecución de tareas motoras que ha sido típicamente atribuido a falta de concentración y daño cognitivo (Kail y cols., 1998; De Sonneville y cols., 2002; Stoquart-ElSankari y cols., 2010). Clínicamente, no es inhabitual ver pacientes con EM que muestran dificultad en la realización de tareas motoras comunes (escritura, vestirse, etc.), con marcha lenta o franca bradicinesia en la exploración neurológica. Dado que la afectación del sistema extrapiramidal no es parte del cuadro etiopatogénico ni sindromático de la EM, otra explicación plausible puede estar relacionada con tal lentitud motora.

Muchas de estas tareas involucran integración sensitivo-motora, que puede evaluarse mediante tareas de tiempo

de reacción. En tareas que comportan tiempo de reacción simple, el sujeto experimental debe realizar un acto motor unimanual simple (por ej. cierre de un puño, flexión o extensión de la muñeca, etc.) lo más rápido posible como reacción ante una señal imperativa o de arranque. Dicha señal, de naturaleza sensorial, puede ser un estímulo visual, acústico o táctil (por ej. un pulso eléctrico). La reacción voluntaria puede ser medida mediante transductores de

movimiento (acelerómetro) o electromiografía de superficie de la musculatura activada.

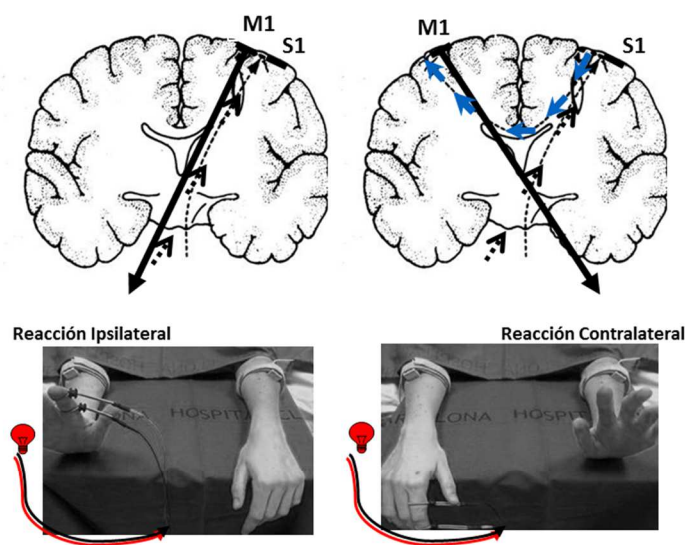


FIGURA 9. Paradigma de tiempo de reacción simple: extensión de la muñeca en respuesta a un estímulo sensorial de tipo eléctrico (representado por una bombilla). Arriba, se muestran las vías de conducción neural sensorial o aferente (flechas discontinuas) y motora o eferente (flecha continua), ambas decusadas, integradas y originadas en cortezas sensorial y motora primarias (S1 y M1, respectivamente). Abajo, dos situaciones experimentales son ejemplificadas sin (izquierda) y con (derecha) transferencia de impulsos al hemisferio opuesto (flechas curvas): se ejecuta la acción en el mismo lado donde se aplicó el estímulo (reacción ipsilateral, condición "no cruzado"), o con la mano opuesta al lado donde se aplicó el estímulo (reacción contralateral, condición "cruzado").

3.4.1 Paradigma de tiempo de reacción "cruzado"

Los paradigmas de tiempo de reacción representan una estrategia interesante para estudiar de manera indirecta la integridad de las vías nerviosas de conducción a nivel central y periférico. Adicionalmente, entregan información relacionada con los mecanismos centrales de integración sensitivo-motora y de preparación motora necesarios para el correcto

procesamiento de información sensorial y activación de estructuras corticales / subcorticales, respectivamente, involucrados en la realización de una tarea motora específica. La integración sensitivo-motora involucra la activación de la maquinaria sináptica que conlleva a la ejecución de un acto motor preprogramado en respuesta a una señal sensorial (Abbruzzese y Berardelli 2003; Swayne y cols., 2006). A pesar de la gran utilidad en la evaluación de la conducción en vías neurales, el estudio de los PEs refleja la funcionalidad que puede existir solamente en una

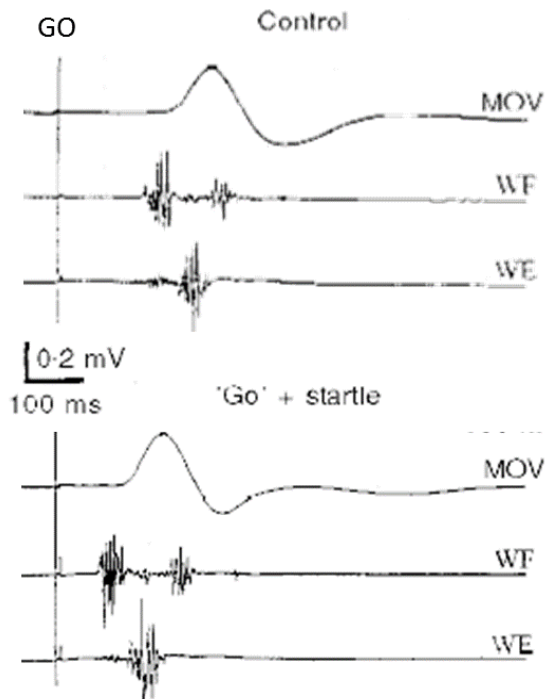


FIGURA 10. Efecto StartReact. Registro con acelerómetro (1er trazado) y electromiografía de superficie (2do y 3er trazados) de la actividad en músculos flexores (WF) y extensores (WE) del antebrazo en un tiempo de reacción simple para el movimiento balístico de extensión de la mano, observándose el típico patrón trifásico de activación (imagen superior). La aplicación de un sobresalto ("startle") simultáneamente a la señal imperativa (GO) acorta significativamente el tiempo de reacción (imagen inferior). Adaptado de: Valls-Solé y cols., 1999.

parte (aférente) de la vía de integración sensitivo-motora, fundamental en la ejecución de actos motores. Al menos dos situaciones desde el punto de fisiopatológico pueden contribuir a una respuesta ejecutada de manera enlentecida: 1. La percepción demorada en el tiempo de la señal sensorial, con un estudio de PESS anormalmente retrasados e indemnidad en las restantes estructuras; 2. La alteración "aguas abajo" en el sistema de ejecución en las vías de conducción motora y/o en vías de integración sensitivo-motoras en un paciente con una correcta conducción por vías somato-sensoriales (PESS normales). La suma de las alteraciones en la vía sensitiva y en la vía motora podría comportar una alteración más evidente y potencialmente más relevante para la

disfunción clínica, la cual es susceptible de ser evaluada mediante la utilización del paradigma de tiempo de reacción "cruzado" (Figura 9). Este método consiste en aplicar un estímulo por ejemplo de tipo somestésico (habitualmente un pulso eléctrico) en un segmento corporal del hemicuerpo del sujeto experimental (por ejemplo, la mano), el cual será integrado en la corteza sensorial del hemisferio cerebral opuesto al hemisferio cerebral involucrado en la activación motora para ejecutar el acto motor simple (Schieppati y cols., 1984; Schulte y cols., 2005; Kennedy y cols., 2013). La utilización de este paradigma implica necesariamente la

transferencia de impulsos desde un hemisferio al opuesto, y por lo tanto, la participación de vías comisurales de integración inter-hemisférica.

3.4.2 Reacción de sobresalto y circuitos motores subcorticales

Diversos mecanismos están involucrados en el aumento de la excitabilidad que ocurre con anterioridad a la ejecución de

un acto motor voluntario. El cambio de excitabilidad ocurre a todos niveles de la vía motora, incluyendo vías motoras subcorticales (Brunia, 1993; Valls-Solé y cols., 1995).

Experimentalmente, el incremento de excitabilidad subcortical se puede poner de manifiesto mediante la adición de un estímulo que provoca reacción de sobresalto, generada por activación del sistema retículo-espinal en el tronco-encéfalo (Davis y cols., 1982; Liegeois-Chauvel y cols., 1989), al estímulo que se use como señal imperativa en el paradigma del tiempo de reacción. Esta combinación de estímulos comporta una aceleración del tiempo de reacción, llamado efecto *StartReact*, que implica la participación de estructuras y

circuitos activados en la reacción de sobresalto en la ejecución de la tarea motora convenientemente preparada (**Figura 10**; Valls-Solé y cols., 1995, 1999; Siegmund y cols., 2001; Carlsen y cols., 2004a,b). Con este método se puede examinar el grado de excitabilidad motora subcortical en la preparación para efectuar un acto motor. La falta de tal facilitación sugiere una deficiente energización de circuitos subcorticales motores, como se ha observado en la

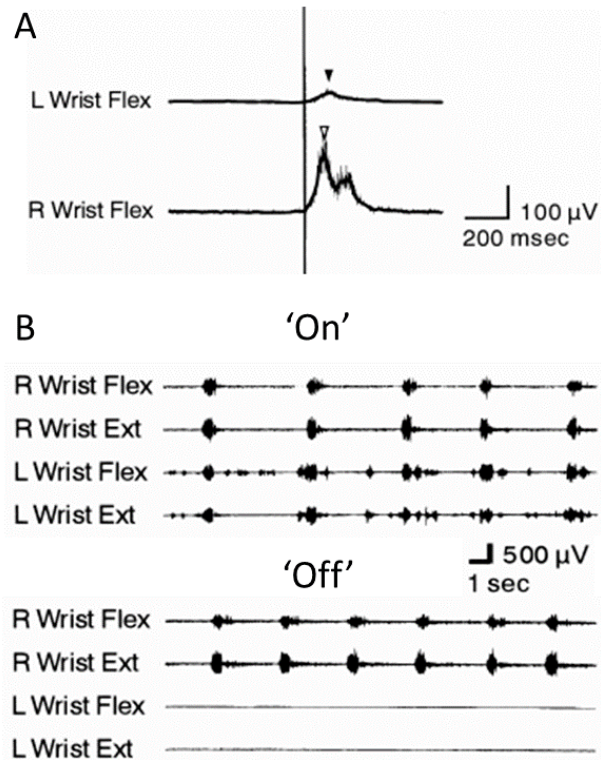


FIGURA 11. Registro de la actividad EMG en “espejo” (mEMG) en la musculatura del antebrazo izquierdo (L) en 2 pacientes con falta de control motor. Se ha utilizado como paradigma experimental la ejecución voluntaria de una tarea motora simple de modo repetitivo (contracción del puño) del lado derecho (R), con indicación de mantener reposo de la extremidad contralateral. En A, se muestra la mEMG en un paciente con Huntington, rectificación, suavizado y promedio de 500 registros. En B, se muestra la mEMG a lo largo del tiempo en un paciente con Parkinson durante la ejecución de la tarea en fase ‘on’ pero no en ‘off’. De: Hashimoto y cols., 2001.

parálisis supranuclear progresiva (Valdeoriola y cols., 1998). El típico daño subcortical observado en EM podría adicionalmente estar relacionado con una falta de energización en los mecanismos de preparación motora, y ser un factor añadido en la lentitud de movimientos y retraso en la ejecución de tareas motoras.

3.4.3 Inhibición transcallosa y control motor

Como hemos señalado previamente, una variante interesante para el estudio de vías de integración inter-hemisférica es el paradigma de tiempo de reacción “cruzado”. La principal estructura anatómica por la cual discurren fibras comisurales es el cuerpo calloso, el cual está particularmente afectado en EM. El cuerpo calloso participa en la transferencia de impulsos de naturaleza excitatoria e inhibitoria entre regiones homólogas de ambos hemisferios. Se ha descrito una distribución topográfica antero-posterior (de rodilla a esplenio) de las fibras que transcurren a través de él (Witelson, 1989), de tal manera que las fibras de segmentos que conectan estructuras distintas no se entremezclan y mantienen una clara distribución fascicular. De esta manera, por ejemplo, las fibras que conducen información motora que conectan M1 bilaterales son anteriores o rostrales a las fibras que transportan información sensitiva entre S1 bilaterales. Se ha observado que en pacientes con EM los segmentos mayormente afectados con atrofia del cuerpo calloso son los segmentos del cuerpo medio y el rostrum (Evangelou y cols., 2000). Asimismo, el daño estructural y microestructural del cuerpo calloso se ha correlacionado con una alteración en la conducción a través de fibras motoras inhibitorias (Llufriu y cols., 2012).

Una parte fundamental del control motor es la capacidad de ejecutar un acto voluntario restringido a un segmento corporal de manera precisa sin involucrar la activación de otros segmentos corporales no deseados en la realización de dicho acto motor primario. Tal activación no deseada puede implicar grupos musculares de distintos segmentos corporales (musculatura heteróloga) al del movimiento primario, como también de musculatura correspondiente al mismo segmento corporal en el hemicuerpo contralateral (musculatura homóloga). Efectivamente, la ejecución voluntaria de un acto motor estrictamente unilateral de tipo balístico implica necesariamente la inhibición de la vía cortico-espinal contralateral para evitar un movimiento sincinético o en “espejo” en el miembro contralateral (Leocani y cols., 2000; Liepert y cols., 2001). El movimiento en espejo se define como aquél que ocurre en músculos homólogos al del miembro donde se ejecuta la acción, y que se manifiesta de un modo similar al que se quiere ejecutar voluntariamente. Estos movimientos ocurren fisiológicamente en la infancia pero desaparecen con la mielinización del cuerpo calloso durante el desarrollo (Reitz y Müller, 1998), los cuales no son observables en condiciones

normales en la vida adulta debido a un correcto mecanismo de inhibición inter-hemisférica (Nass, 1985; Mayston y cols., 1999; Hoy y cols., 2007).

En adultos sanos sólo es posible detectar tal actividad sincinética con registro electromiográfico de superficie durante la preactivación de la musculatura homóloga cuando se ejecuta la tarea motora con el brazo contralateral (Armatas y cols., 1994; Mayston y cols., 1999). La presencia de actividad en espejo sugiere fuertemente falta de control motor. Esto ha sido descrito en diversas enfermedades neurológicas y psiquiátricas, tales como la enfermedad de Parkinson, Huntington, esquizofrenia, entre otras, mayormente observada como movimientos en espejo (**Figura 11**; Van den Berg y cols., 2000; Hashimoto y cols., 2001; Addamo y cols., 2007; Hoy y cols., 2007). En la mayoría de estas patologías, el principal mecanismo involucrado en la falta de control inhibitorio sobre la extremidad contralateral es una defectuoso mecanismo de inhibición transcalloso (Hübers y cols., 2008).

Aunque en EM existe un daño predominante en estructuras cerebrales de la línea media (cuerpo caloso y tronco del encéfalo) que implica necesariamente afectación de vías

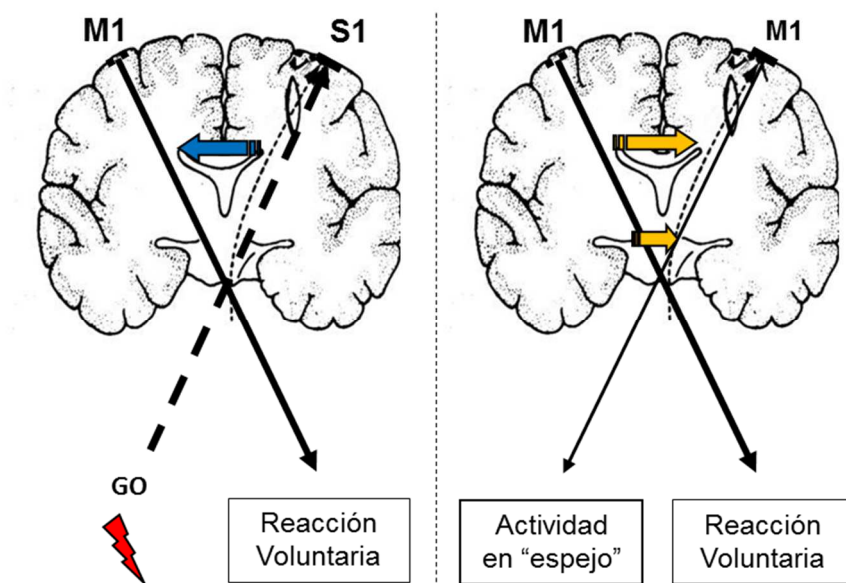


FIGURA 12. Se representan en "paralelo" los mecanismos comisurales (flechas horizontales) involucrados en un paradigma "cruzado" de tiempo de reacción (similar a Figura 8) necesarios para la correcta ejecución de la tarea unimanual y evitar al aparición de actividad sincinética no deseada (GO=señal imperativa). Izquierda, transferencia inter-hemisférica e integración sensitivo-motora de impulsos desde el hemisferio involucrado en recepción de impulsos sensitivos al hemisferio involucrado en la generación de la actividad motora voluntaria. Derecha, actividad inhibitoria inter-hemisférica entre haces córtico-espinales "homólogos" desde el hemisferio involucrado en reacción motora voluntaria al contralateral. S1 y M1 representan cortezas sensorial y motora primarias.

comisurales de conexión entre tractos cortico-espinales homólogos, en la práctica clínica los movimientos en espejo no son una característica reconocible habitualmente en pacientes con EM. Sin embargo, los pacientes con EM manifiestan otros ejemplos de falta de control motor, como el temblor de intención y la dismetría, los cuales han sido relacionados con una disfunción en la integración sensorio-visual y mecanismos compensatorios motores inadecuados (Heenan y cols., 2014). El grado de participación de estructuras cerebrales en el control motor durante la ejecución de tareas unimanuales puede ser examinado utilizando técnicas funcionales de RMN. Interesantemente, se ha observado que los pacientes con EM muestran hipoactividad en el área cerebral involucrada en la ejecución de una tarea unimanual e hiperactividad compensatoria en áreas cerebrales homólogas y no homólogas (Lenzi y cols., 2007).

La ejecución voluntaria de un acto motor estrictamente unilateral de tipo balístico implica necesariamente la inhibición de la vía cortico-espinal contralateral para evitar un movimiento sincinético en el miembro contralateral. Es interesante notar que en el contexto de un tiempo de reacción cruzado como el descrito con anterioridad, un estímulo sensorial (utilizado como señal imperativa) aplicado en un hemicuerpo e integrado en la corteza sensorial primaria contralateral, deberá ser necesariamente transferido al hemisferio opuesto (corteza motora primaria) para generar la respuesta motora deseada (**Figura 12**). En paralelo con este proceso de transferencia inter-hemisférica de información, los mecanismos de inhibición inter-hemisférica deberán participar activamente para evitar la aparición de movimientos en espejo. De esta manera, la utilización de un paradigma de reacción cruzado representa un modelo interesante para examinar en “paralelo” el funcionamiento de vías comisurales de transferencia y de inhibición inter-hemisférica. En este paradigma experimental podría ser esperable observar con mayor facilidad falta de control motor unimanual en patologías que presenten alteraciones en dichas vías comisurales. La falta de control inhibitorio contralateral podría ser una característica en pacientes con EM durante la ejecución de una tarea unimanual en un paradigma de un tiempo de reacción cruzado, relacionada específicamente con las alteraciones de la conducción transcallosa.

III. Hipótesis

Tomando en consideración los siguientes dos aspectos fundamentales del sustrato neuropatológico en EM:

1. Que la distribución anatómica de las lesiones subcorticales localizadas a nivel supratentorial es aleatoria y, por lo tanto, muy probablemente asimétrica entre ambos hemisferios;
2. Que existe un daño predominante del cuerpo calloso y del tronco del encéfalo, estructuras por donde transcurren vías comisurales de conexión;

Se han planteado dos hipótesis de trabajo:

1. El daño hemisférico subcortical se asocia a alteraciones asimétricas de la excitabilidad de los reflejos del tronco del encéfalo;
2. La afectación de fibras comisurales de integración inter-hemisféricas entre vías largas (tractos cortico-espinales y/o espino-corticales) se asocia a lentitud en la ejecución de tareas motoras y a falta de control inhibitorio de actividad sincinética.

IV. Objetivos

Generales:

1. Caracterizar neurofisiológicamente las alteraciones subclínicas de la excitabilidad de respuestas reflejas tronco-encefálicas en pacientes con EM
2. Caracterizar las alteraciones del control motor y de la integración sensitivo-motora en paradigmas de tiempo de reacción.

Específicos:

1. Examinar la relación entre la asimetría de la distribución de lesiones a nivel supratentorial y la asimetría en la excitabilidad de los reflejos de tronco del encéfalo (reflejo de parpadeo).
2. Cuantificar la lentitud en la ejecución de tareas motoras y correlacionarlo con el tiempo de conducción de vías sensitivo-motoras de integración interhemisférica.
3. Correlacionar la magnitud de la actividad electromiográfica en “espejo” con el daño anatómico de vías comisurales cuantificado por estudios de RMN.

V. Métodos

1. Generalidades

Los estudios que han dado lugar a la presente tesis han sido desarrollados en el contexto de un Proyecto de Investigación para profundizar en el conocimiento del control motor de pacientes con EM, utilizando neuroimagen y neurofisiología (registro número 4141). Todos los estudios tuvieron un formato de corte transversal y se realizaron en un grupo de 21 pacientes con EM que estuvieron de acuerdo en participar de forma voluntaria en los experimentos. Los pacientes estaban siendo seguidos regularmente por el Servicio de Neurología del Hospital Clinic de Barcelona y presentaban la forma recurrente-remitente de la enfermedad. Los participantes fueron reclutados de manera prospectiva consecutivamente si cumplían con los criterios de inclusión: diagnóstico confirmado de EMRR por criterios de McDonald (Polman y cols., 2011), ser ambulatorios, tener una puntuación baja a moderada en la *Expanded Disability Status Scale* (EDSS < 6.0; Kutzke, 1983), estar bajo terapia inmunomoduladora estable y libre de recaídas y/o brotes durante el mes previo al reclutamiento. Además, se examinaron 12 voluntarios sanos equiparados en edad y sexo con el grupo de pacientes, que fueron utilizados como grupo control. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado. Los participantes fueron sometidos a una batería de estudios neurofisiológicos en varias sesiones en diferentes días para cada uno de los protocolos experimentales, según los criterios de inclusión de cada estudio en particular. Conjuntamente al protocolo experimental, se han efectuado pruebas complementarias electrofisiológicas (PESS y PEM) y de neuroimagen (RMN) cuyos hallazgos se han correlacionado con los datos experimentales.

Durante el periodo de realización de esta tesis doctoral, el doctorando se ha involucrado directamente en la realización de las técnicas neurofisiológicas que han sido aplicadas, así como en el análisis de los resultados que de ellas se han obtenido. Un aspecto fundamental en el estudio de correlación neurofisiológica-neuroimagen ha sido el análisis de los datos obtenidos en la RMN de encéfalo de 3 Teslas que se ha usado en los trabajos 1 y 3. En el trabajo 1 se ha evaluado cuantitativamente el volumen (en pacientes y voluntarios sanos) y carga lesional (solamente en pacientes) de manera segmentada de las estructuras supratentoriales (hemisferios cerebrales y cuerpo calloso por separado) y del tronco del encéfalo (Desikan y cols., 2006), utilizando las aplicaciones informáticas FSL y Freesurfer. Adicionalmente en el Trabajo 3, hemos utilizado mediciones de difusividad por tensor de imagen (DTI) para el análisis microestructural del cuerpo calloso y el tronco-encéfalo, obteniéndose los siguientes parámetros: anisotropía fraccional (FA), difusividad media, radial y axial (MD, RD, AD). Por ello, para la realización de los estudios que han llevado a la preparación

de esta tesis, el doctorando ha debido aprender las bases metodológicas fundamentales y prácticas del estudio en técnicas avanzadas de RMN previamente mencionadas, y que han sido ejecutadas por un experto en estas técnicas (Eloy Martínez-Heras).

A continuación detallaremos las bases técnicas de cada uno de los estudios realizados, mientras que en la sección de Métodos de cada manuscrito se encuentran descritas las características metodológicas utilizadas específicamente para cada paradigma experimental.

2. Especificaciones técnicas de los estudios neurofisiológicos

2.1 Excitabilidad de los reflejos tronco-encefálicos

Reflejo de parpadeo por estímulo único y cociente R2c/R2. Se examina con registro electromiográfico de superficie (filtros 20 – 2000 Hz) con electrodo activo colocado sobre el párpado inferior del músculo OOC y electrodo de referencia colocado en el canto externo de la órbita, en ambos lados de la cara. El reflejo de parpadeo se obtiene sea por estimulación del nervio trigémino, aplicada sobre la escotadura supraorbitaria (lugar por donde transcurre la rama oftálmica del V nervio craneano), como por estimulación del nervio mediano, aplicada sobre el recorrido del nervio a nivel de la muñeca. Para la estimulación trigeminal, se utiliza un pulso eléctrico de configuración cuadrada de 0.2 ms de duración y de intensidad sobre 4 veces el umbral de percepción, a una frecuencia no superior a 0.1 Hz para evitar la habituación de las respuestas obtenidas por estimulación repetida. Para la estimulación periférica, el pulso eléctrico se aplica sin previo aviso a una intensidad suficiente para provocar una ligera sacudida de la musculatura tenar (León y cols., 2011). Se estudian los parámetros de latencias inicial y amplitud o área de las respuestas ipsilaterales y bilaterales, obtenidas por estimulación de ambos lados del rostro. Finalmente se calcula el cociente R2c/R2 obtenido por estimulación unilateral a cada lado por separado (Kimura y cols., 1975; Dengler y cols., 1982; Manca y cols., 2001). De esta manera, de las respuestas R2 registradas en el lado derecho (R2) e izquierdo (R2c) por estimulación derecha calculamos el cociente R2c/R2 del lado derecho, y viceversa.

Reflejo de parpadeo por estimulación pareada (BRER). Esta técnica utiliza la misma metodología de registro como de parámetros de estimulación que la estimulación única del nervio trigémino (Kimura, 1973). Se aplican dos pulsos sobre el recorrido de la rama oftálmica del nervio trigémino (nervio supraorbitario) separados por un intervalo de tiempo conocido (a intervalos entre 100 y 600 ms) con un tiempo de barrido de señal de 1 segundo. Se estudia la proporción del área entre las respuestas R2 ipsilaterales obtenidas por la estimulación

pareada, según descrito ampliamente en la descripción de las técnicas neurofisiológicas en la Introducción.

Inhibición del reflejo de parpadeo por un prepulso sensitivo (BRIP). El prepulso se aplica en el dedo índice con unas anillas de estimulación bipolar. Éste consiste en un pulso eléctrico cuadrado de 0.2 ms de una intensidad menor a 2 veces el umbral sensorial, incapaz de generar por sí solo una respuesta, que se aplica a un intervalo de tiempo 100 ms antes del pulso aplicado en territorio trigeminal (Ison y cols., 1990; Valls-Solé y cols., 1999). Se estudia la proporción del área de la respuesta R2 ipsilateral obtenida sin y con la aplicación del prepulso. De esta manera, las medidas neurofisiológicas estudiadas han involucrado: los reflejos de parpadeo trigeminal y somatosensorial por estimulación eléctrica del nervio supraorbitario y del nervio mediano bilateralmente; la curva de recuperación de la excitabilidad del reflejo de parpadeo trigeminal bilateralmente por estimulación pareada del nervio supraorbitario en ambos lados de la cara a intervalos de tiempo variable (cada 100 ms) entre 100 y 600 ms; y la inhibición del reflejo de parpadeo trigeminal por aplicación de un prepulso sensitivo en el nervio mediano, como una medida secundaria de excitabilidad del tronco del encéfalo.

En resumen, los datos obtenidos en esta condición experimental del estudio han sido:

- a. Latencia y amplitud de la respuesta R1, para cada lado;
- b. Latencia y área de las respuestas R2 y R2c, para cada lado;
- c. Diferencia entre lados de la amplitud de la respuesta R1;
- d. Diferencia entre lados del área de las respuestas R2 y R2c;
- e. Latencia y área del SBR, para cada lado;
- f. Diferencia entre lados del área de SBR;
- g. Cociente del área R2c/R2, calculado para cada lado;
- h. BRER index, correspondiente a la sumatoria del porcentaje de recuperación del R2 a cada intervalo entre 100 y 600ms, para cada lado;
- i. Diferencia entre lados del BRER index;
- j. Porcentaje de BRIP, para cada lado;
- k. Diferencia entre lados del porcentaje de BRIP.

2.2 Conducción central de las vías comisural inter-hemisférica, motora y somato-sensorial

Estimulación magnética transcraneal (EMT). El registro de los PEM se obtiene con electrodo activo de superficie colocado sobre el músculo primer inter-óseo dorsal (FDI) y electrodo de referencia en la falange proximal del dedo índice, de la mano contralateral al hemisferio de aplicación de la EMT. Para la estimulación de la corteza motora primaria, se utiliza una bobina

en forma de “8” o “mariposa” conectada a un estimulador magnético, que permite estimular focalmente áreas específicas del homúnculo motor (Barker y cols., 1985). Primero se localiza el punto de máxima representación cortical de la musculatura registrada (*hotspot* motor) y se calcula el umbral motor de reposo, definido como la menor intensidad necesaria para obtener PEM de amplitud mínima de 50 μ V en al menos el 50% de los ensayos (Kobayashi y Pascual-Leone, 2003). A continuación, se obtiene el PEM aplicando un pulso magnético de una intensidad 1.2 veces superior al umbral motor de reposo calculado. Se estudia la latencia inicial del PEM. Adicionalmente para la realización de esta tesis doctoral, se ha examinado el periodo de silencio o cese de la actividad electromiográfica en musculatura apendicular (FDI) por EMT de la corteza motora primaria ipsilateral, conocido como iSP. El iSP se obtiene aplicando el pulso magnético sobre el *hotspot* motor durante la preactivación de la musculatura del FDI ipsilateral a un 20% de la máxima contracción. La latencia inicial del iSP representa el tiempo de conducción necesario requerido para que la vola de activación (obtenida por el pulso magnético) sea transferida al hemisferio contralateral a través de vías inter-hemisféricas comisurales e inhiba la vía cortico-espinal contralateral y la consiguiente actividad electromiográfica en FDI (Meyer y cols., 1995). De la latencia del iSP se estima el tiempo de conducción transcalloso, por sustracción del tiempo de conducción de la vía cortico-espinal (tiempo transcalloso = latencia iSP – latencia PEM contralateral).

Potenciales evocados somato-sensitivos (PESS). Los sujetos son examinados en posición de decúbito en estado de vigilia y de máxima relajación, con los ojos abiertos. Se colocan electrodos de registro electroencefalográfico sobre el cuero cabelludo en áreas de representación de la corteza sensorial bilateralmente (C3' y C4') según convención del sistema 10-20. Los PESS se obtienen por estimulación eléctrica del nervio mediano a nivel de la muñeca a la intensidad mínima necesaria para inducir un ligera contracción de la musculatura tenar (0.2 ms), a una frecuencia de estimulación de 5 Hz (Cooper y cols., 2004). Los registros libres de artefactos de la aplicación de 500 estímulos eléctricos son promediados, repitiéndose en una oportunidad en busca de respuestas reproducibles. Se analiza la latencia al pico de las respuestas electroencefalográficas N19 y P22.

En resumen, los datos obtenidos en esta condición experimental del estudio han sido:

- a. Latencia del PEM, por EMT de cada lado;
- b. Latencia inicial y duración del iSP, por EMT de cada lado;
- c. Tiempo de conducción inter-hemisférico o transcalloso;
- d. Latencia al pico de los componentes N19 y P22 del PESS, para cada lado.

2.3 Preparación motora, excitabilidad subcortical y actividad sincinética.

Paradigma de tiempo de reacción “cruzado”. En un ambiente controlado en posición sentada, los antebrazos de los sujetos de estudio se fijan sobre una plataforma en posición de pronación, quedando la articulación de la muñeca libre para poder realizar movimientos de flexo-extensión a solicitud del experimentador (**Fig.9**). La señal imperativa consiste en un impulso eléctrico cuadrado (0.2 ms de duración) aplicado en el dedo índice de la mano a una intensidad supraumbral submaximal. La instrucción que se da al sujeto es que reaccione lo más rápido posible con un movimiento único de extensión de la muñeca de tipo balístico. El tiempo de reacción se mide con registro electromiográfico de superficie por medio de electrodos colocados sobre los músculos extensores de la muñeca. El registro también se obtiene del miembro contralateral a fin de evaluar la posible actividad sincinética en musculatura homóloga. En el registro del miembro donde se aplica el estímulo eléctrico también se cuantifica la posible actividad electromiográfica correspondiente a la generada por un reflejo cutáneo-muscular (CMR, de *cutaneomuscular reflex*). Los participantes son sometidos a dos condiciones experimentales: paradigma “no cruzado”, en el cual el sujeto debe reaccionar con el mismo antebrazo donde se aplica la señal imperativa (reacción ipsilateral), y paradigma “cruzado”, en el cual el sujeto debe reaccionar con el antebrazo opuesto donde se aplica la señal imperativa (reacción contralateral; **Fig.9**). El uso del paradigma de tiempo de reacción “cruzado” (Schieppati y cols., 1984) se utiliza con el fin de investigar la contribución de las fibras comisurales en la transferencia de información sensitivo-motora y en el estudio de la inhibición inter-hemisférica entre haces cortico-espinales homólogos durante la ejecución de movimientos balísticos unimanuales.

Sobresalto auditivo y efecto StartReact. El grado de excitabilidad de los circuitos subcorticales durante la preparación motora del paradigma de tiempo de reacción simple se estima mediante el estudio del efecto *StartReact* (Valls-Solé y cols., 1995, 1998; Siegmund y cols., 2001; Carlsen y cols., 2004a,b), el cual se consigue aplicando (aleatoriamente en un 25% de los ensayos) un estímulo auditivo de alta intensidad capaz de generar una reacción de sobresalto (EAS), en forma simultánea a la aplicación de la señal imperativa. El estímulo auditivo se logra fácilmente descargando el estimulador magnético con la bobina colocada sobre una plataforma metálica. La reacción de sobresalto se confirma con registro simultáneo de la actividad electromiográfica de superficie en OOc y en el músculo esternocleidomastoideo (SCM).

En resumen, los datos obtenidos en esta situación experimental han sido:

- a. Tiempo de reacción, medido desde el momento de la aplicación del estímulo sensorial hasta el inicio de la actividad electromiográfica, considerándose sea el valor medio de todos los ensayos como el valor más corto de entre todos los ensayos, separadamente para la condición basal vs EAS y para la condición cruzado vs no cruzado;
- b. Diferencia en el tiempo de reacción entre condiciones cruzado y no cruzado, para la condición basal;
- c. Latencia de la reacción de sobresalto en OOC y en SCM, para la condición EAS;
- d. Efecto *StartReact*, estimado como el porcentaje de acortamiento del tiempo de reacción en la condición EAS con respecto a la condición basal, considerándose sea el valor medio de todos los ensayos como el valor más corto de entre todos los ensayos, separadamente para la condición cruzado vs no cruzado;
- e. Latencia y área de la actividad electromiográfica en espejo (mEMG, del inglés *mirror electromyographic activity*), para el lado contralateral a la reacción;
- f. Persistencia de la mEMG, expresada como el porcentaje de las veces en que se observó la actividad con respecto al total de ensayos;
- g. Latencia y área del CMR, para el lado de aplicación de la señal sensorial;
- h. Persistencia del CMR, expresada como el porcentaje de las veces en que se observó la actividad con respecto al total de ensayos;
- i. Diferencia entre el tiempo de reacción y la latencia de la mEMG, para la condición cruzado.

VI. Resultados

Trabajo número 1

Abnormal Control of Orbicularis Oculi Reflex Excitability in Multiple Sclerosis.

Cabib C, Llufríu S, Martínez-Heras E, Saiz A, Valls-Solé J

PLoS one. 2014 Aug 1;9(8):e103897. doi: 10.1371

Abnormal Control of Orbicularis Oculi Reflex Excitability in Multiple Sclerosis

Christopher Cabib¹, Sara Llufrú², Eloy Martínez-Heras², Albert Saiz², Josep Valls-Solé^{1*}

1 EMG Unit, Neurology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain, IDIBAPS (Institut d'Investigació Augustí Pi i Sunyer), Facultat de Medicina, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Center for Neuroimmunology, Neurology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain, IDIBAPS (Institut d'Investigació Augustí Pi i Sunyer), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

Brain lesions in patients with multiple sclerosis may lead to abnormal excitability of brainstem reflex circuits because of impairment of descending control pathways. We hypothesized that such abnormality should show in the analysis of blink reflex responses in the form of asymmetries in response size. The study was done in 20 patients with relapsing-remitting multiple sclerosis and 12 matched healthy subjects. We identified first patients with latency abnormalities (AbLat). Then, we analyzed response size by calculating the R2c/R2 ratio to stimulation of either side and the mean area of the R2 responses obtained in the same side. Patients with significantly larger response size with respect to healthy subjects in at least one side were considered to have abnormal response excitability (AbEx). We also examined the blink reflex excitability recovery (BRER) and prepulse inhibition (BRIP) of either side in search for additional indices of asymmetry in response excitability. Neurophysiological data were correlated with MRI-determined brain lesion-load and volume. Eight patients were identified as AbLat (median Expanded Disability Status Scale–EDSS = 2.75) and 7 of them had ponto-medullary lesions. Nine patients were identified as AbEx (EDSS = 1.5) and only 2 of them, who also were AbLat, had ponto-medullary lesions. In AbEx patients, the abnormalities in response size were confined to one side, with a similar tendency in most variables (significantly asymmetric R1 amplitude, BRER index and BRIP percentage). AbEx patients had asymmetric distribution of hemispherical lesions, in contrast with the symmetric pattern observed in AbLat. The brainstem lesion load was significantly lower in AbEx than in AbLat patients ($p=0.04$). Asymmetric abnormalities in blink reflex response excitability in patients with multiple sclerosis are associated with lesser disability and lower tissue loss than abnormalities in response latency. Testing response excitability could provide a reliable neurophysiological index of dysfunction in early stages of multiple sclerosis.

Citation: Cabib C, Llufrú S, Martínez-Heras E, Saiz A, Valls-Solé J (2014) Abnormal Control of Orbicularis Oculi Reflex Excitability in Multiple Sclerosis. PLoS ONE 9(8): e103897. doi:10.1371/journal.pone.0103897

Editor: Pablo Villoslada, Institute Biomedical Research August Pi Sunyer (IDIBAPS) - Hospital Clínic of Barcelona, Spain

Received: January 14, 2014; **Accepted:** July 7, 2014; **Published:** August 1, 2014

Copyright: © 2014 Cabib et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors acknowledge the financial support from Fundació TV3 Grant 110930 to J. V. -S. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: jvalls@clinic.ub.es

Introduction

Although the available criteria for the diagnosis of multiple sclerosis do not require neurophysiological testing [1], many aspects of the disease can be shown mainly or solely using neurophysiological studies [2,3,4,5,6,7,8,9,10]. This is the case, for instance, with some forms of hyperactivity, such as the well-known facial myokymic discharges likely due to ectopic generation of activity in demyelinating perinuclear lesions [11,12] and other neurophysiological manifestations of altered excitability in brain, brainstem or spinal cord [13,14,15]. Altered excitability may be due to focal axonal damage or to alterations in the descending inhibitory control. The latter may be reflected in the analysis of brainstem reflex circuits, known to be susceptible to dysfunctions in supranuclear structures such as in the basal ganglia [16,17,18] or in the cerebral cortex [19,20,21].

The most common brainstem reflex is the trigeminal blink reflex (TBR), mediated by trigemino-facial ponto-medullary-circuits [22,23,24,25,26,27]. Median nerve electrical shocks can also induce blink reflexes [28,29], i.e., the somatosensory blink reflex (SBR), which afferent circuit is different from that of the trigeminal

input and, therefore, permits the assessment of non-trigeminal brainstem circuits that end up activating facial motoneurons [30]. The prevalence of TBR abnormalities in patients with multiple sclerosis varied between 26% and 78% in the pre-MRI era [31,32,33,34], and ranged from 40% [35] to 91% [36] in the few studies performed in correlation with MRI data. However these observations were always based on assessment of response latency, while the relevance of abnormalities in response size has not been studied so far.

The size of a reflex response is derived from the number of motoneurons activated after synaptic input. Therefore, once other variables are controlled, response size would reflect the level of motoneuronal excitability. In the case of the TBR, the fact that the *orbicularis oculi* (OOc) responses are generated in both sides to a unilateral stimulus helps in the assessment of asymmetries in the modulatory control. The R2 ipsilateral to the stimulation side is usually larger than the contralateral (R2c) response, i.e., the R2c/R2 ratio is lower than 1 [37,38,39,40]. Therefore, the finding of the opposite pattern, i.e., that the R2c is larger than the R2 (R2c/R2 ratio larger than 1), may indicate, in the appropriate context, an enhancement of motoneuron excitability in the side where the

larger R2c response is recorded [41]. Other forms of reflex excitability assessment are the blink reflex excitability recovery (BRER), examined by using pairs of stimuli at variable inter-stimuli intervals [42,43], and the blink reflex inhibition by a prepulse (BRIP), examined by measuring the inhibition caused in the R2 response of the TBR by a conditioning low intensity stimulus of any sensory modality [44,45,18,46]. Abnormal BRER is usually indicative of altered excitability in trigemino-facial interneurons [47,48,40], whereas an abnormality in BRIP should indicate lack of inhibitory control of sensory inputs in subcortical circuits [49,50,18,51].

We hypothesized that patients with multiple sclerosis should present with an abnormal brainstem reflex excitability due to deranged modulatory influences from supranuclear centers, and that because of the often random distribution of brain lesions, such excitability abnormalities will likely be asymmetric. Therefore, we applied a battery of tests to measure excitability of OOC reflex circuits of either side in a homogeneous cohort of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis and examined the possible correlation of such dysfunction with MRI data.

Materials and Methods

The study was carried out in 20 patients with confirmed diagnosis of relapsing-remitting multiple sclerosis [1], who were prospectively selected from the outpatient Clinic of the Hospital Clinic of Barcelona. They were recruited for the study if they were ambulatory, had low to moderate scores on the Expanded Disability Status Scale (EDSS, 0 to 6.0) [52], were under stable immunomodulatory treatment and relapse and steroid-free for at least one month prior to inclusion. They were 12 women (57%), and the majority were right-handed (18 patients, 86%). The mean age of the group was 37+/-7 years (range from 27 to 53 years) and their mean disease duration was 9.7 years (ranging from 2 to 21 years). We also studied 12 age and sex matched healthy subjects, who served as the control group. Their mean age was 36+/-8 years, ranging from 26 to 52 years. Seven (58%) were women. Ten (83%) were right-handed. The Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona approved the study and all participants gave written informed consent.

All patients underwent a complete neurological exam, including motor and sensory domains and paying special attention to eventual disorders of cranial nerves. Data gathered included the EDSS and Brainstem Function System to assess physical disability.

For the neurophysiological testing, subjects were lying relaxed on an examination bed, in a quiet and dimly lit room at ambient temperature. Healthy subjects and patients underwent the same neurophysiological tests. All tests were done with either a MYSTRO5Plus electromyography (Vickers Medical, Surrey, UK) or a KeyPoint Net Electromyograph (Alpine Medical Instruments, USA), set with the exact same parameters for recording and stimulation. A brain and brainstem magnetic resonance imaging study was done for a correlation between neurophysiological abnormalities and neuroimage lesions.

TBR and SBR

We used surface silver/silver chloride 9-mm diameter recording electrodes, attached over the OOC in both sides with active electrode over the middle part of the lower eyelid and the reference at the lateral cantus of the eye. To examine the TBR, stimulating electrodes were attached over the supraorbital nerve, the active at the supraorbital fossa and the reference 3 cm apart on the frontal surface. The stimulus intensity was set to elicit a stable R2, usually about 4-6 times the sensory perception threshold. The

stimulus duration was 0.2 ms. Interstimuli intervals were at least 10-20 seconds. The band pass frequency filter was set at 20-2000 Hz. We obtained 5 responses in both sides to unilateral single stimuli applied to either side. To examine the SBR, a surface bipolar stimulator was attached to the ventral aspect of the wrist over the median nerve and single stimuli were applied without warning, the stimulus intensity being high enough to induce a clear twitch in the thenar muscles. OOC responses were obtained ipsilaterally to the stimulus applied to either side.

Response latency was measured from stimulus artifact to onset. Response size was measured as peak to peak amplitude for the R1 and as area for the R2, R2c and SBR. Area was measured in $\mu\text{V} \times \text{ms}$, using the automated system of the electromyograph. For the TBR, data from each individual were averaged to obtain the mean and SD values out of the 5 responses to each stimulus side. In the case of the SBR, though, because of its fast habituation [30], only the response to the first stimulus was used for measuring. In case of absent responses, we did not introduce latency values while we entered 0 for the area value.

BRER and BRIP

BRER was assessed by applying pairs of supraorbital nerve stimuli (conditioning and test) of the same intensity as used for the TBR, at intervals of 100, 200, 300, 400, 500 and 600 ms. Prepulse inhibition was examined using electrical prepulses applied to the index finger 100 ms before a supraorbital nerve electrical stimulus [53,46]. The prepulse was a low intensity stimulus (usually less than 2 times the sensory perception threshold), which was noticed but unable to generate reflex responses on its own. Both, BRER and BRIP were tested in three consecutive trials. Responses were recorded from the OOC to ipsilateral stimuli in both sides. In BRER, we measured the size of the R2 response to the test stimulus as a percentage of the R2 response to the conditioning stimulus and expressed this value as a function of the interstimulus interval to build the excitability recovery curve. In BRIP, we measured the area of the R2 response in trials with prepulse and expressed its value in percentage of the mean R2 area obtained in trials without prepulse.

Neurophysiological data analysis

We first analyzed the blink reflex data on response latency to identify patients that could show coincidental MRI focal lesions affecting the brainstem pathways involved in these responses. After that, we analyzed the blink reflex data on response size to test the hypothesized abnormalities in brainstem reflex excitability.

Response latency. To establish whether or not unilateral response latency values for R1, R2, R2c and SBR were abnormal, we used reference normative values obtained from our healthy subjects, which did not differ from those previously published elsewhere from our own laboratory [54,30]. For the TBR, the reference values were 12.8 ms for R1, 38 ms for R2 and 40 ms for R2c. We also considered abnormal inter-side differences larger than 1.5 ms for R1 and 5 ms for R2, as well as a difference between R2 and R2c larger than 8 ms. For the SBR, we only considered that the patient had an abnormal SBR when latencies were beyond the cut-off value for healthy subjects (66.7 ms) [30], or when the response was consistently absent in one side and present in the other. Patients who fulfilled any of the above criteria were identified as the group of patients with abnormalities in blink reflex response latency (AbLat), to differentiate them from patients with no latency abnormalities (no-AbLat). AbLat patients were further analyzed in accordance to the pre-defined patterns described by Aramideh *et al.* [55]: An afferent pattern was considered when a delayed latency or an absent response of both

R2 and R2c was found to unilateral stimulation. An efferent pattern was considered when a delayed or absent R2 response was present in one side to stimulation of either side. A commissural pattern was considered when the R2c was significantly delayed or absent, with normal R2 responses. Finally, a mixed pattern was defined when any of the above conditions were combined or a significant delay was found only in the R1.

Response size and excitability tests. For the analysis of the OOC response size, we first calculated the R2c/R2 ratio by dividing the response area of the R2c by that of the R2 to unilateral stimuli for either side. Therefore, we obtained the R2c/R2 ratio for right and left sides in each subject. We also averaged the values of the R2 area obtained in the same OOC muscle by stimulation of either side, i.e., the value of the R2 response obtained to ipsilateral stimulation was averaged with the value of the R2c response obtained to contralateral stimulation. The inter-side differences for both, the R2c/R2 ratio and the R2 area, were calculated in each subject. Data from healthy subjects were used to determine the cut-off reference values (mean \pm 2 SD) for the absolute values and the inter-side differences in the two measures of OOC response size.

We considered that patients who exceeded the normal cut-off limits, coinciding in the same side for both measures of response size, had abnormally enhanced blink reflex excitability in that side (AbEx). These were differentiated from the patients with no significant increase in OOC response size (no-AbEx). From the analysis of inter-side differences, we determined that the side with larger OOC response size had a relative excitability enhancement with respect to the side with smaller response size. Figure 1 shows an example of asymmetric OOC response size, compatible with a unilateral enhancement of excitability in the left side, taken from a representative patient.

In addition, we characterized further the abnormality by measuring the response size and the inter-side difference for the data gathered from the R1 and the SBR. Since the R1 and the SBR engage the activation of facial motoneurons by inputs from different sources, we considered that larger responses in the side with larger R2c would suggest a relevant contribution of enhanced motoneuronal excitability to the asymmetry in response size seen in AbEx patients.

We examined BRER separately by side in search for possible asymmetries in trigemino-facial reflex excitability. Then, we examined the possible correlation between the findings on BRER and the asymmetries in response size to determine whether there was a unilateral increase or decrease on brainstem excitability. For individual categorization of abnormalities, we considered abnormal the presence of a response to the test stimulus larger than 30% of the response to the conditioning stimulus at intervals of 300 ms or shorter [42,67]. To simplify the data analysis in a single value suitable for group comparison, we just added up the percentage recovery at each interval for each subject to obtain the BRER index. We calculated the mean BRER index for each stimulation side for healthy subjects and patients. We considered that a BRER index abnormally larger in the side of the larger OOC response would mean that there was a relevant contribution of brainstem interneuronal excitability enhancement to the asymmetric response size seen in AbEx patients.

For BRIP, we also calculated the percentage inhibition separately for each side to evaluate somatosensory modulation of blink reflex excitability. We considered that an abnormally smaller BRIP percentage in the side of the larger OOC response would suggest a relevant contribution of an abnormal inhibitory effect of somatosensory inputs to account for the asymmetric response size seen in AbEx patients.

MRI protocol and image analysis

A 3T Siemens Trio MRI scanner (Erlangen, Germany), with a 32 channel head coil, was used to obtain the following sequences: a) A 3D T1-weighted MPRAGE (Magnetization Prepared Rapid Acquisition Gradient Echo) sequence: Repetition Time (TR): 2050 ms, Echo Time (TE): 2.4 ms, Inversion recovery time (TI): 1050 ms, Flip angle: 9°, FOV: 220 mm. b) T2-weighted sequence are usually only viable option in 2D mode (3 mm slice of thickness), TR: 3200 ms, TE: 105 ms, Flip angle: 135°, FOV: 250 mm and c) Sagittal 3D-FLAIR sequence with the same resolution of 3D T1-MPRAGE, TR:5000 ms, TE: 396 ms, TI: 1800 ms, FOV: 220 mm. In patients, a careful visual examination of the brainstem in all the sequences was performed to identify lesions in midbrain and particularly in the ponto-medullary area by a neurologist (SL) blinded to the results of the neurophysiological tests.

Individual white matter lesion masks were generated manually on the 3D T1-MPRAGE sequence using ITK-SNAP and the whole-brain lesion volume was obtained for each patient. The volumetric segmentation of supratentorial tissue and brainstem was performed on the T1-MPRAGE data sets using the Freesurfer image analysis suite (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>). In patients, lesion refilling was used to avoid misclassification of white matter lesions and all the images were checked for errors and edited manually when necessary after the automatic segmentation processes. The complete topography of supratentorial tissue included all brain except cerebellum and brainstem, and the volume of each region was calculated and normalized for the intracranial volume. The supratentorial brain volume was obtained separately for each hemisphere, and we also obtained the whole brainstem volume. Subsequently, the volume of lesions in each side of the supratentorial tissue and in the brainstem was defined incorporating the lesion masks.

On the basis of supratentorial and brainstem lesion load and its distribution, a lesion probability map was created for each subgroup of patients. To do so, the lesion masks from each patient were normalized to the standard space using the FMRIB non-linear registration tool in FSL (Analysis Group, FMRIB, Oxford, UK). In the lesion probability map each voxel value can be thought of as an estimate of the probability that any subject of that subgroup has a lesion at that location.

Statistical analysis

From the analysis of data, patients were separated in AbLat and no-AbLat, according to response latency, and in AbEx and no-AbEx, according to response size, for correlation with MRI findings. Parametric data were analyzed with one-way ANOVA. The 2X2 correlation test was used to examine differences in data distribution. Spearman's test was employed for correlations. Statistical significance was set on $p < 0.05$. The Bonferroni's correction was used when necessary.

Results

The median EDSS of the patients was 2.0 (range between 0 and 5.5), while the median on the Brainstem Funcional System score was 0.5 (range between 0 and 3.0). Eight patients (40%) had a past history of attacks affecting the trigeminal or facial nerves (Table 1). Neurological signs or symptoms of brainstem involvement were present in 4 patients (patient 1 with facial hypoesthesia, patient 5 with facial weakness, and patients 12 and 20 with facial myokymia). Myokymia was also present in patient 4, with no previous clinical history.

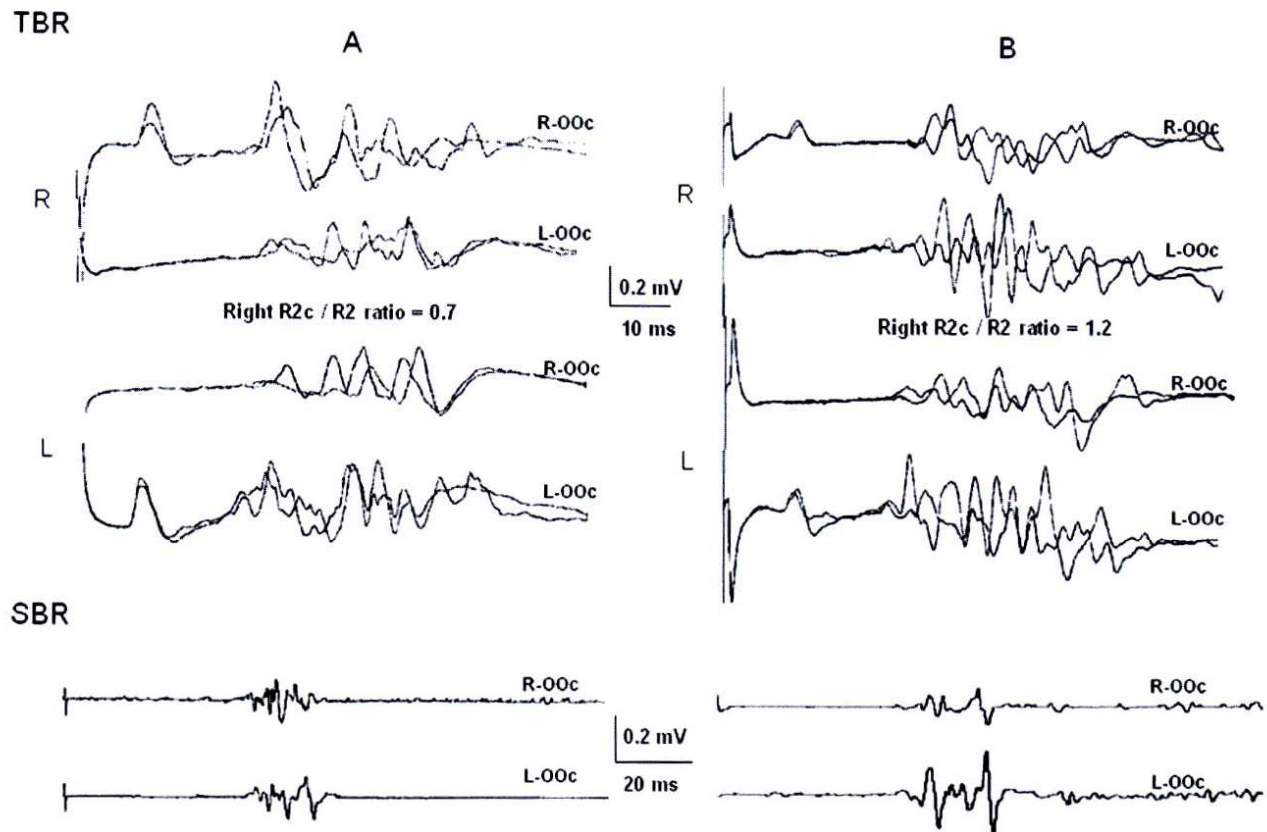


Figure 1. Blink reflexes in a multiple sclerosis patient showing a unilateral enhancement of excitability (AbEx). Recordings from bilateral *orbicularis oculi* (OOc; R = right and L = left) of the trigeminal (TBR) and the somatosensory blink reflexes (SBR). The graphs at the top of the figure (TBR) show both unilateral/early response (R1), and bilateral/late responses (R2 and R2c), to stimulation of the supraorbital nerve (SON) of either side (two traces are superimposed). The graphs at the bottom of the figure (SBR) show ipsilateral OOc responses to median nerve stimuli. The recordings of a healthy subject (A) are shown in the left side of the figure, and those corresponding to a representative patient with enhanced R2c/R2 ratio (AbEx, B) are shown in the right side. Note that the R2c is larger than the R2 to stimulation of the right SON in the patient but not in the healthy subject, i.e., the R2c/R2 ratio is below 1 in the healthy subject and above 1 in the patient. Note also the similar size of the SBR in responses of both sides in the healthy subject and the clear inter-side difference in the patient, who had a larger response in the left side (coincident asymmetry with the R2c/R2 ratio). Coincident enhanced unilateral OOc responses from both trigeminal and median nerve stimulation suggest left facial motoneuronal excitability enhancement. doi:10.1371/journal.pone.0103897.g001

Response latency

Mean values for response latency obtained after pooling together all patients were within normal limits for the TBR (R1 = 12.5+/-2.5 ms; R2 = 35.5+/-4.9 ms, R2c = 37.2+/-5.1 ms) and for the SBR (55.6+/-8.7 ms). However, the analysis of individual TBR responses identified 8 AbLat and 12 no-AbLat patients, as listed in Table 1. Four patients had an afferent pattern, 1 had an efferent pattern, 1 had a commissural pattern and 2 had a mixed pattern. The SBR was delayed in three patients. The delay was limited to the left side in patient number 1, who had a left side efferent pattern in the TBR. It was bilateral in patient number 10, who had a left side afferent pattern, and patient number 13, who had a mixed pattern. The SBR was absent in 2 AbLat and in 2 no-AbLat patients. Four of the 8 AbLat patients have had previous attacks involving the trigemino-facial area (patients 1, 3, 5 and 16) and clinical signs remained in 2 of them (patients 1 and 5).

The brain MRI showed brainstem lesions in all patients with AbLat, with hyperintense lesions on the T2-weighted sequence in the ponto-medullary area in 7 and in the midbrain in 7 patients as well (6 patients had lesions in both sites). The frequency of MRI

lesions in the ponto-medullary area was significantly higher in AbLat patients (7 out of 8 patients; 87.5%) than in no-AbLat patients (3 out of 12 patients; 25%) (chi square, χ^2 , $p = 0.006$). Figure 2 shows neurophysiological recordings from patient number 13, who had a mixed pattern of abnormalities, and an MRI showing bilateral brainstem lesions located mainly in the pons tegmentum.

Response size and excitability tests

R2c/R2 ratio and R2 area. The overall mean value of the R2c/R2 ratio was not significantly different between healthy subjects (0.815+/-0.093) and patients (0.809+/-0.302; ANOVA, $F[1,30] = 0.005$, $p = 0.947$). No differences were either found between both groups for the overall R2 area mean value (4707.1+/-2864.3 $\mu\text{V} \times \text{ms}$ for healthy subjects and 5285.4+/-2767.2 $\mu\text{V} \times \text{ms}$ for patients; $F[1,30] = 0.638$, $p = 0.427$).

Figure 3 shows the values for the R2c/R2 ratio and for the R2 area calculated on either side of patients and healthy subjects. In the great majority of healthy subjects (91.7%), a unilateral stimulus gave rise to a larger R2 than R2c response (R2c/R2 ratio lower than 1). No patient had a bilateral enhancement of the R2c/R2

Table 1. Clinical, neuroimage and neurophysiological signs of brainstem involvement in all study patients.

Case ^a	Facial symptoms/signs		Brainstem MRI	Blink reflex (latency)	
	Past episodes	Current complaints	Lesion site	TBR	SBR
1	facial hyposthesia (R)	hyposthesia (R)	midbrain; pons; medulla	efferent (L) ^b	delayed (L)
2	none	none	pons; medulla	normal	normal
3	facial hyposthesia (L)	none	midbrain	afferent (L) ^b	normal
4	none	myokymia (R)	midbrain	normal	normal
5	facial weakness (R)	mild paresis (R)	midbrain; pons; medulla	commisural (R) ^b	normal
6	facial weakness (R)	none	midbrain	normal	absent (B)
7	none	none	none	normal	normal
8	none	none	midbrain; pons; medulla	afferent (R) ^b	absent (B)
9	facial hyposthesia (L)	none	none	normal	normal
10	none	none	midbrain; pons; medulla	afferent (L) ^b	delayed (B)
11	none	none	midbrain	normal	normal
12	facial weakness (L)	myokymia (L)	none	normal	normal
13	none	none	pons; medulla	mixed (B) ^b	delayed (B)
14	none	none	none	normal	normal
15	none	none	none	normal	normal
16	facial hyposthesia (B)	none	midbrain; pons; medulla	afferent (R) ^b	normal
17	none	none	none	normal	normal
18	none	none	pons; medulla	normal	normal
19	none	none	midbrain; pons; medulla	mixed (B) ^b	absent (B)
20	facial paresthesias (L)	myokymia (L)	midbrain; pons; medulla	normal	absent (B)

Abbreviations: TBR = trigeminal blink reflex; SBR = somatosensory blink reflex; R = right; L = left;

B = bilateral refer to the side of the involvement.

^aPatient's identification number (in alphabetical order).

^bPatients included in the AbLat group (see text for description of each TBR pattern).

doi:10.1371/journal.pone.0103897.t001

ratio. In 9 patients, the R2c/R2 ratio exceeded the normal upper cut-off in one side (e.g. Fig.1B), showing larger inter-side differences than healthy subjects (Fig. 3B). Two of these 9 patients had also delayed OOc latencies (marked with an asterisk in the same figure).

Only two patients had a R2 area mean value exceeding the normal upper cut-off for one side only, while a significant increase in R2 area inter-side difference was found in 8 patients (Fig. 3D). Taking together the abnormalities in the R2c/R2 ratio and the R2 area, 9 out of 20 patients (45%) fulfilled the criteria for AbEx (all of them having an enhancement of the R2c/R2 ratio). From the remaining 11 no-AbEx patients, 2 exceeded the cut-off values only in one parameter (both being AbLat) and the other 9 patients had no abnormalities in the analysis of the response size.

R1 and SBR. Table 2 shows all data related to response size gathered from healthy subjects and AbEx and no-AbEx patients. The mean R1 amplitude values were not different for the three groups of subjects (ANOVA; $F[2,29] = 2.625$, $p = 0.09$). However, there were significant differences in the mean R1 inter-side difference ($F[2,29] = 5.507$, $p = 0.01$), which was found larger in AbEx patients than in healthy subjects in the *post-hoc* analyses ($p = 0.008$). In patients with AbEx, the R1 amplitude was statistically significantly larger in the side with larger OOc responses than in the contralateral side (paired t-test, $p = 0.001$). An inter-side difference value beyond the cut-off limits from healthy subjects was observed in 5 AbEx patients coinciding with the side of larger OOc response size.

The SBR could not be elicited bilaterally in 2 out of the 12 healthy subjects (16.7%) and in 4 out of the 20 patients (20%), a non-significant difference (χ^2 , $p = 0.9$). The mean value of SBR area was not significantly different among the three groups ($F[2,29] = 1.295$; $p = 0.290$). Similarly, the inter-side difference was not significantly different among groups ($F[2,29] = 2.006$; $p = 0.153$). However, we still compared the SBR area between sides in the group of AbEx patients with a paired t-test, reaching close to significance ($p = 0.063$). An inter-side difference value beyond the cut-off limits from healthy subjects was found in 5 AbEx patients and in 2 no-AbEx patients.

BRER and BRIP. Healthy subjects showed the expected inhibition of the R2 to the test stimulus at short interstimuli intervals, with a 4.4% (SD = 5.8%) recovery at the interval of 300 ms and 48.1% (SD = 20.1%) at the interval of 600 ms. There were no differences among groups for the mean BRER index values (Table 2; $F[2,29] = 0.873$, $p = 0.429$), although two AbEx patients (number 1 and 6) showed enhanced BRER absolute values at the interval of 300 ms. However, inter-side differences on the BRER index fell beyond the cut-off reference values in 6 AbEx patients, who had relative enhancement of the BRER in the side where the OOc responses were larger. ANOVA showed a significant effect of group on inter-side BRER index difference ($F[2,29] = 8.536$, $p = 0.001$), with significantly larger values in AbEx patients than in no-AbEx patients or healthy subjects (*post-hoc* Bonferroni test, $p = 0.002$). Figure 4 shows an example of BRER differences in one AbEx patient. Only one no-AbEx patient had an increase inter-side difference in the BRER index (number 13).

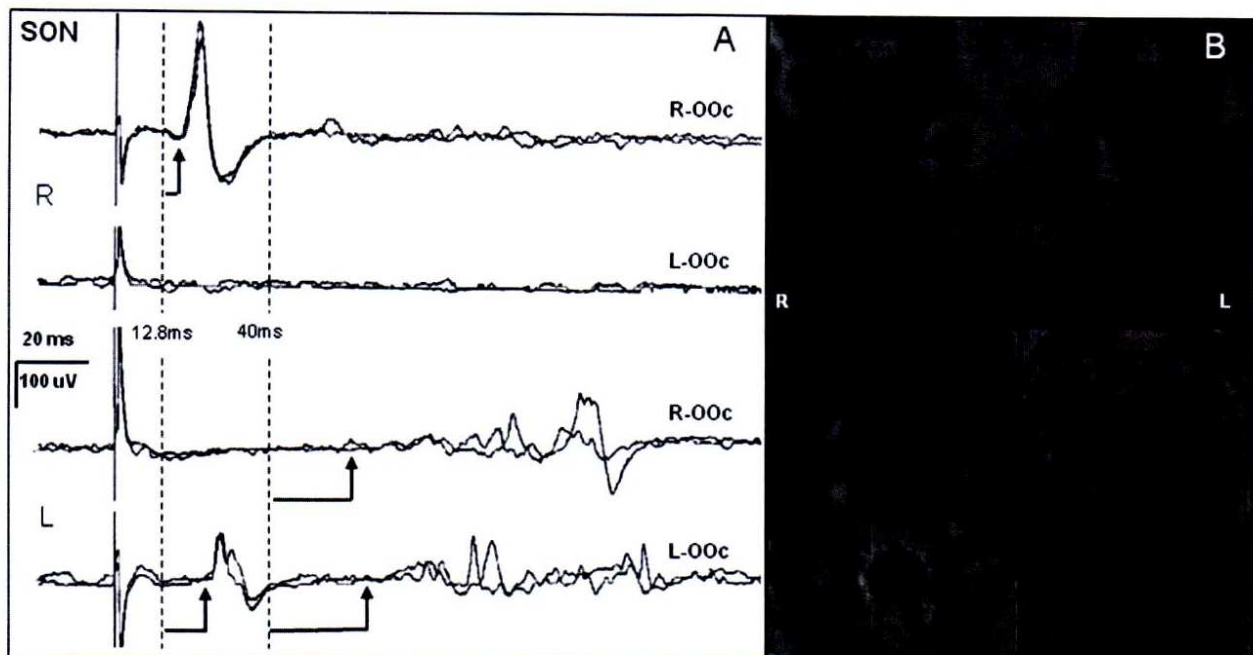


Figure 2. Trigeminal blink reflex and brainstem MRI of a patient with AbLat (n° 13). In **A** (left), orbicularis oculi (OOc) responses in both sides (R=right and L=left) are recorded after bilateral supraorbital nerve stimulation (SON, R=right, L=left; two traces are superimposed). Vertical dashed lines indicate the normal upper cut-off values for the latency of R1 and R2 responses and arrows indicate response onset. Note the delay in response latency for R1 in both sides and for the R2 and R2c to L-SON stimulation while these responses could not be obtained to R-SON (mixed pattern). In **B** (right), relevant MRI images from this patient are shown: coronal T1-MPRAGE (upper), axial FLAIR (lower left) and T2-weighted (lower right) images show evidence for multiple bilateral lesions in the pons. doi:10.1371/journal.pone.0103897.g002

The mean percentage BRIP was significantly different among the three groups ($F[2,29] = 3.967$, $p = 0.030$). The *post-hoc* analysis showed significantly lower BRIP in AbEx patients than in healthy subjects ($p = 0.028$), with no differences between healthy subjects and no-AbEx patients. There were also significant differences in inter-side BRIP values ($F[2,29] = 12.726$, $p < 0.001$), with a *post-hoc* analysis showing significantly larger values in AbEx patients than in healthy subjects and no-AbEx patients ($p < 0.001$ for both comparisons). The lower cut-off value calculated from data in healthy subjects was 84.7%, which situated 10 patients out of the normal range, 7 of them being AbEx (e.g. Fig. 4).

Summary of inter-side differences. Inter-side differences coinciding with the asymmetry in the R2c/R2 ratio were present in 6 AbEx patients for R1 amplitude or SBR area, in 6 patients for BRER and in 5 patients for BRIP. Five AbEx patients had abnormalities in indices of asymmetry in 3 or more variables in addition to the enhanced R2c/R2 ratio. Only 1 AbEx patient (patient 19, who was also AbLat) had no abnormality other than the enhancement of the R2c/R2 ratio. The incidence of abnormalities in indices of response size asymmetry was significantly less in no-AbEx patients than in AbEx patients (χ^2 , $p = 0.043$).

Differences between AbLat and AbEx patients in clinical and MRI findings

The median EDSS value for AbEx patients was lower than for AbLat patients (1.5; range 0–3.0 vs. 2.75; range 0–5.5). These differences were barely significant (ANOVA, $F[1,13] = 2.837$, $p = 0.049$). The Braistern Funcional System score did not differ significantly between AbLat (median of 1.0, range 0–3.0) and

AbEx patients (median of 0, range 0–1.0; $F[1,13] = 3.318$, $p = 0.092$). Clinical signs of facial hyperactivity were referred by three patients (patients number 4, 12, and 20). Two of these patients were AbEx (4, 12) and none was AbLat. They all described tiny superficial periocular movements (i.e., myokymia) that, in 2 of them, showed as motor unit action potentials and bursts of interference pattern in surface EMG recordings. Repetitive short bursts of action potentials, resembling a myokymic discharge was indeed seen in patient number 9 who was also AbEx (Fig. 4D).

In the MRI analysis, patients with AbLat had more frequent brainstem lesions than patients with AbEx (Table 1, Fig. 5). The two patients presenting with both, AbLat and AbEx (patients 1 and 19) showed ponto-medullary hyperintensity lesions, as did also 5 other AbLat patients while this was not the case in the remaining 7 AbEx patients. AbLat patients showed significantly higher brainstem lesion load than AbEx patients ($F[1,13] = 5.402$, $p = 0.040$). Other comparisons between the two groups on MRI data did not reach statistical significance (Table 3). However, the map representing the probability of lesion distribution at a supratentorial level showed a diffuse and symmetric pattern in AbLat patients and an asymmetrical distribution of lesions in AbEx patients (Figure 5).

Discussion

The typical neurophysiological observation in patients with multiple sclerosis is an altered conduction time in central sensory or motor tracts. This is the case with the somatosensory, auditory or visual evoked potentials, which may be delayed in correspondence with the presence of demyelinating lesions along the

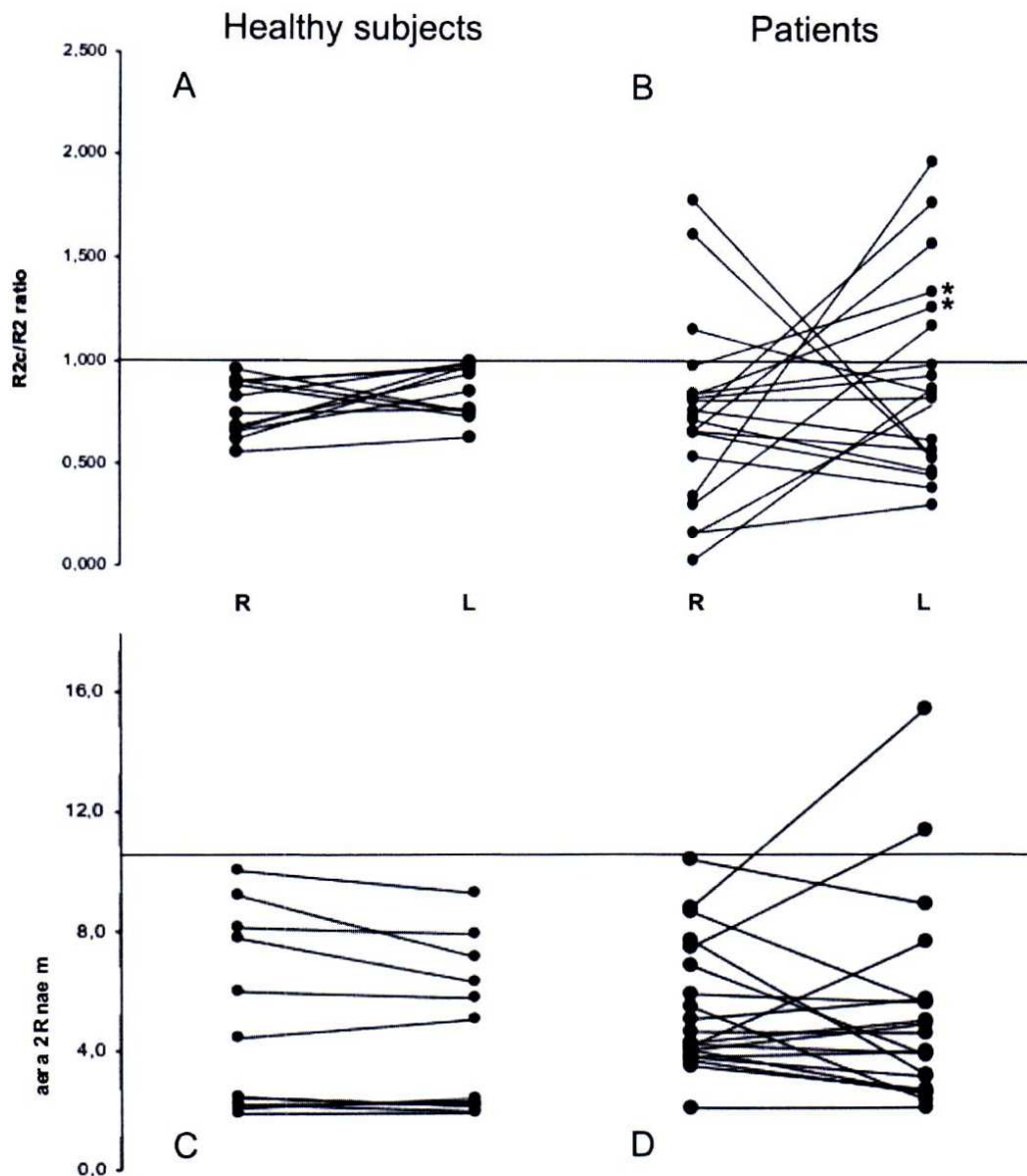


Figure 3. Graphical representation of values for right and left side R2c/R2 ratios (upper graphs) and mean R2 area ($\mu\text{V} \times \text{s}$; lower graphs) in healthy subjects and patients with multiple sclerosis. The individual values for right (R) and left (L) sides are tied by a line to highlight the degree of between-sides asymmetry. Horizontal dashed lines indicate the normal upper cut-off values for both response size parameters. Note that healthy subjects show relatively more symmetrically distributed values with respect to patients for both the R2c/R2 ratio and the mean R2 area. A unilateral R2c/R2 ratio value above 1 was observed in 9 patients (lines reaching above 1 in panel B). Only 2 AbLat patients had a single value above 1 in the R2c/R2 ratio (marked with asterisks in B). Although no differences on the distribution of the mean R2 area values were apparent between both groups (lower graphs), 8 patients had a significant increase in the inter-side difference which was coincident with a unilateral enhancement on the R2c/R2 ratio (AbEx patients). These 8 subjects are identified in panel D because of their steeper slope in the inter-side. doi:10.1371/journal.pone.0103897.g003

respective sensory paths [56,57,31,4,58]. We have indeed found a delay in latency of the OOc reflex responses to trigeminal stimuli, a finding already reported in the pre-MRI era [31,33,59,34], which is likely to indicate focal lesions. However, the main finding in our study is the observation of abnormalities in the excitability of the trigemino-facial reflex circuits, an observation that has not been previously reported in multiple sclerosis. It is known, though, that a focal lesion in neural tissue may manifest in abnormal function of distant circuits and a change in reflex excitability might be a marker of such functional disorder [19,21]. There are only a

few published reports that show blink reflex abnormalities in patients with multiple sclerosis attributed to lesions at supranuclear level [36]. After our assessment of excitability in OOc responses, we identified a particular subpopulation of patients with enhanced excitability (AbEx) that, in comparison to patients with abnormalities in response latency (AbLat), were less disabled and had lower tissue loss, suggesting that this abnormality take place at earlier stages of the disease.

Table 2. Data on response size calculated in healthy subjects and in patients categorized as AbEx and no-AbEx.

Subjects	R2/R2 ratio	R2 area ($\mu\text{Vx ms}$)	R1 amp. (μV)	SBR area ($\mu\text{Vx ms}$)	BRER index	BRIP (%)
HS						
Mean	0.815	4707.1	165.1	1716.0	92.4	94.1
(SD)	(0.093)	(2864.3)	(79.1)	(1061.1)	(33.7)	(4.7)
Side-to-side Δ^a	0.170	546.8	31.8	424.8	13.2	3.4
(SD)	(0.107)	(616.7)	(29.7)	(410.5)	(7.2)	(3.0)
Cut-off	0.384	1780.3	91.2	1245.8	27.6	9.4
Mean	1.071**	6270.0	241.7	1628.0	84.8	73.3*
(SD)	(0.149)	(3259.6)	(66.9)	(1839.4)	(66.8)	(28.4)
Side-to-side Δ^a	0.884**	2767.7**	111.2*	1148.0	33.6*	30.5**
(SD)	(0.444)	(1934.1)	(63.7)	(1220.6)	(15.7)	(23.4)
Mean	0.594*	4479.9	182.5	939.8	65.3	86.8
(SD)	(0.207)	(2027.2)	(81.9)	(611.0)	(44.2)	(19.3)
Side-to-side Δ^a	0.249	1007.9	63.2	644.8	17.0	5.6
(SD)	(0.254)	(1271.4)	(61.8)	(708.4)	(11.2)	(6.3)

Abbreviations: HS = healthy subjects; AbEx = patients with asymmetric response size and suspected abnormal excitability;

no-AbEx = patients that did not fulfill the criteria for AbEx; SBR = somatosensory blink reflex;

BRER = blink reflex excitability recovery; BRIP = blink reflex inhibition by a prepulse; R1 amp. = amplitude of R1.

The individual's mean values (from right and left sides) on each response size measure were averaged for group comparison.

*Arithmetic difference between sides (right and left) on each response parameter. **Significant differences ($p < 0.05$)

found in a subgroup of patients with respect to HS. ** Statistically significant differences found in AbEx patients with respect to both HS and no-AbEx patients.

doi:10.1371/journal.pone.0103897.t002

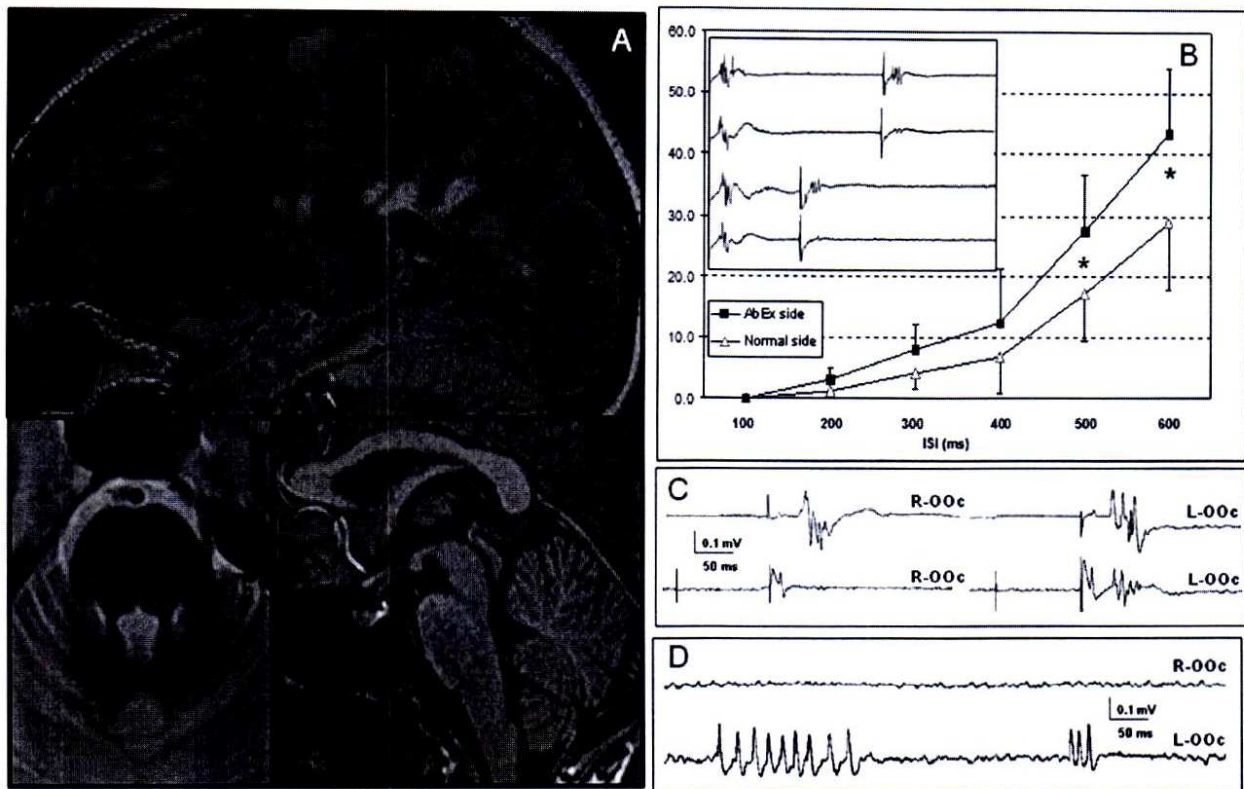


Figure 4. Blink reflex excitability abnormalities and brain MRI in a representative AbEx patient (n° 9). In **A**, supratentorial demyelinating lesions are identified (sagittal FLAIR sequence, upper image) in absence of brainstem lesions (axial T2-weighted and sagittal T1-MPRAGE sequences, lower images). In the inserted figure (**B**), significant individual differences on BRER can be observed between the side with largest OOC response size (AbEx side; first and third traces) and the contralateral side (normal side; second and fourth traces) at the 600 (upper traces) and 300 milliseconds-ISIs (lower traces). In **C**, the BRIP was examined on both *orbicularis oculi* (OOC; R= right and L= left) to ipsilateral prepulses. Upper traces show the R1 and R2 responses obtained to ipsilateral supraorbital nerve (SON) stimulus without a prepulse. In lower traces, normal inhibition of the R2 response to a somatosensory prepulse delivered 100 ms before is only observed in the right side, but not in the left. In **D**, bilateral OOC surface recording in the same subject showing myokymic discharges on the left side. The BRER curve of all AbEx patients (n=9) is also represented plotting the mean value (plus standard error) of each paired-stimuli interval (ISI, in milliseconds) (**B**). Data from both normal and AbEx sides (see above) were employed to build two curves. A higher mean value in the response's recovery was obtained in the side with largest OOC response size, with respect to the opposite side from 200 to 600 ms, with statistically significant differences in the 500 and 600-ISIs (marked with an asterisk, $p<0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0103897.g004

AbLat patients

From the analysis of response latency, we identified a subgroup of 8 patients with delayed latency patterns (40% of patients in our study). In most instances, the pattern of latency abnormalities was afferent but other patterns were also found in single patients. Most AbLat patients (87.5%) had evidence of MRI demyelinating lesions affecting an area of the brainstem where the trigemino-facial reflex circuit has been located [22]. The only patient in whom there were no ponto-medullary lesions that could account for the delay on the blink reflex, had still a brainstem lesion located at the level of the midbrain. Similar frequencies of abnormal latency patterns and MRI-correlation with lesions of ponto-medullary localization in patients with multiple sclerosis have been previously reported by other authors [60,61,35]. The good correlation between MRI and neurophysiological findings points to an impairment in the normal neural conduction time through the TBR pathways caused directly by a lesion in some parts of the reflex arc. Taking the MRI results as the gold standard, the finding of latency abnormalities in the TBR would have an estimated sensitivity of 70% (7 positive abnormalities in the blink reflex out of 10 patients with positive MRI signs of ponto-medullary lesions)

and an estimated specificity of 90% (9 negative observations out of 10 patients with no MRI signs of ponto-medullary lesions).

AbEx patients

We considered that, apart from latency abnormalities, patients with multiple sclerosis could have other manifestations of dysfunction in their neurophysiological data. Indeed, we found that 9 patients had abnormally asymmetric response size on the TBR (mainly evidenced by examining the R2c/R2 ratio), together with corresponding asymmetries in other responses, indicating an abnormal unilateral enhancement of reflex excitability. On the basis of our results in various tests, we can suggest the most likely mechanisms accounting for the altered excitability: In 6 patients, the abnormality in the R2c/R2 ratio was accompanied by abnormalities in R1 or SBR amplitude; in also 6 patients it was accompanied by enhanced BRER index, and in 5 patients it was accompanied by reduced BRIP percentage. These results suggest, obviously, that more than one mechanism in each AbEx subject is likely contributing to the enhanced R2c/R2 ratio. The increase in R1 or SBR amplitude suggests that enhancement in facial motoneuronal excitability could be the cause of the asymmetric

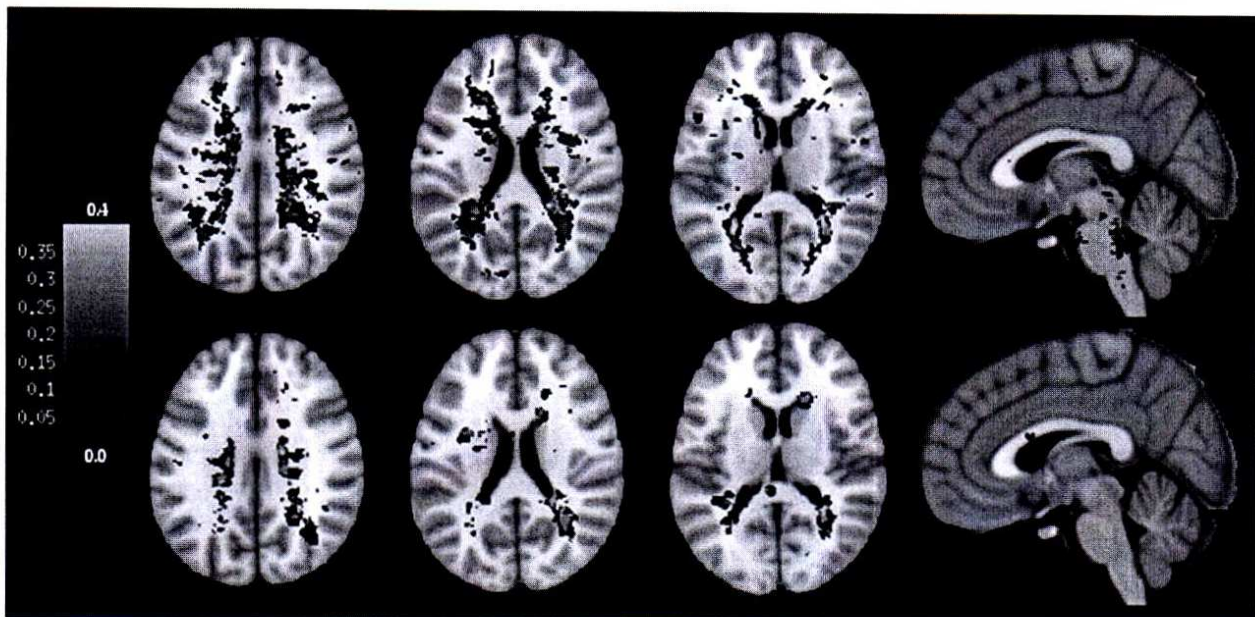


Figure 5. Lesion probability map in patients with AbLat (upper sequences) and AbEx (lower sequences). The distribution of lesions is shown at a supratentorial and brainstem level (representative sequences). In the probability map each voxel value (colored from deep blue to green) could be thought of as an estimate of the probability (from 0.0 to 0.4) that each subject of the subgroup had a lesion at that location. A different pattern of lesion distribution can be clearly distinguished between both groups. doi:10.1371/journal.pone.0103897.g005

enhancement of the R2c/R2 ratio. Similar observations were reported in patients with hemifacial spasm who had either enhanced R1 [40] or more prevalent SBR [62] in the side of the spasm. The enhancement of BRER index indicates that lack of inhibition in trigemino-facial interneurons could be contributing to the asymmetric enhancement of the R2c/R2 ratio. A shift to the left in the BRER curve, as in the side with larger R2 area in our patients, has been reported in many supranuclear disorders such as Parkinson's disease [16,17,63,43], dystonia [64,65,66,67,48,68] and others. An enhancement of BRER can also be observed as a compensatory phenomenon occurring in the non-paretic side of patients with unilateral facial weakness [69,70]. Reduced BRIP

suggests lack of inhibitory control over sensory inputs as a mechanism leading to asymmetric enhancement of the R2c/R2 ratio. Prepulse inhibition refers to the inhibition caused by a low intensity stimulus of any modality that is unable to cause a recordable response by itself but induces significant changes in the response to a subsequent suprathreshold stimulus. Prepulse inhibition has proven to be effective in startle and TBR responses [53,71]. In BRIP, as it was examined in our study, the inhibitory effect is seen on the R2 bilaterally when an inter-stimulus period beyond 70 ms is used. This effect is believed to be mediated by a circuit involving the pedunculopontine tegmental nucleus

Table 3. Data on brain volume and brain lesion-load MRI-acquired in patients with multiple sclerosis separated by the abnormalities found on the TBR.

MRI data	All patients	AbLat	AbEx	P value
	(n = 20)	(n = 8)	(n = 7)	AbLat vs. AbEx
Brain volume^a				
Total supratentorial (x10 ³)	13.49 (0.65)	13.11 (0.68)	13.77 (0.58)	0.087
Total brainstem (x10 ³)	2.64 (0.26)	2.57 (0.27)	2.82 (0.18)	0.074
Brain lesion-load^a				
Total supratentorial (x10 ³)	6.22 (7.45)	9.31 (9.40)	2.29 (2.21)	0.103
Right supratentorial	2.75 (3.60)	4.26 (4.79)	0.85 (0.80)	0.115
Left supratentorial	3.47 (3.96)	5.05 (4.71)	1.43 (1.43)	0.099
Total brainstem (x10 ³)	1.23 (1.28)	1.52 (1.43)	0.15 (0.16)	0.040

Abbreviations: TBR = trigeminal blink reflex; AbLat = patients with delayed latencies on the TBR; AbEx = patients with enhanced R2c/R2 ratio and no latency abnormalities.

^aAll data regarding to volume and lesion-load (expressed as mean and SD values in mm³) were normalized to the individual brain size using a correction factor (VSCALING).

doi:10.1371/journal.pone.0103897.t003

[72,73,74]. As far as we know, this is the first report on BRIP in patients with multiple sclerosis.

Clinical implications

We considered that an asymmetry in the control of reflex excitability would be a likely feature of early stage multiple sclerosis. Asymmetries in response size are also relatively easy to detect in neurophysiological testing. This does not mean, though, that patients not showing asymmetric excitability enhancement do not have also an abnormal descending control of brainstem reflexes. Simply, the neurophysiological exams that we carried out, the ones with more acceptable clinical applicability, may not be able to show subtle changes in excitability. Although an abnormal asymmetry could, obviously, indicate decreased excitability in one side or increased excitability in the opposite side, the fact that some patients had features of facial hyperactivity in the form of myokymia or facial spasms suggest that the abnormality was the enhancement. Myokymia has been mostly attributed to pontine perinuclear lesions [12] but segmental demyelination away from the facial nucleus has also been demonstrated [75]. AbEx was found in only 2 patients of the 8 patients in the AbLat group in comparison to the 7 AbEx patients out of the 12 no-AbLat patients. This does not mean, though, that AbLat patients were less prone to have excitability disturbance. It is possible that lesions located caudally in the reflex arc might mask the effects of more rostral lesions of supranuclear localization in pathways that carry inputs directed to the facial motoneurons, and thus, it could explain the incapacity of neurophysiological studies on blink reflexes to reveal more often asymmetries in AbLat patients. Nevertheless, AbLat patients had significantly higher brainstem lesion load and nearly significant higher hemispherical lesion load and lower supratentorial and brainstem volumes than AbEx patients, and in fact all these data fits well with the significant higher EDSS score that we found in the former group of patients.

A limitation of this study is that our methods were focused on assessment of asymmetric alterations of excitability. We obtained indices of relative inter-side differences rather than absolute measures of abnormality. We cannot determine if the asymmetry found in excitability measures was due to an abnormal decrease in

one side or an increase in the other side, although the presence of signs of hyperactivity in a few patients suggests enhancement rather than decrease. In any case, the novelty brought in by this study regards the abnormality in various indices of asymmetry of the OOC response size, which were larger in patients than in our control group of healthy subjects.

Conclusions

Our results indicate that, in a number of multiple sclerosis patients with no trigemino-facial conduction impairment, the study of response size may show abnormalities in reflex excitability, based on the evaluation of indices of asymmetry. None of the patients with TBR excitability abnormalities showed MRI evidence of lesions in the circuits known to mediate the TBR. Instead, they had an asymmetrical distribution of the supratentorial lesions, and they represent a subgroup of less disabled patients with lower lesion load and lesser tissue loss than patients who present with abnormalities in trigemino-facial reflex latency. The findings of the present study suggest that neurophysiological testing may play an important role in the assessment of the brainstem excitability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Based on the findings of this study, we should consider multiple sclerosis as a disease manifesting not only by conduction abnormalities but also by excitability abnormalities, measurable with neurophysiological means. Abnormal unilateral OOC response excitability could be a reliable neurophysiological index of dysfunction in early stages of multiple sclerosis.

Acknowledgments

We would like to thank the personnel of the Medical Imaging Platform of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) for their support with image processing.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JVS SL AS. Performed the experiments: JVS SL CC EMH. Analyzed the data: CC EMH. Contributed reagents/materials/analysis tools: EMH. Wrote the paper: CC AS JVS.

References

- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, et al. (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69:292–302.
- Conte A, Lenzi D, Frasca V, Gilio F, Giacomelli E, et al. (2009) Intracortical excitability in patients with relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol* 256:933–938.
- Gazioglu S, Boz C (2012) Ocular and cervical vestibular evoked myogenic potentials in multiple sclerosis patients. *Clin Neurophysiol* 123:1872–1879.
- Leocani L, Colombo B, Magnani G, Martinelli-Boneschi F, Corsi M, et al. (2001) Fatigue in multiple sclerosis is associated with abnormal cortical activation to voluntary movement-EEG evidence. *Neuroimage* 13:1186–1192.
- Leocani L, Rovaris M, Boneschi FM, Medaglini S, Rossi P, et al. (2006) Multimodal evoked potentials to assess the evolution of multiple sclerosis: a longitudinal study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:1030–1035.
- Llufriu S, Blanco Y, Martínez-Heras E, Casanova-Molla J, Gabilondo I, et al. (2012) Influence of corpus callosum damage on cognition and physical disability in multiple sclerosis: a multimodal study. *PLoS One* 7:e37167.
- Margaritella N, Mendozzi L, Garegnani M, Nemni R, Colicino E, et al. (2012) Exploring the predictive value of the evoked potentials score in MS within an appropriate patient population: a hint for an early identification of benign MS? *BMC Neurol* 12:80.
- Polak T, Zeller D, Fallgatter AJ, Metzger FG (2013) Vagus somatosensory-evoked potentials are prolonged in patients with multiple sclerosis with brainstem involvement. *Neuroreport* 24:251–253.
- Rosengren SM, Colebatch JG (2011) Ocular vestibular evoked myogenic potentials are abnormal in internuclear ophthalmoplegia. *Clin Neurophysiol* 122:1264–1267.
- Thickbroom GW, Sacco P, Faulkner DL, Kermode AG, Mastaglia FL (2008) Enhanced corticomotor excitability with dynamic fatiguing exercise of the lower limb in multiple sclerosis. *J Neurol* 255:1001–1005.
- Gutmann L, Hopf HC, Gutierrez A, Burton V (1993) Intrapontine generation of myokymia in multiple sclerosis. *Muscle Nerve* 16:981–982.
- Jacobs L, Kaba S, Pullicino P (1994) The lesion causing continuous facial myokymia in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 51:1115–1119.
- Caramia MD, Palmieri MG, Desiato MT, Boffa L, Galizia P, et al. (2004) Brain excitability changes in the relapsing and remitting phases of multiple sclerosis: a study with transcranial magnetic stimulation. *Clin Neurophysiol* 115:956–965.
- Rasminsky M (1981) Hyperexcitability of pathologically myelinated axons and positive symptoms in multiple sclerosis. *Adv Neurol* 31:289–297.
- Waxman SG (2001) Acquired channelopathies in nerve injury and MS. *Neurology* 56:1621–1627.
- Basso MA, Powers AS, Evinger C (1996) An explanation for reflex blink hyperexcitability in Parkinson's disease. I. Superior colliculus. *J Neurosci* 16:7308–7317.
- Basso MA, Evinger C (1996) An explanation for reflex blink hyperexcitability in Parkinson's disease. II. Nucleus raphe magnus. *J Neurosci* 16:7318–7330.
- Schicatanu EJ, Mantzouranis J, Peshori KR, Partin J, Evinger C (2002) Lid restraint evokes two types of motor adaptation. *J Neurosci* 22:569–576.
- Berardelli A, Accornero N, Cruccu G, Fabiano F, Guerrisi V, et al. (1983) The orbicularis oculi response after hemispherical damage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 46:837–843.
- Fisher MA, Shahani B, Young RR (1979) Assessing segmental excitability after acute rostral lesions: II. The blink reflex. *Neurology* 29:45–50.
- Girlanda P, Dattola R, Messina C (1984) Blink reflex in hemiplegia. *Eur Neurol* 23:221–227.

22. Cruccu G, Tannetti GD, Marx JJ, Thoenke F, Truini A, et al. (2005) Brainstem reflex circuits revisited. *Brain* 128:386–394.
23. Kimura J, Rodnitzky RL, Van Allen MW (1970) Electrodiagnostic study of trigeminal nerve. Orbicularis oculi reflex and masseter reflex in trigeminal neuralgia, paratrigeminal syndrome, and other lesions of the trigeminal nerve. *Neurology* 20:574–583.
24. Kimura J, Lyon LW (1972) Orbicularis oculi reflex in Wallenberg syndrome: Alteration of the late reflex by lesion of the spinal tract and nucleus of the trigeminal nerve. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 35:228–233.
25. Kimura J (1983) Clinical uses of the electrically elicited blink reflex. *Adv Neurol* 39:773–786.
26. Ongerboer de Visser BW, Kuypers HG (1978) Late blink reflex changes in lateral medullary lesions: An electrophysiological and neuroanatomical study of Wallenberg's syndrome. *Brain* 101:285–294.
27. Shahani BT, Young RR (1972) Human orbicularis oculi reflexes. *Neurology* 22:149–154.
28. Miwa H, Imamura N, Kogahara K, Ohori T, Mizuno Y (1995) Somatosensory evoked blink responses: findings in patients with Miller Fisher syndrome and in normal subjects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58:95–99.
29. Valls-Solé J, Cammarota A, Alvarez R, Hallett M (1994) Orbicularis oculi responses to stimulation of nerve afferents from upper and lower limbs in normal humans. *Brain Res* 650:313–316.
30. León L, Casanova-Molla J, Lauria G, Valls-Solé J (2011) The somatosensory blink reflex in upper and lower brainstem lesions. *Muscle Nerve* 43:196–202.
31. Khosbin S, Hallett M (1981) Multimodality evoked potentials and blink reflex in multiple sclerosis. *Neurology* 31:138–144.
32. Kimura J (1970) Alteration of the orbicularis oculi reflex by pontine lesions. Study in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 22:156–161.
33. Kimura J (1975) Electrical elicited blink reflex in diagnosis of multiple sclerosis: Review of 260 patients over a seven-year period. *Brain* 98:413–426.
34. Sanders EA, Ongerboer de Visser BW, Barendsward EC, Arts RJ (1985) Jaw, blink and corneal reflex latencies in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 48:1284–1289.
35. Nazhel B, Ircek C, Kocer B (2002) The roles of blink reflex and sympathetic skin response in multiple sclerosis diagnosis. *Mult Scler* 8:500–504.
36. Mikropoulos E, Papathanasiou A, Hadjigeorgiou G, Tsironi E, Papadimitriou A (2010) Supratentorial Multiple Sclerosis Lesions Affect the Blink Reflex Test. *Open Neurol J* 4:92–99.
37. Dengler R, Kossev A, Gippner C, Strupp A (1982) Quantitative analysis of blink reflex in patients with hemiplegic disorders. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 53:513–524.
38. Kimura J, Rodnitzky RL, Okawara SH (1975) Electrophysiologic analysis of aberrant regeneration after facial nerve paralysis. *Neurology* 25:989–993.
39. Kimura J (1989) Test for less accessible regions of the nervous system. In: Kimura J (ed) *Electrodiagnosis in diseases of the nerve and muscle: principles and practice*, Philadelphia, PA: FA Davis, Pp. 305–426.
40. Valls-Solé J, Tolosa ES (1989) Blink reflex excitability cycle in hemifacial spasm. *Neurology* 39:1061–1066.
41. Manca D, Muñoz E, Pastor P, Valdeoriola F, Valls-Solé J (2001) Enhanced gain of blink reflex responses to ipsilateral supraorbital nerve afferent inputs in patients with facial nerve palsy. *Clin Neurophysiol* 112:153–156.
42. Aramideh M, Eekhof JLA, Bour IJ, Koelman JH, Speelman JD, et al. (1995) Electromyography and blink reflex recovery in involuntary eyelid closure: A comparative study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58:692–698.
43. Kimura J (1973) Disorders of interneurons in parkinsonism: The orbicularis oculi reflex to paired stimuli. *Brain* 96:87–96.
44. Boelhouwer AJW, Teurlings RJMA, Brunia CHM (1991) The effect of an acoustic warning stimulus upon the electrically elicited blink reflex in humans. *Psychophysiology* 28:133–139.
45. Graham FK (1975) The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology* 12:238–248.
46. Valls-Solé J, Valdeoriola F, Molinuevo JL, Cossu G, Nobbe F (1999) Prepulse modulation of the startle reaction and the blink reflex in normal human subjects. *Exp Brain Res* 129:49–56.
47. Agostino R, Berardelli A, Cruccu G, Stocchi F, Manfredi M (1987) Corneal and blink reflexes in Parkinson's disease with "on-off" fluctuations. *Mov Disord* 2:227–235.
48. Pauletti G, Berardelli A, Cruccu G, Agostino R, Manfredi M (1993) Blink reflex and the masseter inhibitory reflex in patients with dystonia. *Mov Disord* 8:495–500.
49. Gómez-Wong E, Martí MJ, Tolosa E, Valls-Solé J (1998) Sensory modulation of the blink reflex in patients with blepharospasm. *Arch Neurol* 55:1233–1237.
50. Kumru H, Vidal J, Koller M, Portell E, Valls-Solé J (2010) Alterations in excitatory and inhibitory brainstem interneuronal circuits after severe spinal cord injury. *J Neurotrauma* 27:721–728.
51. Valls-Solé J, Muñoz JE, Valdeoriola F (2004) Abnormalities of prepulse inhibition do not depend on blink reflex excitability: a study in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Clin Neurophysiol* 115:1527–1536.
52. Kutzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33:1444–1452.
53. Ison JR, Sanes JN, Foss JA, Pinckney LA (1990) Facilitation and inhibition of the human startle blink reflexes by stimulus anticipation. *Behav Neurosci* 104:418–429.
54. Barraza G, Serranova T, Herrero C, Casanova-Mollá J, To-Figueras J, et al. (2012) Brainstem dysfunction in variegate porphyria. *Muscle Nerve* 46:426–433.
55. Aramideh M, Valls-Solé J, Cruccu G, Ongerboer de Visser BW (2002) Disorders of the Cranial Nerves and Brainstem Reflexes: Electrodiagnostic Techniques, Physiology, and Normative Data. In: Brown WF, Bolton CF, Aminoff MJ (editors) *Neuromuscular Function and Disease*, Philadelphia, PA: Pp. 757–780.
56. Deltenre P, Van Nechel C, Vercrussse A, Strul S, Capon A, et al. (1982) Results of a prospective study on the value of combined visual, somatosensory, brainstem auditory evoked potentials and blink reflex measurements for disclosing subclinical lesions in suspected multiple sclerosis. *Adv Neurol* 32:473–479.
57. Kayamori R, Dickins S, Yamada T, Kimura J (1984) Brainstem auditory-evoked potential and blink reflex in multiple sclerosis. *Neurology* 34:1318–1323.
58. Vucic S (2012) The re-emergence of evoked potentials in multiple sclerosis: from diagnosis to prognostication. *Clin Neurophysiol* 123:221–222.
59. Namerow N, Etemadi A (1970) The orbicularis oculi reflex in multiple sclerosis. *Neurology* 20:1200–1203.
60. Degirmenci E, Erdogan C, Bir IS (2013) Correlation between blink reflex abnormalities and magnetic resonance imaging findings in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg* 113:265–9.
61. Klissurski M, Novachkova S, Tzvetanov P, Alexiev F (2009) Orbicularis oculi reflex abnormalities in patients with multiple sclerosis: a clinical, EMG, and MRI investigation. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 49:59–63.
62. Erkol G, Kiziltan ME, Uluduz D, Uzun N (2009) Somatosensory eye blink reflex in peripheral facial palsy. *Neurosci Lett* 460:201–204.
63. Iriarte LM, Chacón J, Madrazo J, Chaparro P, Vadillo J (1988) Blink reflex in 57 parkinsonian patients with correlation between the clinical and electrophysiological parameters. *Funct Neurol* 3:147–156.
64. Berardelli A, Rothwell JC, Day BL, Marsden CD (1985) Pathophysiology of blepharospasm and oromandibular dystonia. *Brain* 108:593–608.
65. Berardelli A, Rothwell JC, Day BL, Marsden CD (1988) The pathophysiology of cranial dystonia. *Adv Neurol* 50:525–535.
66. Cohen LG, Ludlow CL, Warden M, Estegui M, Agostino R, et al. (1989) Blink reflex excitability recovery curves in patients with spasmodic dysphonia. *Neurology* 39:572–577.
67. Eekhof JLA, Aramideh M, Bour IJ, Hilgevoord AA, Speelman HD, et al. (1996) Blink reflex recovery curves in blepharospasm, torticollis spasmodica and hemifacial spasm. *Muscle Nerve* 19:10–15.
68. Tolosa E, Montserrat I, Bays A (1988) Blink reflex studies in focal dystonias: enhanced excitability of brainstem interneurons in cranial dystonia and spasmodic torticollis. *Mov Disord* 3:61–69.
69. Baker RS, Sun WS, Hasan SA, Rouholiman BR, Chuque JC, et al. (1997) Maladaptive neural compensatory mechanisms in Bell's palsy-induced blepharospasm. *Neurology* 49:223–229.
70. Syed NA, Delgado A, Sandbrink F, Schulman AE, Hallett M, et al. (1999) Blink reflex recovery in facial weakness: an electrophysiologic study of adaptive changes. *Neurology* 52:834–838.
71. Rossi A, Scarpini C (1992) Gating of trigemino-facial reflex from low-threshold trigeminal and extratrigeminal cutaneous fibres in humans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:774–780.
72. Inglis WL, Winn P (1995) The pedunculo-pontine tegmental nucleus: where the striatum meets the reticular formation. *Prog Neurobiol* 47:1–29.
73. Koch M, Kungel M, Herbert H (1993) Cholinergic neurons in the pedunculo-pontine tegmental nucleus are involved in the mediation of prepulse inhibition of the acoustic startle response in the rat. *Exp Brain Res* 97:71–82.
74. Reese NB, Garcia-Rill E, Skinner RD (1995) The pedunculo-pontine nucleus-auditory input, arousal and pathophysiology. *Prog Neurobiol* 47:105–133.
75. Emre Oge A, Boyaciyan A, Sarp A, Yazici J (1996) Facial myokymia: segmental demyelination demonstrated by magnetic stimulation. *Muscle Nerve* 19:246–249.

Trabajo número 2

Defective sensorimotor integration in preparation for reaction time tasks in patients with multiple sclerosis.

Cabib C, Llufríu S, Casanova-Molla J, Saiz A, Valls-Solé J

J Neurophysiol. 2015 Mar 1;113(5):1462-9. doi: 10.1152

Defective sensorimotor integration in preparation for reaction time tasks in patients with multiple sclerosis

Christopher Cabib,¹ Sara Llufrú,² Jordi Casanova-Molla,¹ Albert Saiz,² and Josep Valls-Solé¹

¹EMG Unit, Neurology Department, Hospital Clínic, and Institut d'Investigació Augustí Pi i Sunyer, Facultat de Medicina, University of Barcelona, Barcelona, Spain; and ²Center for Neuroimmunology, Neurology Department, Hospital Clínic, and Institut d'Investigació Augustí Pi i Sunyer, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Submitted 8 August 2014; accepted in final form 1 December 2014

Cabib C, Llufrú S, Casanova-Molla J, Saiz A, Valls-Solé J. Defective sensorimotor integration in preparation for reaction time tasks in patients with multiple sclerosis. *J Neurophysiol* 113: 1462–1469, 2015. First published December 4, 2014; doi:10.1152/jn.00591.2014.—Slowness of voluntary movements in patients with multiple sclerosis (MS) may be due to various factors, including attentional and cognitive deficits, delays in motor conduction time, and impairment of specific central nervous system circuits. In 13 healthy volunteers and 20 mildly disabled, relapsing-remitting MS patients, we examined simple reaction time (SRT) tasks requiring sensorimotor integration in circuits involving the corpus callosum and the brain stem. A somatosensory stimulus was used as the imperative signal (IS), and subjects were requested to react with either the ipsilateral or the contralateral hand (uncrossed vs. crossed SRT). In 33% of trials, a startling auditory stimulus was presented together with the IS, and the percentage reaction time change with respect to baseline SRT trials was measured (StartReact effect). The difference between crossed and uncrossed SRT, which requires interhemispheric conduction, was significantly larger in patients than in healthy subjects ($P = 0.021$). The StartReact effect, which involves activation of brain stem motor pathways, was reduced significantly in patients with respect to healthy subjects (uncrossed trials: $P = 0.015$; crossed trials: $P = 0.005$). In patients, a barely significant correlation was found between SRT delay and conduction abnormalities in motor and sensory pathways ($P = 0.02$ and $P = 0.04$, respectively). The abnormalities found specifically in trials reflecting interhemispheric transfer of information, as well as the evidence for reduced subcortical motor preparation, indicate that a delay in reaction time execution in MS patients cannot be explained solely by conduction slowing in motor and sensory pathways but suggest, instead, defective sensorimotor integration mechanisms in at least the two circuits examined.

multiple sclerosis; simple reaction time; crossed reaction time task; StartReact effect; motor preparation

SLOWNESS OF MOVEMENT IS A common observation in patients with central nervous system disorders. This is the case in multiple sclerosis (MS), where delayed movement execution in reaction time tasks has been mainly attributed to decreased alertness, fatigue, and slowness of cognitive processing (De Sonneville et al. 2002; Godefroy et al. 2002; Kail 1998; Kujala et al. 1995; Morgante et al. 2011). However, these may not be the only factors responsible for disordered movement execution. A delay in simple reaction time (SRT) tasks could theoretically be due to slowness of conduction in motor or sensory pathways or to defective sensorimotor integration, i.e., the activation of the required synaptic circuitry that leads to

execution of a preprogrammed motor act in response to a sensory cue (Abbruzzese and Berardelli 2003; Swayne et al. 2006). In fact, the characteristic multifocal involvement of MS makes these patients likely candidates for defective sensorimotor integration. We hypothesized that MS patients may have abnormal integration of sensory inputs in circuits that are often a target of MS lesions. Therefore, we devised SRT paradigms involving conduction through the corpus callosum and activation of brain stem motor circuits.

For the functional assessment of conduction through the corpus callosum, we used a special case of an SRT paradigm, i.e., the unilateral limb reaction to a contralateral somatosensory stimulus or crossed SRT task (Kennedy et al. 2013; Schieppati et al. 1984; Schulte et al. 2005). This should certainly involve interhemispheric transfer of sensorimotor information, which has been shown to be impaired in MS. An established neurophysiological means to evaluate interhemispheric connections indirectly is the assessment of the ipsilateral silent period (iSP) to focal transcranial magnetic stimulation (TMS) (Meyer et al. 1995), which is indeed often abnormal in MS (Jung et al. 2006; Llufrú et al. 2012; Schmierer et al. 2000). We hypothesized that crossed SRT tasks in MS patients should reflect the hypothesized delay of the interhemispheric sensorimotor transfer of the information needed for integration of sensory inputs into motor commands for fast reaction time. We also considered the possibility that the differences between crossed and uncrossed SRTs would correlate with iSP-derived measures of conduction time in the corpus callosum.

For the assessment of the brain stem functions related to execution of motor tasks, we examined the contribution of reticulospinal tract activation via a loud startling auditory stimulus (SAS) to the execution of a task in an SRT paradigm. Motor preparation is a key factor for fast execution of voluntary ballistic movements. In SRT, healthy subjects are able to prepare the motor program fully in advance before the imperative signal (IS) is issued, since they have all of the information needed for task execution (Hallett 1990; Henderson and Dittrich 1998; Pascual-Leone et al. 1992a, b). Motor preparation implies enhancement of excitability in cortical and subcortical structures to facilitate activation of the motor system (Brunia 1993; Valls-Solé et al. 1995). The preparation-related enhancement of excitability in subcortical motor tracts probably accounts for the StartReact effect, i.e., the significant shortening of reaction time that takes place when an SAS is applied together with the IS (Carlsen et al. 2004a, b; Siegmund et al. 2008; Valls-Solé et al. 1995, 1999). We reasoned that

Address for reprint requests and other correspondence: J. Valls-Solé, Unitat d'EMG, Servei de Neurologia, Hospital Clínic, Villarroel, 170, Barcelona, 08036, Spain (e-mail: jvalls@clinic.ub.es).

defective motor preparation of subcortical structures would be reflected in an abnormal StartReact effect.

Therefore, in healthy subjects and MS patients, we investigated SRT tasks involving the corpus callosum (using crossed SRT tasks) and the brain stem (using the StartReact effect).

METHODS

Subjects

The present study was part of an extensive neurophysiological study of a cohort of 20 patients with relapsing-remitting MS, prospectively selected from the outpatient MS clinic of the Hospital Clinic of Barcelona. Other features of the same patients have been reported elsewhere (Cabib et al. 2014; Llufríu et al. 2012) or are under preparation. Patients were diagnosed according to the criteria of Polman and Rudick (2010) and recruited if they were ambulatory, had low-to-moderate scores on the Expanded Disability Status Scale (EDSS; 0–6.0) (Kutzke 1983), had no clinically relevant limb paresis, were under stable immunomodulatory treatment, and were relapse and steroid free for at least 1 mo before inclusion. They were also excluded if they had any clinically relevant sensory deficit in the arms or absence of evoked potentials to somatosensory stimuli. Their mean age was 37.0 ± 7.0 yr (ranging from 27 to 53 yr). Patients were 11 women and nine men, with a median EDSS of 2.0 (range between 0 and 6.0) and a median score for brain stem in the evaluation of functional systems of 1.0 (range between 0 and 3.0). Seventeen of them were right handed (85%), with a score in the Edinburgh scale <25 (Oldfield 1971). We also examined 13 age- and sex-matched healthy volunteers used as a control group. They were eight women and five men, with a mean age of 35.2 ± 8.0 yr, ranging from 26 to 52 yr. Nine were right handed (69.2%). The Hospital Clinic Research Ethics Committee approved the study, and all participants gave written, informed consent.

Experimental Settings

Subjects were sitting comfortably with both forearms and wrists fixed to a metallic platform in such a way that only the wrist joint could move freely along the complete flexo-extension range of motion. SRT was measured at the onset of electromyographic (EMG) activity, recorded from the wrist-extensor (WE) muscles (band pass 10–2,000 Hz) using a conventional electromyograph (Mystro5Plus; Vickers Medical, Surrey, UK). Surface-recording electrodes were attached over the right and left extensor digitorum comunis muscles and over the right orbicularis oculi (OOc) and sternocleidomastoid (SCM) muscles.

Reaction Time Task and StartReact Effect

Subjects were requested to perform unilateral ballistic wrist-extension movements in the context of an SRT paradigm and were told that there could occasionally be a loud auditory stimulus (the SAS) accompanying the IS. The movement requested was an open-loop movement, i.e., with no specific target to reach, to make it as simple as possible. The IS consisted of an electrical pulse, applied to the index finger with ring electrodes, with an intensity set at two times the individual's sensory-perception threshold. The SAS was obtained by discharging the magnetic coil of a magnetic stimulator (Novamatrix 200; MagStim, London, UK) over a metallic platform at an intensity of 100% of the stimulator's capacity. The auditory stimulus of 130 dB (sound-pressure level) is able to elicit the auditory startle response (ASR), which we recorded from OOc and SCM.

All participants had a few trials of training, and the experiments began only when they were confident with the task. In all trials, subjects were requested to perform the task by the ipsilateral (uncrossed) or by the contralateral hand (crossed) to stimuli to the right

or the left index finger. Therefore, according to the site where the IS was applied and the hand requested to move, subjects were presented with two stimulus-response congruous trials—right stimulation-right reaction and left stimulation-left reaction—and two stimulus-response incongruous trials—right stimulation-left reaction and left stimulation-right reaction. For each stimulus-response combination, we obtained eight baseline trials, in which only the IS was presented (baseline-SRT trials) and four trials in which an SAS was presented simultaneously with the IS (SAS-SRT trials). The two types of trials were intermingled randomly. We never applied two SAS-SRT trials in sequence. Trials were repeated online in case of an occasional absence of the ASR.

TMS Studies

Focal TMS was applied over the left or right primary motor cortex (M1) with a figure-of-eight coil connected to the magnetic stimulator and the responses recorded from the first dorsal interosseous muscle in both sides. We set the stimulus intensity at 1.2 times the resting motor threshold, determined as the lowest intensity needed to obtain a motor-evoked potential (MEP) of at least 50 μ V amplitude in at least three out of five trials (Kobayashi and Pascual-Leone 2003). We first recorded the MEPs at rest, and then, subjects were requested to maintain a voluntary muscle contraction (index abduction) of 20% of their maximum, while we applied TMS to the ipsilateral hemisphere to obtain the iSP. We repeated the procedure four times.

Somatosensory-Evoked Potentials

The somatosensory-evoked potentials (SEPs) were recorded with conventional techniques (Cooper et al. 2004) to stimulation of the median nerves. Patients were lying relaxed on the examination bed with electrodes placed over the contralateral parietal cortex with reference to the two earlobes. Electrical stimulation frequency was 5 Hz, and stimulus duration was 0.2 ms. The intensity was adjusted to the one eliciting a slight motor twitch in the thenar eminence. Trials were repeated twice (after averaging 500 traces each) to replicate the responses consistently.

Data Analysis

Data were analyzed offline and blindly by one of the authors (C. Cabib). Reaction time (milliseconds) was measured as the onset of the EMG activity in the WE muscles to the somatosensory IS. We considered latency of the reaction at the time that the EMG burst became consistently >0.1 mV above background. For between-group comparisons on both experimental conditions (baseline-SRT and SAS-SRT trials), we analyzed data from all trials to calculate the mean reaction time of each subject in each stimulus-response combination. However, for correlation analyses of reaction time values, we considered the shortest reaction time in each group of trials.

To examine the effects of stimulus-response congruence on reaction time, we pooled together data from right and left sides for uncrossed (stimulus-response, congruous trials) and crossed (stimulus-response, incongruous trials) reaction time tasks. This was done for both baseline-SRT and SAS-SRT trials. To examine the StartReact effect, we grouped SAS-SRT trials and represented reaction time values as a percentage of the baseline trials. We also measured the latency of the ASR elicited in the OOc and SCM. We considered ASR to be present when a burst with amplitude >0.05 mV was present in both muscles at the expected latency (Brown et al. 1991). We excluded online the trials in which subjects did not have an ASR to SAS.

With TMS, we considered MEP to be present when a response >0.1 mV was obtained, whereas a reduction $>80\%$ of the prestimulus EMG activity was considered significant for iSP to be present. We measured onset latency of the MEP and latency and duration of the

iSP. From all trials, we considered the shortest latency of the MEP and iSP, as well as the mean duration of the iSP for further analysis. For SEPs, we considered responses to be present when the N19 peak amplitude was $>0.5 \mu\text{V}$. We measured the latency of N19 and P22 components recorded in C3' or C4' (depending on the side of the stimulus). Data from each hand were used independently for correlation analysis.

Data Reduction

After data analysis, we produced the following variables: uncrossed and crossed baseline-SRT, uncrossed and crossed SAS-SRT, MEP latency, iSP latency and duration, SEP latency (N19 and P22), and ASR latency for OOC and SCM. For each individual, we calculated the interhemispheric reaction time difference (IHRTd) by subtraction of the shortest uncrossed from the shortest crossed SRT in baseline trials. We also calculated the interhemispheric conduction time (IHCT) as the difference between the MEP latency and the iSP latency (Schmieder et al. 2000, 2002).

The StartReact effect was estimated in each subject by calculating the percentage reaction time shortening in SAS-SRT trials with respect to baseline trials, as follows: StartReact effect (%) = $100 \times [\text{shortest reaction time in baseline SRT trials (milliseconds)} - \text{shortest reaction time in SAS-SRT trials (milliseconds)}] / \text{shortest reaction time in baseline SRT trials (milliseconds)}$. This analysis was done separately for uncrossed and crossed trials to estimate the degree of effectiveness of subcortical preparation.

Statistical Analyses

All of the statistical analyses were performed using SPSS for Windows (version 18.0). The 2×2 correlation test (χ^2) was used to examine differences in data distribution. As inferred from above and because there was a normal distribution of data, mean values for shortest and mean reaction times were obtained in healthy subjects and patients. Data were grouped according to stimulus-response congruence (crossed and uncrossed) and experimental condition (baseline-SRT and SAS-SRT). Within-group differences between crossed and uncrossed reaction time, as well as between baseline-SRT and SAS-SRT, were analyzed using paired Student's *t*-test. An overall analysis was carried out with two-way ANOVA for each group of subjects to examine the interaction between response congruence and experimental condition, whereas one-way ANOVA was used for comparison between healthy subjects and patients. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

To assess the contribution of possible efferent and afferent conduction abnormalities on reaction time, we examined the correlation between the uncrossed SRT and the MEP or SEP latencies. Also, to examine whether reticulospinal pathways contributed to the StartReact effect, we correlated the SAS-SRT and the ASR latencies. Furthermore, to assess the contribution of functional abnormalities in the corpus callosum to crossed SRT, we examined the correlation between IHCT and IHRTd. We used the Pearson's test for all correlation analysis.

RESULTS

Data on conduction time for MEPs and SEPs are summarized in Table 1, together with all other data on conduction time gathered from TMS studies. One factor is that ANOVA showed significant differences between groups in the MEP and SEP latency ($F[1,31] = 8.963$, $P = 0.005$ for MEP; $F[1,31] = 5.048$, $P = 0.028$ for N19; and $F[1,31] = 4.675$, $P = 0.034$ for P22), which were longer in patients than in healthy subjects. There were also statistically significant differences in iSP latency ($F[1,31] = 19.593$, $P < 0.001$) but not in iSP duration

Table 1. Data related to the study of transcranial magnetic stimulation and somatosensory-evoked potentials done in healthy subjects and patients with multiple sclerosis

	Healthy subjects, <i>n</i> = 13	Patients, <i>n</i> = 20	<i>P</i>
	Mean (SD)	Mean (SD)	
TMS			
MEP latency	22.2 (1.2)	24.9 (3.2)	<i>0.005</i>
iSP latency	34.7 (2.1)	41.3 (5.1)	<i><0.001</i>
iSP duration	18.5 (2.7)	20.2 (4.8)	<i>0.351</i>
IHCT	12.5 (2.0)	16.5 (4.1)	<i>0.004</i>
SEP			
N19 latency	19.5 (1.1)	20.6 (1.9)	<i>0.028</i>
P22 latency	22.4 (1.3)	23.3 (2.0)	<i>0.034</i>

TMS, transcranial magnetic stimulation; MEP, motor-evoked potential; iSP, cortical ipsilateral silent period; IHCT, interhemispheric conduction time (see data reduction in METHODS); SEP, somatosensory-evoked potential. The value obtained in either side of subjects was averaged to obtain 1 single value for each individual and after that, to obtain the mean value of each group. All data are expressed in milliseconds. Comparisons between both groups were done using 1-way ANOVA (significant *P* values are shown in italics).

($F[1,31] = 0.897$, $P = 0.351$), which were also longer in patients than in healthy subjects. From the analysis of iSP and MEP latency values, we estimated the IHCT, which was again significantly longer in patients than in healthy subjects ($F[1,31] = 9.677$, $P = 0.004$).

Reaction Time

Data on mean and shortest reaction times are summarized in Table 2 for healthy subjects and patients, distributed according to stimulus-response congruence (uncrossed and crossed) and experimental condition (baseline-SRT and SAS-SRT). Figure 1 shows raw recordings from a healthy subject and a representative MS patient.

Baseline-SRT trials. Crossed SRT was significantly longer than uncrossed SRT for healthy subjects and patients (Table 2; *t*-test, $P < 0.001$ for both groups). There was no effect of group on baseline-SRT, neither for uncrossed nor for crossed SRT, although there was a tendency for patients to have longer values for mean ($F[1,31] = 3.994$, $P = 0.054$) and shortest crossed SRT ($F[1,31] = 3.873$, $P = 0.058$; ANOVA). A significant effect of group was, however, found for the IHRTd, which was significantly larger in patients (23 ± 12.7 ms) than in healthy subjects (13.8 ± 6.9 ms; $F[1,31] = 5.957$, $P = 0.021$). The total number of patients that exceeded the normal, upper-limit SRT values was seven, four of them for uncrossed SRT and six of them for crossed SRT (three patients shared both conditions).

SAS-SRT trials. In general terms, mean reaction time in SAS-SRT trials was shorter than in baseline-SRT trials in healthy subjects and patients (Fig. 1 and Table 2). The differences were significant in healthy subjects for uncrossed and crossed SAS-SRT (*t*-test; $P < 0.001$ for both comparisons) and for patients for uncrossed trials ($P < 0.001$) but not for crossed trials ($P = 0.08$). Similar to what occurred in baseline-SRT trials, both healthy subjects and patients had a significantly longer mean reaction time for crossed SAS-SRT trials than for uncrossed SAS-SRT trials (*t*-test, $P < 0.001$ for both groups). In patients, SAS-SRT were statistically, significantly longer than in healthy subjects for crossed (ANOVA; $F[1,31] =$

Table 2. Data on uncrossed and crossed reaction times (the mean and the shortest values) in the 2 experimental conditions (baseline-SRT and SAS-SRT) together with the StartReact effect calculated in healthy subjects and MS patients

Condition	Congruence	Healthy subjects, n = 13	Patients, n = 20	P
		Mean (SD)	Mean (SD)	
Mean values				
Baseline-SRT, ms	Uncrossed	127.5 (12.6)	145.6 (39.3)	0.120
	Crossed	140.9 (12.6)*	163.5 (39.4)*	0.054
SAS-SRT, ms	Uncrossed	91.8 (10.9)	117.6 (39.8)	0.030
	Crossed	102.0 (9.0)*	146.6 (65.3)*	0.022
StartReact effect, %	Uncrossed	27.7 (8.0)	20.0 (8.7)	0.015
	Crossed	27.5 (6.2)	17.0 (11.5)	0.005
Shortest values				
Baseline-SRT, ms	Uncrossed	116.9 (12.4)	126.3 (26.0)	0.235
	Crossed	130.5 (15.4)*	149.4 (32.1)*	0.058
SAS-SRT, ms	Uncrossed	86.2 (12.0)	105.9 (31.3)	0.039
	Crossed	98.6 (9.0)*	138.6 (64.8)*	0.035
StartReact effect, %	Uncrossed	25.7 (10.7)	17.6 (7.9)	0.016
	Crossed	23.8 (8.1)	16.2 (10.4)	0.034

Baseline-SRT, simple reaction time in the baseline experimental condition; SAS-SRT, reaction time in the test condition, in which a startling auditory stimulus (SAS) was applied; StartReact, significant shortening of reaction time that takes place when an SAS is applied together with the imperative signal; MS, multiple sclerosis. See METHODS for definition of stimulus-response congruence. *Significant within-group differences (*t*-test, $P < 0.05$) were found between crossed and uncrossed stimulus-response congruence in the experimental condition (baseline-SRT or SAS-SRT). *P* (in italics values < 0.05) refers to comparison in reaction time between healthy subjects and patients for each specific trial in the same stimulus-response congruence using 1-way ANOVA.

5.178, $P = 0.030$) and uncrossed ($F[1,31] = 5.842$, $P = 0.022$) trials.

In healthy subjects, the StartReact effect was not different between uncrossed and crossed trials (*t*-test, $P = 0.803$) and was significantly higher than in patients for both uncrossed (ANOVA; $F[1,31] = 6.614$, $P = 0.015$) and crossed ($F[1,31] = 8.984$, $P = 0.005$) trials. In eight patients, the StartReact effect was reduced beyond the limits of the mean $- 2$ SD, calculated in healthy subjects. These eight patients did not show significant differences with respect to the remaining 12 patients in their median EDSS and brain stem functional system score ($P > 0.05$ for both comparisons).

There were no differences in the mean latency value of the ASR between healthy subjects and patients (38.5 ± 3.1 ms in OOc and 60.2 ± 5.3 ms in SCM muscles for healthy subjects and 41.3 ± 6.0 ms in the OOc and 61.9 ± 5.9 ms in the SCM for patients; $P > 0.05$ for the two muscles). Interestingly, the eight patients with no StartReact effect showed ASRs in the OOc and SCM with latencies not significantly longer than patients with a normal StartReact effect ($P > 0.05$ for both comparisons).

Interaction between experimental conditions. Because significant between-group differences were found in regard to the stimulus-response congruence and the effect of an SAS on reaction time, we examined the possibility of interaction between the two conditions. A two-way ANOVA showed no interaction between factors (crossed/uncrossed and presence/absence of SAS) in healthy subjects ($F[1,24] = 0.250$, $P = 0.619$) or patients ($F[1,38] = 0.271$, $P = 0.604$).

Correlation Analyses

Figures 2 and 3 show all of the correlation analyses between reaction time and conduction time measures. In the analysis of transcallosal connections (Fig. 2), the IHCT was positively correlated with the IHRTd in patients, i.e., the longer the crossed SRT, the longer the conduction times between hemispheres (Pearson's, $r = 0.520$, $P = 0.019$). This was not the case for healthy subjects ($r = 0.055$, $P = 0.857$).

In pooling together data from healthy subjects and patients, we found positive correlations for uncrossed SRT and MEP or SEP latencies and for SAS-SRT and ASR latencies (Pearson's, $r > 0.4$, $P < 0.05$ for all of them). As shown in Fig. 3, these correlations were also statistically significant when only patients were considered (uncrossed SRT and MEPs, $r = 0.374$, $P = 0.021$; uncrossed SRT and SEPs, $r = 0.327$, $P = 0.04$; SAS-SRT and ASR, $r = 0.565$, $P = 0.009$). In fact, though, only four out of the 20 patients had values beyond the upper, normal limits for both variables of the study in all three correlations. Figure 3 shows that some patients had delayed reaction times with normal MEPs, SEPs, and ASRs; others had normal reaction times with delayed MEPs, SEPs, and ASRs, whereas some others had within normal range values on reaction times and normal MEPs, SEPs, and ASRs. An analysis done after excluding these four patients showed still statistically significant between-group differences in reaction time and StartReact effect (data not shown; $P < 0.05$ for all comparisons).

DISCUSSION

The corpus callosum and the brain stem are sites of frequent involvement in MS, where lesions may affect many functions. In our study, we have gathered evidence of dysfunction in the sensorimotor pathways running through these sites in reaction time tasks, which characterizes a new expression of disordered motor control in MS. Our results indicated no interaction between the two disorders, pointing to the fact that the two circuits studied are likely independent. This brings up new information on motor physiology in reaction time tasks.

Disordered Motor Preparation in MS

Normal performance of unilateral SRT tasks to a somatosensory IS requires the combination of multiple factors. First, an attentional process is required, including sustained alertness, to trigger the same fast response along the test. Second, afferent and efferent conduction times along central and peripheral pathways should be within normal limits for appropriate synchronization of inputs at the integration centers and output to the muscle. Third, sensorimotor integration must take place at cortical and subcortical levels to engage the detection of the IS with the voluntary drive needed to trigger the reaction. Finally, the movement is executed when pre-excited subcortical motor structures are brought to discharge level by the voluntary drive, which implies the indemnity of corticospinal tracts.

In agreement with previous reports (Stoquart-Elsankari et al. 2010; Zeller et al. 2011), we have found that patients with MS have a lengthening in motor-task execution in the context of an SRT paradigm. Several authors argue that this finding is most likely due to impairment in cognitive processing and defective

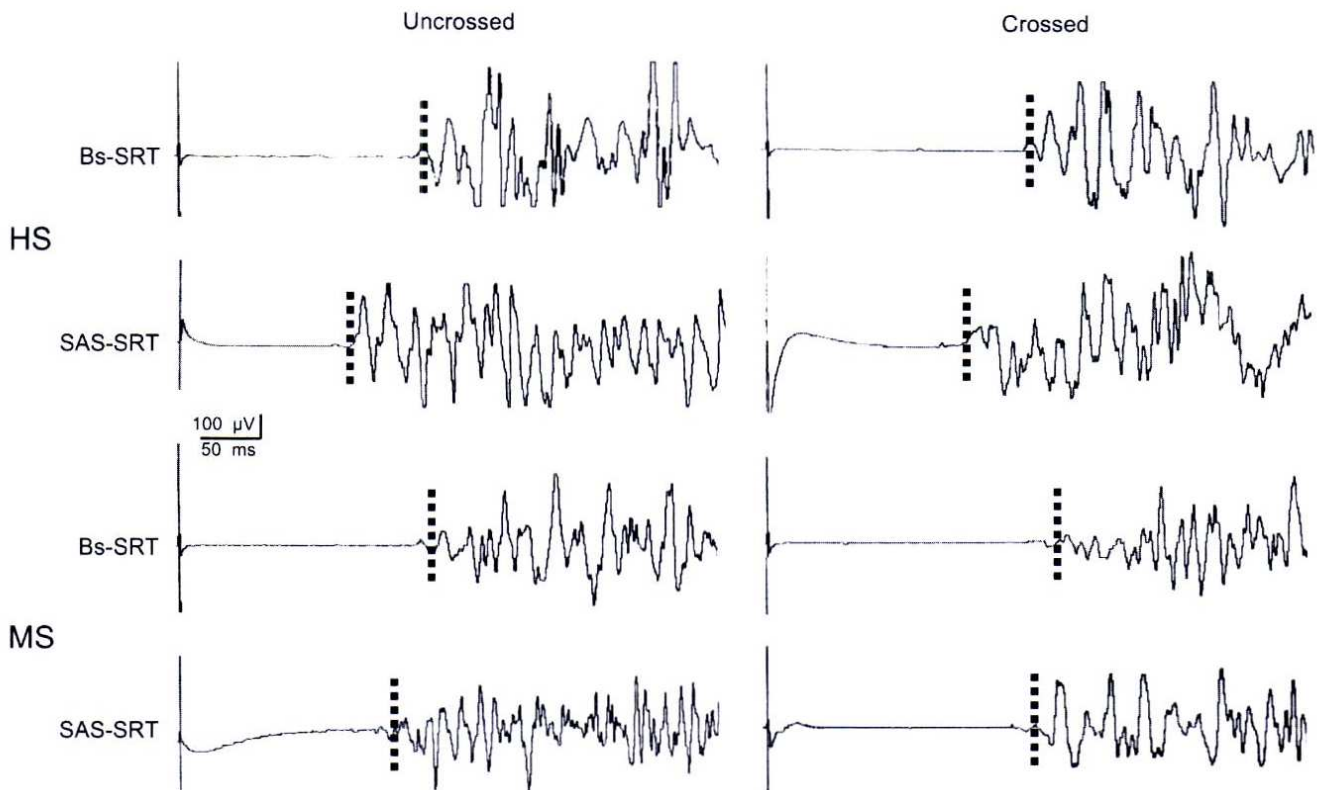


Fig. 1. Raw recordings on simple reaction time (SRT) tasks. The graphs show surface electromyographic recordings of wrist-extension in an SRT task in a healthy subject (HS) and in a representative multiple sclerosis (MS) patient. In each subject, graphs are presented separately by stimulus-response congruence, as uncrossed and crossed, and by experimental condition, as baseline (Bs)-SRT and startling auditory stimulus (SAS)-SRT. Note that the shortening of reaction time in SAS-SRT trials with respect to baseline-SRT trials is more marked in healthy subjects than in patients.

alertness (Godefroy et al. 2002; Kail 1998; Kujala et al. 1995). However, our results bring up the likely contribution of defective preparation to the slowness in reaction of MS patients (Henderson and Dittrich 1998; Valls-Solé et al. 1999).

It is known that an SAS activates the reticulospinal tract at the brain stem level (Davis et al. 1982; Liegeois-Chauvel et al. 1989). Therefore, the StartReact effect indicates that the motor structures influenced through reticulospinal tract activation are fully prepared, according to the motor program. An interesting debate has been generated recently on the location of the trigger for task execution in trials in which there is an SAS accompanying the IS. Whereas some authors hypothesize that the execution of the motor program is triggered by direct SAS activation of motor circuits at the brain stem, others favor the cortical origin after a fast route from the brain stem upwards (Alibiglou and MacKinnon 2012; Nonnekes et al. 2014). We think that our results favor the first hypothesis, since it would be unlikely not to have an interaction between the two experimental conditions if the two of them used a cortical route. In any case, the StartReact effect indicates that the required cortical and subcortical circuits for motor-program execution had indeed enhanced excitability (Brunia 1993; Valls-Solé et al. 1995). Absence of the effect could occur because of defective preparation or abnormalities in the execution channel, a situation that may occur with severe brain stem neuronal loss, as in patients with progressive supranuclear palsy (Valldorriola et al. 1998; Vidailhet et al. 1992).

To our knowledge, this is the first report that demonstrates a reduced StartReact effect in MS patients, suggesting that the

structures implied in the release of the motor program are not energized sufficiently. Therefore, our patients did not only have longer reaction times than healthy subjects, which could be attributed to a clinical or subclinical involvement of an afferent pathway or the corticospinal tracts (Stoquart-Elsankari et al. 2010), but they also had an abnormal effect of an SAS on execution of the motor program, which is attributable to

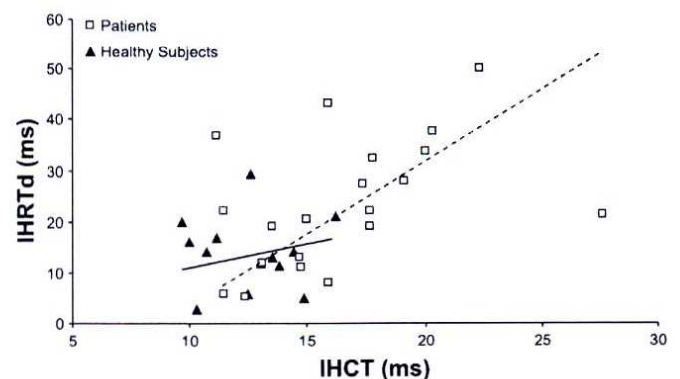


Fig. 2. Contribution of interhemispheric connections to motor execution in crossed-reaction time tasks. Correlation between the conduction through callosal pathways, estimated by calculating the interhemispheric conduction time (IHCT: mean value between both sides) and the interhemispheric reaction time difference (IHRTd; for details, see Data Reduction in METHODS). A significant, positive correlation was found in MS patients (marked with white squares; dashed line for correlation; Pearson's, $r = 0.520$, $P = 0.019$) but not in healthy subjects (black triangles; continuous line for correlation; $r = 0.055$, $P = 0.857$).

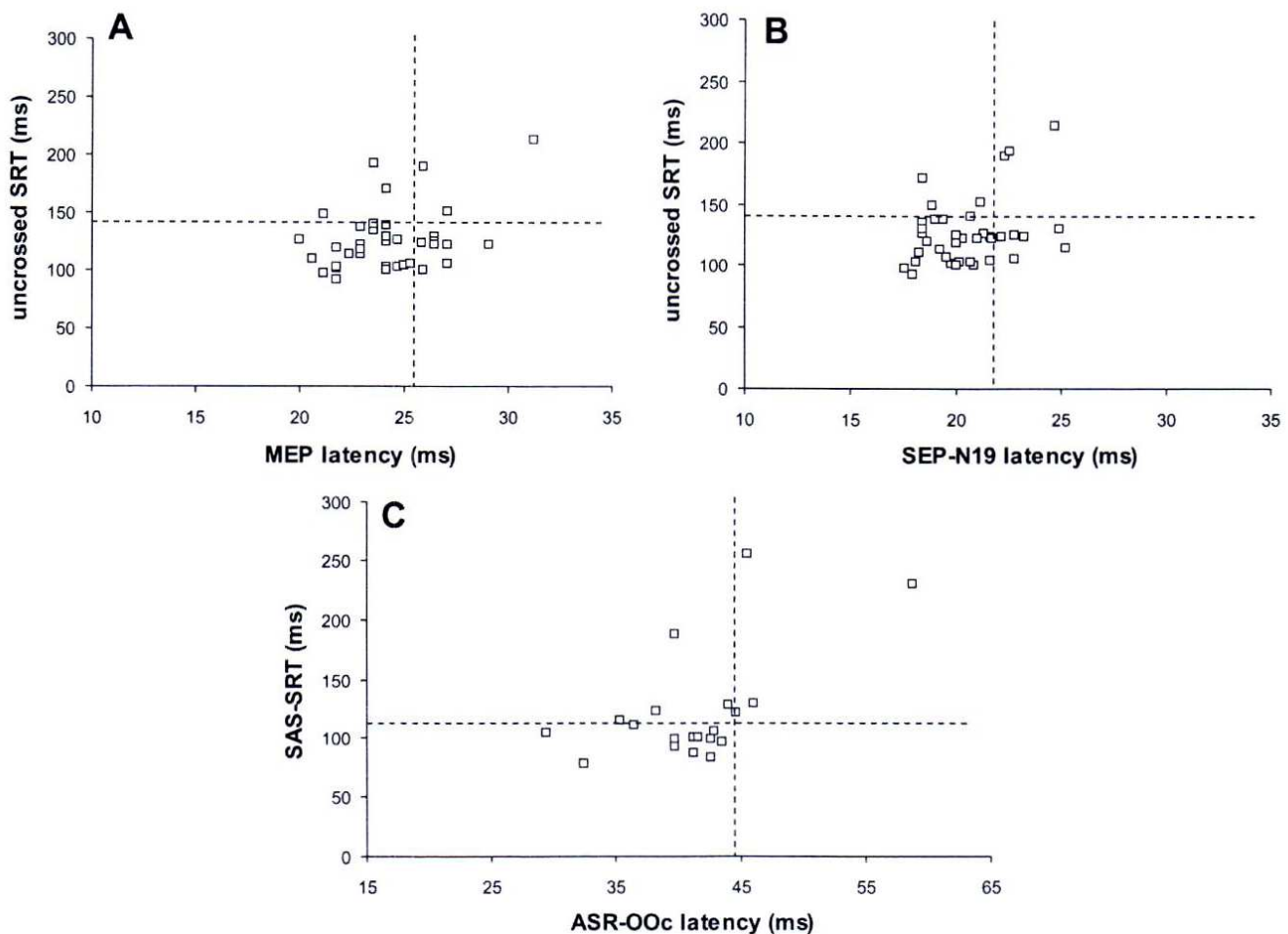


Fig. 3. Correlation between the shortest reaction time and the latency of motor-evoked potentials (MEPs), somatosensory-evoked potentials (SEPs), or auditory startle responses (ASR) in MS patients. The graph shows the correlation in MS patients (white squares) between the reaction time value in uncrossed, baseline-SRT trials and the latency of MEP (A) or SEP (N19 component; B), calculated on either side, and between the mean reaction time value in SAS-SRT trials and the latency of the ASR in orbicularis oculi (ASR-OOc; C). Note that although few patients had values placed beyond the upper normal limits (dashed lines) in both variables, for all of the 3 paired variables, a significant, positive correlation was found (Pearson's, $r > 0.3$, $P < 0.05$ for all 3 correlations).

defective preparation for motor execution. Although this points to an abnormal function in structures activated by the reticulospinal tract, our findings do not rule out the possible implication of cortical mechanisms in the execution of the motor program (Alibiglou and MacKinnon 2012; Nonnekes et al. 2014). Extensive microstructural abnormalities of cortical and subcortical regions are found in MRI studies since early stages of the disease (Llufriu et al. 2014). White-matter lesions and widespread demyelination, gliosis, and axonal loss are part of the pathological events related to the MRI findings and to the functional and cognitive impairment in MS (Filippi et al. 2012, 2013; Llufriu et al. 2014). Brain stem lesions are a hallmark of the disease (Pelletier et al. 2001) and may explain the impairment of the StartReact phenomenon found in our patients.

Interhemispheric Communication and Sensorimotor Integration

The corpus callosum is the major commissure of the brain, providing communication between both hemispheres (Bloom and Hynd 2005). The iSP reveals the inhibitory effect caused mainly by transcallosal fibers, which are originated in the hemisphere where the TMS pulse is applied over the voluntary

EMG activity generated in the contralateral motor cortex (Meyer et al. 1995). As noticed before, an altered conduction in corticospinal pathways may be part of the random involvement of neural tracts that typically occurs in MS. In fact, this was also the case in our sample of patients, who despite being only mildly disabled, had abnormally long central MEP and SEP latencies, and their reaction time correlated significantly with latencies of both the MEP and the SEP. However, this fact cannot explain, by itself, a reduction in reaction time because of the different magnitude of the delay (only a few milliseconds in MEP or SEP latency but several tens of milliseconds in reaction time), although we cannot rule out that the abnormality in conduction times reflects a widespread dysfunction in circuits, more closely related to sensorimotor integration than the rather crude latency value obtained in SEP and MEP studies.

Interestingly, in a study using TMS, Zeller et al. (2011) reported that when performing a unilateral motor task, patients with MS showed increased facilitation of the ipsilateral motor area compared with healthy subjects. Moreover, with functional MRI, patients with MS showed lower deactivation of ipsilateral sensorimotor cortex during unilateral hand move-

ments (Manson et al. 2008). These findings suggest difficulties for MS patients in focusing brain activity and may be due, in part, to the frequent impairment of transcallosal inhibitory pathways. We have calculated the IHCT, which should represent the conduction time through transcallosal inhibitory pathways. Our patients had a longer reaction time for contralateral than for ipsilateral trials, i.e., larger IHRTd, which correlated positively with longer IHCT. These data suggest that in MS patients, a defective sensorimotor integration requiring callosal transfer of information may be a key factor in the slowness of motor-task execution in SRT paradigms, requiring activation of the contralateral hand to unilateral somatosensory IS. This is indeed an adequate method for the assessment of functionally relevant sensorimotor integration of interhemispheric transfer of information (Kennedy et al. 2013; Schieppati et al. 1984; Schulte et al. 2005).

Limitations of the Study

Our sample of patients is small and of certain characteristics, i.e., mildly affected by the disease, with preserved cognition. These aspects should be considered important factors influencing our results. For instance, we found no interaction between experimental condition and stimulus-response congruence. This is taken to indicate that both mechanisms contribute independently to the delay of reaction time. However, this should just be considered an interim conclusion, since other patients with MS might show different results, possibly according to the irregular distribution of their brain lesions. Theoretically, more affected patients might have more involvement of not only the circuits participating in sensorimotor integration but also the pathways conveying the input and output commands. Therefore, the correlation that we found between reaction time delay and SEPs, MEPs, and ASRs may be of more importance in patients with more advanced disease.

Conclusions

We identified abnormalities in sensorimotor integration in two circuits of patients with MS, leading to slowness of motor-task execution in a reaction time task experiment. A slowness in transcallosal conduction may explain lengthening of crossed motor-task execution, whereas a defective subcortical motor preparation may explain reduced responsiveness to the external activation of subcortical motor pathways by an SAS. Although these abnormalities correlate with slowness in sensory and motor central conduction times, the size and distribution of the abnormalities affecting specific conditions and the fact that abnormalities were still significant if the patients with a more pronounced delay were excluded from the analysis point out a disorder that is beyond mere conduction, i.e., sensorimotor integration, which implies deterioration in the specific SRT tasks examined in this study.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Sergio Amaro for his help with statistical analyses.

GRANTS

Financial support for this work was provided by Fundacio TV3 (Grant 110930; to J. Valls-Solé).

DISCLOSURES

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: C.C. analyzed data; C.C., J.C-M., A.S., and J.V-S. interpreted results of experiments; C.C. prepared figures; C.C. and J.V-S. drafted manuscript; C.C., S.L., J.C-M., A.S., and J.V-S. approved final version of manuscript; S.L., A.S., and J.V-S. conception and design of research; S.L., J.C-M., and J.V-S. performed experiments; S.L., J.C-M., A.S., and J.V-S. edited and revised manuscript.

REFERENCES

- Abbruzzese G, Berardelli A. Sensorimotor integration in movement disorders. *Mov Disord* 18: 231–240, 2003.
- Alibiglou L, MacKinnon CD. The early release of planned movement by acoustic startle can be delayed by transcranial magnetic stimulation over the motor cortex. *J Physiol* 590: 919–936, 2012.
- Bloom JS, Hynd GW. The role of the corpus callosum in interhemispheric transfer of information: excitation or inhibition? *Neuropsychol Rev* 15: 59–71, 2005.
- Brown P, Rothwell JC, Thompson PD, Britton TC, Day BL, Marsden CD. New observations on the normal auditory startle reflex in man. *Brain* 114: 1891–1902, 1991.
- Brunia CH. Waiting in readiness: gating in attention and motor preparation. *Psychophysiology* 30: 327–339, 1993.
- Cabib C, Llufríu S, Martínez-Heras E, Saiz A, Valls-Solé J. Abnormal control of orbicularis oculi reflex excitability in multiple sclerosis. *PLoS One* 9: e103897, 2014.
- Carlsen AN, Chua R, Inglis JT, Sanderson DJ, Franks IM. Can prepared responses be stored subcortically? *Exp Brain Res* 159: 301–309, 2004a.
- Carlsen AN, Chua R, Inglis JT, Sanderson DJ, Franks IM. Prepared movements are elicited early by startle. *J Mot Behav* 36: 253–264, 2004b.
- Cooper R, Manguière F, Osselton JW, Prior PF, Tedman BM. Evoked potentials. In: *Clinical Neurophysiology: EMG, Nerve Conduction and Evoked Potentials* (revised and enlarged edition). London: Elsevier, 2004, vol. 1, p. 355–401.
- Davis M, Gendelman DS, Tischler MD, Gendelman PM. A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies. *J Neurosci* 2: 791–805, 1982.
- De Sonneville LM, Boringa JB, Reuling IE, Lazeron RH, Adèr HJ, Polman CH. Information processing characteristics in subtypes of multiple sclerosis. *Neuropsychologia* 40: 1751–1765, 2002.
- Filippi M, Rocca MA, Barkhof F, Brück W, Chen JT, Comi G, DeLuca G, De Stefano N, Erickson BJ, Evangelou N, Fazekas F, Geurts JJ, Lucchinetti C, Miller DH, Pelletier D, Popescu BF, Lassmann H, Attendees of the Correlation between Pathological MRI Findings in MS Workshop. Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 11: 349–360, 2012.
- Filippi M, van den Heuvel MP, Fornito A, He Y, Hulshoff Pol HE, Agosta F, Comi G, Rocca MA. Assessment of system dysfunction in the brain through MRI-based connectomics. *Lancet Neurol* 12: 1189–1199, 2013.
- Godefroy O, Lhullier-Lamy C, Rousseaux M. SRT lengthening: role of an alertness deficit in frontal damaged patients. *Neuropsychologia* 40: 2234–2241, 2002.
- Hallett M. Clinical neurophysiology of akinesia. *Rev Neurol (Paris)* 146: 585–590, 1990.
- Henderson L, Dittrich WH. Preparing to react in the absence of uncertainty: I. New perspectives on simple reaction time. *Br J Psychol* 89: 531–554, 1998.
- Jung P, Beyerle A, Humpich M, Neumann-Haefelin T, Lanfermann H, Ziemann U. Ipsilateral silent period: a marker of callosal conduction abnormality in early relapsing-remitting multiple sclerosis? *J Neurol Sci* 250: 133–139, 2006.
- Kail R. Speed of information processing in patients with multiple sclerosis. *J Clin Exp Neuropsychol* 20: 98–106, 1998.
- Kennedy DM, Wang C, Shea CH. Reacting while moving: influence of right limb movement on left limb reaction. *Exp Brain Res* 230: 143–152, 2013.
- Kobayashi M, Pascual-Leone A. Transcranial magnetic stimulation in neurology. *Lancet Neurol* 2: 145–56, 2003.

- Kujala P, Portin R, Revonsuo A, Ruutiainen J. Attention related performance in two cognitively different subgroups of patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 59: 77–82, 1995.
- Kutzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33: 1444–1452, 1983.
- Liegeois-Chavel C, Morin C, Musolino A, Bancaud J, Chauvel P. Evidence for a contribution of the auditory cortex to audiospinal facilitation in man. *Brain* 112: 375–391, 1989.
- Llufriu S, Blanco Y, Martinez-Heras E, Casanova-Molla J, Gabilondo I, Sepulveda M, Falcon C, Berenguer J, Bargallo N, Villoslada P, Graus F, Valls-Sole J, Saiz A. Influence of corpus callosum damage on cognition and physical disability in multiple sclerosis: a multimodal study. *PLoS One* 7: e37167, 2012.
- Llufriu S, Martinez-Heras E, Fortea J, Blanco Y, Berenguer J, Gabilondo I, Ibarretxe-Bilbao N, Falcon C, Sepulveda M, Sola-Valls N, Bargallo N, Graus F, Villoslada P, Saiz A. Cognitive functions in multiple sclerosis: impact of gray matter integrity. *Mult Scler* 20: 424–432, 2014.
- Manson SC, Wegner C, Filippi M, Barkhof F, Beckmann C, Ciccarelli O, De Stefano N, Enzinger C, Fazekas F, Agosta F, Gass A, Hirsch J, Johansen-Berg H, Kappos L, Korteweg T, Polman C, Mancini L, Manfredonia F, Marino S, Miller DH, Montalban X, Palace J, Rocca M, Ropele S, Rovira A, Smith S, Thompson A, Thornton J, Youstry T, Frank JA, Matthews PM. Impairment of movement-associated brain deactivation in multiple sclerosis: further evidence for a functional pathology of interhemispheric neuronal inhibition. *Exp Brain Res* 187: 25–31, 2008.
- Meyer BU, Rörich S, Gräfin von Einsiedel H, Kruggel F, Weindl A. Inhibitory and excitatory interhemispheric transfers between motor cortical areas in normal humans and patients with abnormalities of the corpus callosum. *Brain* 118: 429–440, 1995.
- Morgante F, Dattola V, Crupi D, Russo M, Rizzo V, Ghilardi M, Terranova C, Girlanda P, Quartarone A. Is central fatigue in multiple sclerosis a disorder of movement preparation? *J Neurol* 258: 263–272, 2011.
- Nonnekes J, Oude Nijhuis LB, de Niet M, de Bot ST, Pasman JW, van de Warrenburg BP, Bloem BR, Weerdesteyn V, Geurts AC. StartReact restores reaction time in HSP: evidence for subcortical release of a motor program. *J Neurosci* 34: 275–281, 2014.
- Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia* 9: 97–113, 1971.
- Pascual-Leone A, Houser CM, Grafman J, Hallett M. Reaction time and transcranial magnetic stimulation. *Lancet* 339: 1420, 1992a.
- Pascual-Leone A, Valls-Solé J, Wassermann EM, Brasil-Neto J, Cohen LG, Hallett M. Effects of focal transcranial magnetic stimulation on simple reaction time to acoustic, visual and somatosensory stimuli. *Brain* 115: 1045–1059, 1992b.
- Pelletier J, Suchet L, Witjas T, Habib M, Guttmann CR, Salamon G, Lyon-Caen O, Chérif AA. A longitudinal study of callosal atrophy and interhemispheric dysfunction in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol* 58: 105–111, 2001.
- Polman CH, Rudick RA. The multiple sclerosis functional composite: a clinically meaningful measure of disability. *Neurology* 74, Suppl 3: S8–S15, 2010.
- Schieppati M, Musazzi M, Nardone A, Seveso G. Interhemispheric transfer of voluntary motor commands in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 57: 441–447, 1984.
- Schmierer K, Irlbacher K, Grosse P, Rörich S, Meyer BU. Correlates of disability in multiple sclerosis detected by transcranial magnetic stimulation. *Neurology* 59: 1218–1224, 2002.
- Schmierer K, Niehaus L, Rörich S, Meyer BU. Conduction deficits of callosal fibres in early multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68: 633–638, 2000.
- Schulte T, Sullivan EV, Müller-Oehring EM, Adalsteinsson E, Pfefferbaum A. Corpus callosum microstructural integrity influences interhemispheric processing: a diffusion tensor imaging study. *Cereb Cortex* 15: 1384–1392, 2005.
- Siegmund GP, Inglis JT, Sanderson DJ. Startle response of human neck muscles sculpted by readiness to perform ballistic head movements. *J Physiol* 15, 535: 289–300, 2001.
- Stoquart-Elsankari S, Bottin C, Roussel-Pieronne M, Godefroy O. Motor and cognitive slowing in multiple sclerosis: an attentional deficit? *Clin Neurol Neurosurg* 112: 226–232, 2010.
- Swayne O, Rothwell J, Rosenkranz K. Transcallosal sensorimotor integration: effects of sensory input on cortical projections to the contralateral hand. *Clin Neurophysiol* 117: 855–863, 2006.
- Valldeoriola F, Valls-Solé J, Tolosa E, Ventura PJ, Nobbe FA, Martí MJ. Effects of a startling acoustic stimulus on reaction time in different parkinsonian syndromes. *Neurology* 51: 1315–1320, 1998.
- Valls-Solé J, Rothwell JC, Goulart F, Cossu G, Muñoz E. Patterned ballistic movements triggered by a startle in healthy humans. *J Physiol* 516: 931–938, 1999.
- Valls-Solé J, Solé A, Valldeoriola F, Muñoz E, Gonzalez LE, Tolosa ES. Reaction time and acoustic startle in normal human subjects. *Neurosci Lett* 195: 97–100, 1995.
- Vidailhet M, Rothwell JC, Thompson PD, Lees AJ, Marsden CD. The auditory startle response in the Steele-Richardson-Olszewski syndrome and Parkinson's disease. *Brain* 115: 1181–1192, 1992.
- Zeller D, Dang SY, Stefan K, Biller A, Bartsch A, Saur D, Bendszus M, Rieckmann P, Toyka KV, Classen J. Functional role of ipsilateral motor areas in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82: 578–583, 2011.

Trabajo número 3

Enhanced mirror activity in 'crossed' reaction time tasks in multiple sclerosis.

Cabib C, Llufríu S, Martínez-Heras E, Saiz A, Valls-Solé J

Clin Neurophysiol. 2016 Apr;127(4):2001-9. doi: 10.1016



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Neurophysiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinph



Enhanced mirror activity in 'crossed' reaction time tasks in multiple sclerosis



Christopher Cabib^{a,*}, Sara Llufrú^{b,c}, Eloy Martínez-Heras^{b,c}, Albert Saiz^{b,c}, Josep Valls-Solé^{a,c}

^a EMG Unit, Neurology Department, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

^b Center for Neuroimmunology, Neurology Department, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

^c IDIBAPS (Institut d'Investigació August Pi i Sunyer), Facultat de Medicina, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 26 January 2016

Available online 4 February 2016

Keywords:

Crossed reaction time tasks

Mirror electromyographic activity

Mirror movements

Multiple sclerosis

Motor control

Interhemispheric connections

HIGHLIGHTS

- In unilateral 'crossed' reaction time tasks, MS patients showed abnormally enhanced mirror EMG activity.
- This abnormality was associated with neural tissue damage of corpus callosum and brainstem.
- The inhibitory commands for unwanted EMG activity depend on the integrity of commissural cerebral midline structures.

ABSTRACT

Objective: Execution of unimanual voluntary motor tasks requires appropriate inhibitory control over contralateral motor output. Such inhibition should involve interhemispheric connections, which are often damaged in multiple sclerosis (MS).

Methods: Twenty mildly-disabled MS patients and 13 healthy subjects performed ipsilateral and contralateral wrist-extension reactions (IR and CR, respectively) to a unilateral somatosensory cue, the latter condition requiring necessarily interhemispheric transfer of information. Prevalence, persistence, latency and amount of mirror electromyographic activity (mEMG) were calculated in each study group, as well as diffusion-tensor-imaging measures of damage in corpus callosum and brainstem for correlation with mEMG.

Results: Healthy subjects and patients showed mEMG more often in CR than in IR. In CR tasks, mEMG was larger, more persistent and occurred more often at a shorter latency with respect to voluntary reaction in patients than in healthy subjects ($p < 0.05$ for all). Patients with mEMG had significantly higher diffusivity values of damage in corpus callosum and lower brainstem volumes than patients without mEMG ($p < 0.05$ for all).

Conclusions: MS patients show deficient inhibition of unintended mEMG in 'crossed' reaction time tasks. **Significance:** Enhanced mEMG in MS may be due to microstructural axonal damage and atrophy in inhibitory commissural connections of the corpus callosum and brainstem.

© 2016 International Federation of Clinical Neurophysiology. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: mEMG, mirror electromyographic activity; MS, multiple sclerosis; Cc, corpus callosum; IHI, interhemispheric inhibition; EMG, electromyography; IS, imperative signal; IR, ipsilateral reaction; CR, contralateral reaction; DTI, diffusion-tensor-imaging; MD, mean diffusivity; AD, axial diffusivity; RD, radial diffusivity; FA, fractional anisotropy; CMR, cutaneo-muscular reflex; M1, primary motor cortex; CNS, central nervous system.

* Corresponding author at: Unitat d'EMG, Servei de Neurologia, Hospital Clinic, Villarroel, 170, Barcelona 08036, Spain. Tel.: +34 932275413; fax: +34 932275783.

E-mail address: ccabibitalia@yahoo.es (C. Cabib).

1. Introduction

Mirror movements, i.e., the involuntary activation of homologous muscles in the limb contralateral to the one intended to move, are known to occasionally occur during childhood (Reitz and Müller, 1998). Healthy adults do not usually show mirror movements but may show mirror electromyographic activity (mEMG) under certain experimental conditions (Armatas et al., 1994; Mayston et al., 1999). Enhancement of mEMG during

unilateral voluntary movements, as reported in association with aging and in some neuropsychiatric disorders (Addamo et al., 2007; Hashimoto et al., 2001; Hoy et al., 2007; Van den Berg et al., 2000), is considered a sign of deficient inhibition of unwanted motor output to the contralateral limb and implies dysfunction of interhemispheric connections (Hübers et al., 2008). These connections run mainly through corpus callosum, but other structures in the motor system may also participate in this form of motor control. These may be upstream and downstream the motor cortex, ranging from the supplementary and premotor areas (Brinkman and Kuypers, 1973; Brinkman, 1984; Brugger et al., 2015; Chan and Ross, 1988; Cincotta et al., 2004; Donchin et al., 2002; Giovannelli et al., 2006; Kazennikov et al., 1999; Kermadi et al., 2000; Sadato et al., 1997; Sharples et al., 2014; Tanji et al., 1988) to the brainstem and spinal cord, as suggested from studies performed in primates (Aoyama et al., 1971; Mitani et al., 1988; Peterson, 1979; Peterson et al., 1979; Shinoda et al., 1986; Soteropoulos et al., 2013; Zaaïmi et al., 2012).

Mirroring is clinically relevant in conditions such as Parkinson's and Huntington's disease or schizophrenia (Hashimoto et al., 2001; Hoy et al., 2007; Van den Berg et al., 2000), but it has not been reported in multiple sclerosis (MS), even though commissural structures connecting descending motor pathways of both sides, such as corpus callosum (Cc) and brainstem, are often damaged (Dietemann et al., 1988; Pelletier et al., 2001). In fact, several authors have demonstrated enhanced excitability of the primary motor cortex in MS patients in the side ipsilateral to the one with which they are requested to perform a unilateral task (Reddy et al., 2002; Rocca et al., 2004; Zeller et al., 2011), as a likely sign of reduced interhemispheric inhibition (IHI; Lenzi et al., 2007).

Because of the frequent involvement of Cc and brainstem in MS, we reasoned that the hypothesized lack of inhibitory control over the contralateral motor output would be more pronounced in these patients than in healthy subjects during motor tasks requiring interhemispheric transfer of information (i.e., 'crossed' reaction time tasks; Schieppati et al., 1984) and that quantitative data of such unwanted activity would combine with neuroimaging signs of structural damage of either the Cc or the brainstem.

2. Methods

2.1. Subjects

The study was part of a comprehensive neurophysiological study of a cohort of 20 patients with relapsing-remitting MS, diagnosed according to McDonald's Criteria – revision 2010 (Polman et al., 2011). Other features of the same patients have been reported elsewhere (Cabib et al., 2014, 2015; Llufrú et al., 2012). Patients (11 female; aged 37.0 ± 7.0 yo, ranged 27–53 yo) were prospectively recruited from the outpatient MS Clinic of the Hospital Clinic of Barcelona. They were selected according to the following criteria: (1) low to moderate scores on the Expanded Disability Status Scale (Kutzke, 1983; median 2.0, ranged 0.0–6.0), (2) stable immunomodulatory treatment and, (3) relapse and steroid-free for at least one month prior to inclusion. Exclusion criteria included: (1) clinically relevant motor/sensory deficit in arms, (2) absence of motor evoked-potentials in hand muscles to transcranial magnetic stimulation or somatosensory evoked-potentials to electrical stimulation of the median nerves and, (3) cognitive dysfunction or impairment of attention that could interfere with the experiment. Thirteen age and sex-matched healthy volunteers were recruited and used as control subjects (8 female; 35.2 ± 8.0 yo, 26–52 yo). Nine healthy subjects and 17 patients were strictly right-handed (Edinburgh scale < 25; Oldfield, 1971). The Hospital Clinic Research Ethics Committee approved the study and all participants gave written informed consent.

2.2. Experimental setup

Participants were sitting on a chair, with both forearms resting on top of a table, attached to a metallic device that allowed the wrist-joint to move freely in the horizontal plane for flexion and extension. Surface recording electrodes were placed over the forearm wrist-extensors muscles. Electromyographic (EMG) signal was recorded (filtered 10–2000 Hz) with a conventional electromyograph (Mystro5Plus, Vickers Medical, Surrey, UK). The imperative signal (IS) was a low intensity-electrical pulse ($2 \times$ perception threshold), applied to the index finger with ring electrodes. Subjects were instructed to perform a strictly unilateral wrist extension movement, as fast as possible, at the perception of IS, in the context of a simple reaction time paradigm. We defined two experimental conditions: (1) ipsilateral reaction (IR), in which subjects were requested to react with the hand ipsilateral to the IS, and (2) contralateral reaction (CR), in which they had to react with the hand contralateral to the IS. Subjects had the possibility to train for a few trials and the experiments began when they were confident with the task. Eight trials were presented for each experimental condition.

2.3. MRI protocol and image analysis

2.3.1. MRI-data acquisition

MRI-images were acquired on a 3T Magnetom Trio (Siemens, Erlangen, Germany) scanner, using a thirty-two channel phased-array head coil. A 3D T1-weighted MPRAGE sequence was acquired (TR: 2050 ms, TE: 2.41 ms, TI: 1050 ms, flip angle: 9° , 192 contiguous sagittal slices with voxel size: $0.86 \times 0.86 \times 0.9$ mm³). Diffusion-tensor-imaging (DTI) was an echo planar imaging pulse sequence with diffusion-weighted, TR/TE: 7600/89 ms, 60 contiguous axial slices with an 2.5 mm isometric voxel size, diffusion gradients in 30 different directions and b-value: $1000 \text{ s} \times \text{mm}^{-2}$, and field of view: 240×240 mm².

2.3.2. Labeling and diffusivity indices of Cc and brainstem

Segmentation of Cc was based on semiautomatic edge delineation on 5 sagittal slices contiguous to the midsagittal plane on each hemisphere in the T1-MPRAGE sequence through Analyze software 9.0 (<http://www.analyzedirect.com>; Biomedical Imaging Resource). The volume of Cc-mask was calculated by merging the 11 consecutive slices and multiplied by a brain scaling factor. FreeSurfer software was used to automatically segment the brainstem volume from the T1-MPRAGE image (Desikan et al., 2006). In patients, the T1-MPRAGE was also used to manually create a lesion mask through ITK-SNAP toolkit. Then, an automated lesion filling was applied to the structural image to improve the automated labeling processes. The resulting brainstem volume obtained through FreeSurfer was normalized in each subject by a brain scaling factor. Finally, in patients, we overlaid the lesion mask with the segmentation of Cc and brainstem to identify the lesion volume. The diffusion images were corrected by eddy current distortions and subject's motion, and then brainstem and Cc-masks were registered to the DTI. The borders of brainstem and Cc-masks were eroded to avoid partial volume effects. The reconstruction of the diffusion tensors was done with the FMRIB's diffusion toolbox to obtain the following diffusion indices: fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), axial diffusivity (AD) and radial diffusivity (RD) from brainstem and Cc masks.

2.4. Data analysis and reduction

Neurophysiological data were analyzed blindly by one of the authors (CC). Reaction time was measured at the onset of voluntary movement-related EMG activity (vEMG) in forearm muscles of the

side requested to react. Presence of unwanted EMG activity was defined as any burst with duration of at least 10 ms and peak amplitude of at least 0.1 mV that occurred in the homologous non-reacting forearm muscles at latency similar to that of the voluntary reaction time (Mayston et al., 1999). In the analysis, we were careful to separate mEMG from another possible form of unwanted EMG activity, the mid-latency reflex response to the somatosensory IS or cutaneo-muscular reflex (CMR; Jenner and Stephens, 1982), which may coincide in the same arm in reaction time experiments (Mayston et al., 1999; Ohtsuka et al., 2012). Because the CMR occurs ipsilaterally to the stimulus, the possible superposition of it to mEMG could only occur in the CR condition. We considered expressions of CMRs and not of mEMG those bursts which onset latency was shorter than 80 ms (Jenner and Stephens, 1982). Fig. 1 shows schematic symbols and representative trials for each condition in a reaction without (A and C) or with mEMG (B and D). Onset latency and area of unwanted activity (mEMG and CMR) were measured using the automated system of the electromyograph.

For a subject to be considered to have mEMG, he or she should present compatible bursts in at least one out of the 8 trials. For each condition, we calculated persistence, as the percentage of trials with unwanted mEMG out of the 8 trials per subject, and prevalence, as the percentage of subjects with mEMG out of all subjects of each group. Furthermore, we calculated the total amount of mEMG per subject and condition, by simply adding the area of all mEMG bursts (Σ area). The same type of analysis was done for the CMR.

Since several mechanisms may lead to the presence of mEMG in pathological conditions (Cincotta and Ziemann, 2008), we further investigated in crossed reaction time tasks whether the presence of mEMG would be more probably caused by a 'spreading' of the motor output after activation of the hemisphere issuing the voluntary command or would be more likely generated at the hemisphere receiving the sensory inputs. To do that, we calculated the difference on the onset latency between mEMG and vEMG (Δ

$[m - v]$ EMG). We reasoned that 'spreading' of motor output as a leading mechanism of mEMG would show as mean values of $\Delta [m - v]$ EMG above 0, while 'direct activation' of the hemisphere receiving the sensory input would show as mean values of $\Delta [m - v]$ EMG below 0.

MRI-data were analyzed blindly (by EMH). Dependent MRI-variables gathered in each individual for both, Cc and brainstem, were: (1) volume and lesion-load, as indices of structural damage, and, (2) MD, AD, RD and FA, as indices of microstructural damage.

2.5. Statistical analyses

All the statistical analyses were performed using SPSS for Windows (version 18.0). We first calculated the mean and standard deviation (SD) of all electrophysiological and MRI dependent variables among subjects of the same group. The 2×2 correlation test (chi square, χ^2) was used to examine between-group differences in prevalence of unwanted activity and in data distribution of $\Delta [m - v]$ EMG values. For between-group analysis, comparison of data of continuous variables was carried out using ANOVA. This analysis was also done for the subset of subjects presenting with mEMG in each group. For within-group analysis, paired *t*-tests were used for comparison of data between conditions (CR and IR). Pearson's test was used for correlation analyses. Statistical significance was set on $p < 0.05$.

3. Results

All subjects adhered to the experimental requests, with neither withdrawal of any subject nor artifacts that were large enough to preclude analysis in any trial. Overt synkinetic movements were not observed in any healthy subject but they were observed in 2 patients. We identified mEMG in 6 healthy subjects and 11 patients with no between-group differences in prevalence of mEMG for the condition IR or CR (χ^2 , $p > 0.05$ both comparisons). The prevalence of mEMG in CR was significantly higher than in

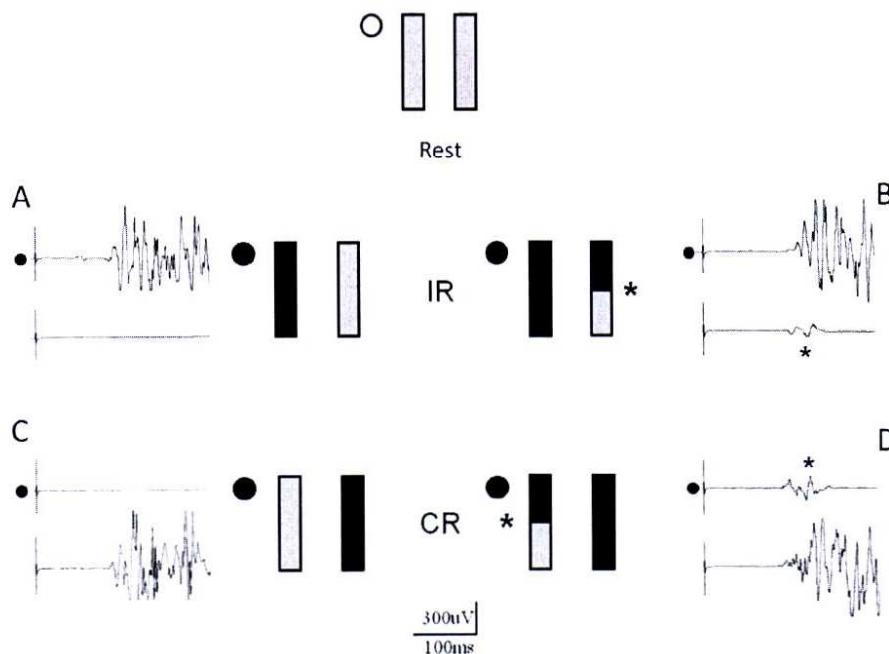


Fig. 1. Schematic representation of the setup and experimental conditions. Bars = arms (empty = rest; filled = voluntary activation; half filled = mirror activation). Circles = imperative signal-IS (empty = off; filled = on). EMG examples are given for every condition. Ipsilateral reactions (IR): in A, IS is applied to the index finger of one hand and voluntary EMG activity (reaction) is limited to the ipsilateral side, while in B there is also mirror electromyographic activity (mEMG) in contralateral muscles (asterisk). Contralateral reactions (CR): in C, reaction is limited in the arm contralateral to IS, while in D there is also mEMG in the side ipsilateral to IS (*).

IR after grouping healthy subjects and patients together ($p = 0.04$). All subjects with mEMG in IR showed also mEMG in CR, but not vice versa.

Table 1 shows data on all electrophysiological dependent variables calculated in subjects presenting with mEMG in each study group. No significant differences were found in the latency of mEMG between groups neither for IR nor for CR. However, persistence was higher for patients than for healthy subjects (Fig. 2), with differences barely missing statistical significance for IR (ANOVA, $F[1,7] = 5.552$, $p = 0.051$) and being significantly different for CR ($F[1,16] = 9.954$, $p = 0.004$). The amount of mEMG was significantly higher in patients than in healthy subjects for CR (Fig. 2; $F[1,16] = 7.254$, $p = 0.017$), but not for IR ($F[1,7] = 2.159$, $p = 0.185$).

3.1. Reaction time (vEMG) and mEMG

Overall, reaction time was slightly longer for patients than for healthy subjects, but differences did not reach statistical significance (134.2 ± 12.2 ms in healthy subjects vs 154.4 ± 38.8 ms in patients; ANOVA, $F[1,31] = 3.223$, $p = 0.082$). As expected, reaction time was significantly longer in CR than in IR for both study groups (t -test; $p < 0.001$). The analysis of individual trials in patients with mEMG showed that reaction time was significantly longer in trials without than in trials with mEMG (170.7 ± 30.4 ms vs 146.8 ± 24.1 ms, respectively; t -test, $p = 0.024$). On the contrary, these differences were not significant in healthy subjects (141.8 ± 18.0 ms vs 140.1 ± 21.7 ms; $p = 0.857$).

In CR tasks, mEMG was present in 13 trials in healthy subjects and in 49 trials in patients (Fig. 3). We found a highly significant positive correlation between latency of the mEMG and the vEMG for both study groups (Fig. 3A; Pearson's, $r = 0.943$, $p < 0.001$ in healthy subjects, and $r = 0.879$, $p < 0.001$ in patients). Values of $\Delta[m - v]EMG$ were not significantly different between healthy subjects and patients (14.6 ± 11.8 ms vs 11.7 ± 21.0 ms, respectively; ANOVA, $F[1,61] = 0.224$, $p = 0.638$). Fig. 3A shows the distribution of all $\Delta[m - v]EMG$ values: In healthy subjects all but one value were above 0 (1/13 = 7.7% with values below 0 of total trials). In patients, the percentage of trials with $\Delta[m - v]EMG$ values below 0 was significantly higher than in healthy subjects (18/49 = 36.7%; χ^2 , $p = 0.04$). Shorter latency for mEMG than for

vEMG in patients but not in healthy subjects is represented as raw data from representative cases in Fig. 3B.

3.2. CMR and mEMG

Unwanted EMG bursts compatible with CMR were recorded in forearm muscles ipsilateral to IS (Figs. 1A and 2). Overall prevalence of responses was 31% in healthy subjects (4/13) and 65% in patients (13/20). This difference was close to significance (χ^2 , $p = 0.054$). While no healthy subject showed CMRs in CR, this occurred in 5 patients, two of them with also mEMG activity in the same arm (Fig. 2). CMR- Σ area was significantly higher in patients than in healthy subjects (ANOVA, $F[1,16] = 5.828$, $p = 0.025$), but latency or persistence were not different between groups (Table 1; $p > 0.05$ for both).

3.3. MRI-data and mEMG

In overall, MRI-analysis revealed significantly lower brainstem and Cc-volumes in patients (Cc: 6.1 ± 1.3 cm³; brainstem: 26.1 ± 2.7 cm³) than in healthy subjects (ANOVA; 7.1 ± 0.8 cm³, $F[1,31] = 7.0$, $p = 0.013$; and 30.1 ± 4.05 cm³, $F[1,31] = 11.1$, $p = 0.002$, respectively). In patients, mean lesion-load was 0.15 cm³ (SD = 0.28) for Cc and 0.20 cm³ (SD = 0.48) for brainstem, with only 2 patients that did not have callosal lesions and one patient that did not have brainstem lesions. No callosal or brainstem lesions were identified in healthy subjects.

Table 2 shows the indices of structural and microstructural damage in subjects with and without mEMG, while Fig. 4 shows MRIs of representative patients of each group. Patients with mEMG had significantly lower brainstem-volume than patients without mEMG (ANOVA, $F[1,18] = 6.296$, $p = 0.022$). This was not the case for the Cc-volume but microstructural damage was significantly higher in patients with than in those without mEMG (MD: $F[1,18] = 6.352$, $p = 0.021$; AD: $F[1,18] = 5.277$, $p = 0.034$). No differences were found in lesion-load for both brainstem and Cc.

No differences were found between healthy subjects with and without mEMG in any variable ($p > 0.05$ for all comparisons). The comparative analysis of MRI-data between subjects with mEMG from both study groups showed that patients had significantly higher mean MD and RD values, and lower brainstem volumes,

Table 1

Electrophysiological dependent variables calculated in healthy subjects and patients presenting with mirror electromyographic activity (mEMG) or cutaneo-muscular reflexes (CMR) according to the experimental condition.

	Variable	Healthy subjects mean (SD)	Patients mean (SD)	<i>P</i> value
<i>mEMG</i>				
IR	Latency (ms)	174.7 (22.4)	162.3 (38.1)	0.664
	Persistence (%)	33.3 (26.0)	64.6 (14.6)	0.051
	Amount (Σ area)	2.3 (0.8)	19.6 (19.7)	0.185
CR	Latency (ms)	156.2 (29.4)	157.2 (39.3)	0.928
	Persistence (%)	27.1 (9.4)	61.1 (25.7)	0.004
	Amount (Σ area)	7.7 (4.7)	20.5 (11.0)	0.017
<i>CMR</i>				
IR	Latency (ms)	60.2 (2.6)	58.7 (6.6)	0.553
	Persistence (%)	64.6 (14.6)	68.1 (25.5)	0.757
	Amount (Σ area)	1.6 (0.9)	4.3 (0.9)	0.025
CR	Latency (ms)	na	59.6 (12.3)	na
	Persistence (%)	na	72.8 (20.1)	na
	Amount (Σ area)	na	8.4 (1.9)	na

Abb.: mEMG = mirror electromyographic activity; CMR = cutaneo-muscular reflexes; SD = standard deviation; IR = ipsilateral reaction; CR = contralateral reaction; amount (Σ area) = numeric index (unit: $\mu V s \times 10^{-3}$) representing the total amount of unwanted activity calculated from individual's responses (for details see Section 2); na = not applicable. Data on prevalence of mEMG and CMRs in both groups are detailed in the manuscript (see Section 3). Statistically significant *P* values are shown in *Italic* (ANOVA test, $p < 0.05$).

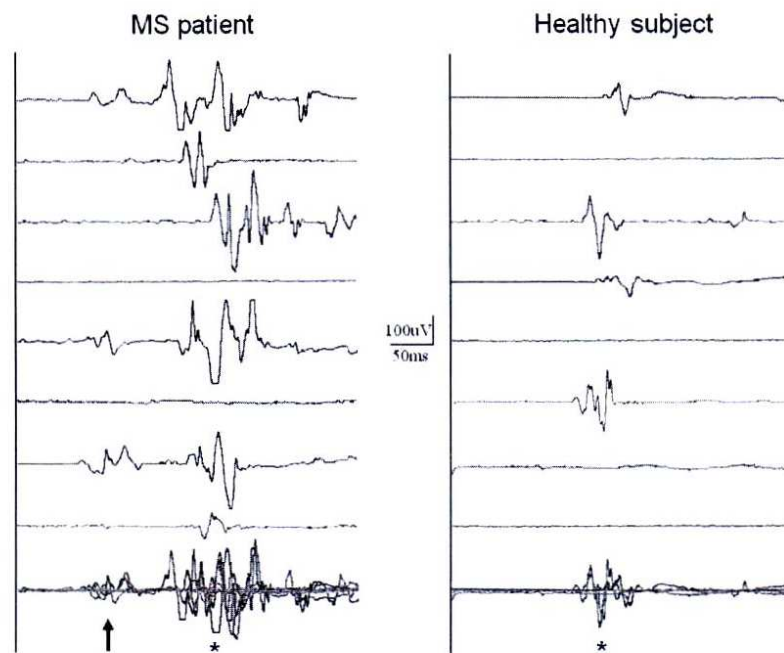


Fig. 2. Surface electromyographic recordings of homologous wrist-extensors muscles contralateral to the reacting arm of a representative multiple sclerosis patient and a healthy subject. In each subject, all 8 trials are shown in sequence for the contralateral reaction (CR) condition (superimposed at the bottom of the figure). Higher incidence and larger size of mirror electromyographic activity (mEMG, marked with an asterisk) is present in the patient with respect to the control subject. This patient had marked enlargement of mEMG and showed overt synkinetic movements. An additional short latency burst of unwanted activity was found only in the patient (marked with an arrow), which is compatible with a cutaneo-muscular reflex. It appears in a fewer number of trials than the mEMG and only in the side where the imperative signal was applied. MS = multiple sclerosis.

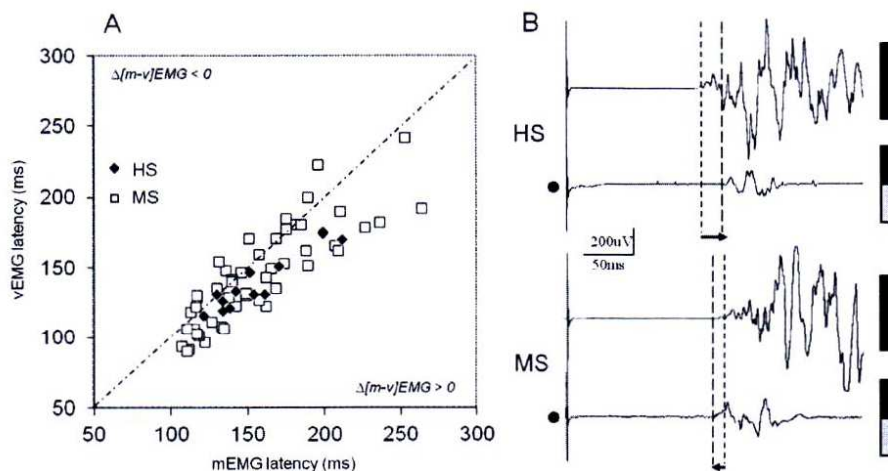


Fig. 3. Correlation between latencies of mirror- and voluntary- electromyographic activity in crossed reaction time tasks. In panel A, data values of single trials in subjects showing mirror electromyographic activity (mEMG) are presented for both study groups for the CR condition. Significant positive correlations in single trials between the onset latency of mEMG and voluntary movement-related EMG activity (vEMG) were found in healthy subjects and patients (Pearson's, $r > 0.6$ and $p < 0.05$ for both). Note that, in healthy subjects, the values of $\Delta[m - v]EMG$ were consistently above 0 (shorter latency for vEMG than for mEMG), while in several trials of patients, the latency was shorter for mEMG than for vEMG ($p < 0.05$). In panel B, we highlight this difference presenting raw data of representative examples of both study groups. Schematic symbols of the paradigm are presented as in Fig. 1.

than healthy subjects ($p < 0.05$ for all, marked with an asterisk in Table 2).

4. Discussion

In a simple reaction time task paradigm requiring the execution of unilateral wrist-extension ballistic movements, we found increased unwanted mEMG in homologous muscles of the contralateral limb in MS patients with respect to healthy subjects. This difference was more marked in experimental conditions requiring

interhemispheric transfer of information, i.e., the CR condition. Moreover, the finding of shorter latencies for mEMG than for vEMG in patients than in healthy subjects, suggests the possibility that patients show 'direct activation' of the contralateral motor output to sensory inputs, in addition to the 'spreading' of motor output from the 'voluntary' hemisphere, as a likely mechanism contributing to the presence of mEMG. In patients, presence of mEMG was associated with significantly lower brainstem volumes and higher indices of axonal damage in Cc. Transcallosal fibers are considered the most important interhemispheric inhibitory pathways (Hübner

Table 2

Data on structural and microstructural MRI-variables showing the differences on the corpus callosum (Cc) and brainstem (Bs) between subjects with and without mEMG in both study groups.

		MS patients			Healthy subjects		
		mEMG (+)	mEMG (-)	P value	mEMG (+)	mEMG (-)	P value
Cc	Vol	5.97 (1.53)	6.14 (0.92)	0.774	6.70 (0.65)	7.43 (0.81)	0.108
	LL	0.23 (0.36)	0.05 (0.05)	0.169	na	na	na
	MD	1.01 (0.10)*	0.92 (0.05)	0.021	0.90 (0.03)*	0.88 (0.02)	0.178
	AD	1.92 (0.13)	1.80 (0.08)	0.034	1.81 (0.04)	1.76 (0.05)	0.085
	RD	0.56 (0.11)*	0.48 (0.06)	0.055	0.44 (0.04)*	0.44 (0.03)	0.782
	FA	0.68 (0.05)	0.70 (0.04)	0.246	0.72 (0.03)	0.72 (0.02)	0.860
Bs	Vol	24.91 (2.44)*	27.64 (2.40)	0.022	29.26 (2.30)*	30.77 (5.22)	0.526
	LL	0.28 (0.63)	0.09 (0.15)	0.388	na	na	na
	MD	1.02 (0.07)	0.99 (0.05)	0.182	1.00 (0.04)	1.00 (0.06)	0.978
	AD	1.44 (0.06)	1.39 (0.05)	0.090	1.42 (0.06)	1.41 (0.06)	0.971
	RD	0.82 (0.07)	0.78 (0.06)	0.262	0.79 (0.04)	0.79 (0.06)	0.981
	FA	0.41 (0.03)	0.42 (0.02)	0.565	0.42 (0.02)	0.42 (0.03)	0.863

Abb.: Cc = corpus callosum, Bs = brainstem, mEMG (+/-) = presence (+) or absence (-) of mirror electromyographic activity; SD = standard deviation; Vol = volume; LL = lesion-load; MD = mean diffusivity; AD = axial diffusivity; RD = radial diffusivity; FA = fractional anisotropy; na = not applicable. All data are presented as mean values (SD). Vol and LL are expressed in units of cm³ for Cc and for Bs. MD, AD and RD are expressed in units of mm²/s × 10³. FA is a dimensionless index. For within-group comparisons, P values were calculated using one-way ANOVA (significant values are shown in *italic*). Significant between-group comparisons are marked with an asterisk (*).

et al., 2008). The probable loss of midline brainstem and callosal neural tissue related to IHI may contribute to the increased activation of contralateral motor cortex (Zeller et al., 2011), and lead to mEMG generation in MS patients.

4.1. Lack of inhibitory control in reaction time tasks

In reaction time tasks, to appropriately carry out an intended unilateral motor act, supraspinal excitatory motor output must be focused towards the specific motoneuronal pool involved in the task (Carson, 2005), while concomitant inhibitory influences must participate in avoiding unwanted co-activation in contralateral homologous muscles (Leocani et al., 2000; Liepert et al., 2001). We found that mean reaction time was longer in patients without mEMG than in those with mEMG. This may be explained by considering that MS patients may be unable to adequately prepare the structures of the motor pathway for fast execution of a motor programme (Cabib et al., 2015). Therefore, when confronted to fast execution of a motor task, patients may issue a programme that still lacks inhibition of unwanted activity. Alternatively, if they are slow enough, they may still be able to inhibit mEMG.

Facilitatory and inhibitory commands are likely acting simultaneously at different levels in the CNS during unimanual reaction time tasks. Transcallosal inhibition has been proposed as the main mechanism that successfully suppresses overt mirror activity in

healthy adults (Hoy et al., 2007; Mayston et al., 1999; Nass, 1985). In fact, subjects with strongest IHI have least mEMG when performing a rapid forceful contraction of the other hand (Hübers et al., 2008), i.e., more profound inhibition from the 'active' to the 'non-active' hemisphere suppresses more effectively unintended activation of homologous muscles (Addamo et al., 2007; Bologna et al., 2012; Cincotta and Ziemann, 2008). Apart from corpus callosum (Eliassen et al., 2000; Kennerley et al., 2002; Serrien et al., 2001; Soteropoulos and Baker, 2007; Spidalieri et al., 1986), a more distributed cortical network involving supplementary and premotor areas likely participate in focusing motor output to the primary motor cortex (M1), upstream of the interhemispheric inhibitory transfer between M1 (Brinkman and Kuypers, 1973; Brinkman, 1984; Chan and Ross, 1988; Cincotta et al., 2004; Donchin et al., 2002; Giovannelli et al., 2006; Kazennikov et al., 1999; Kermadi et al., 2000; Sadato et al., 1997; Tanji et al., 1988). Although there is no clear pathophysiological mechanism linking brainstem atrophy with mEMG, as suggested from our results, an abnormal activation/suppression of the descending bilateral motor pathways from brainstem could hypothetically lead to mEMG. In fact, subcortical neural structures, such as the cerebellum, reticular formation, and vestibular system may contribute to appropriate control of descending subcortical motor pathways across the midline to perform coordinated movements (Aoyama et al., 1971; Carleton and Carpenter, 1983;

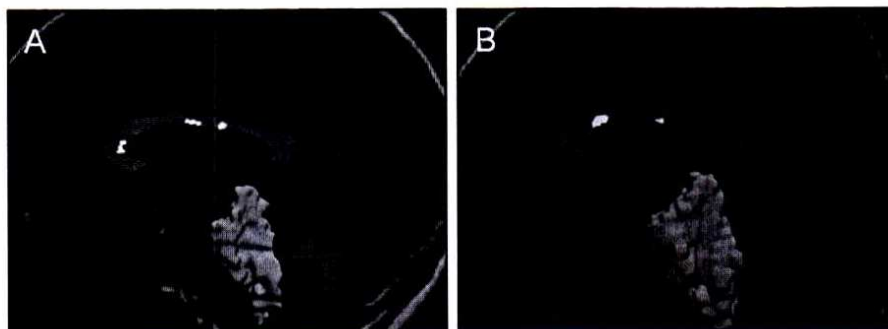


Fig. 4. Relevant brain MRI-images in a sagittal plane of 2 multiple sclerosis patients presenting with (A) and without (B) mirror electromyographic activity. Corpus callosum volume is highlighted in a two-dimensional manner (top, green), while brainstem volume is shown in 3D (bottom, grey). Note that the patient with mirror electromyographic activity (mEMG) has a diminished brainstem volume with respect to the patient without mEMG. No clear differences between patients are noticed for corpus callosum volume neither for callosal lesions (white empty areas). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fukushima et al., 1979; Mitani et al., 1988; Peterson et al., 1975, 1979; Peterson, 1979; Shinoda et al., 1986; Soteropoulos and Baker, 2008; Soteropoulos et al., 2013; Zaaïmi et al., 2012).

In 'crossed' reaction time tasks, the sensory input (used as IS) necessarily reaches first the 'mirror' hemisphere (i.e., the hemisphere which should not be activated voluntarily in the intended reaction) and then, it reaches the 'voluntary' hemisphere likely via interhemispheric transcallosal connections. In patients, enhanced mEMG was mainly found in the CR condition, proving that this methodology ('crossed' reaction time) stresses the system because sensory inputs and inhibitory commands passing through interhemispheric connections are needed before and during sensory-motor integration to adequately trigger the motor programme. In addition, we found that in most healthy subjects the latency of mEMG was longer than the latency of vEMG, suggesting that 'spreading' from motor output is the main mechanism related to the physiological presence of mEMG in this kind of experimental setup. However, the observation of shorter latencies for mEMG than for vEMG in a large percentage of patients suggests that 'direct activation' of the 'mirror' hemisphere could lead to mEMG in non-physiological conditions. This is also supported by the observations of Zeller et al. (2011), which show that lack of focusing brain motor output in one motor cortex during effortful unimanual tasks in MS may lead to unintended bilateral activation of corticospinal tract and, therefore, to associated movements as we have found in this study. Furthermore, unilateral damage of pyramidal tract, which is not uncommon in MS, might theoretically facilitate unintended activity in the contralateral motor pathway. In fact, activation of an injured pyramidal tract would have shown as longer latency of vEMG than of mEMG, as we have found in some patients. However, although we did not explore this issue in extent, we consider this possibility unlikely because patients with significant motor impairment or lack of motor evoked-potentials in upper limbs were excluded as part of inclusion criteria. We do not think either that the dysfunction we found in our patients was task-related because they were able to perform the same reaction time task similarly to healthy subjects in uncrossed paradigms.

Even if the results of our study indicate that patients have decreased inhibitory control of unwanted mEMG when executing motor tasks in a reaction time paradigm, in general terms our patients showed no overt mirror movements (except for 2 patients). Our patients had a mild-stage disease and we obviously cannot know if they would eventually develop mirror movements. However, we should consider this possibility unlikely since mirror movements have not been reported so far in MS. We can speculate that several coexisting neurological phenomena typical of MS, such as fatigue, spasticity and attention deficits, may prevent the clinical expression of mirror movements in more advanced stages of the disease. In fact, these factors may interfere with motor task execution by limiting motor preparation (Leocani et al., 2005; Morgante et al., 2011). Presence of mEMG is not necessarily abnormal since it is found occasionally in healthy subjects in experimental tasks. Indeed, our results only indicate that the defective suppression of unwanted activity was larger in patients than in healthy subjects.

The correlation between neurophysiological findings and neuroradiological signs suggested that demyelination and loss of midline crossing fibers at the Cc and brainstem (Dietemann et al., 1988; Pelletier et al., 2001) may explain the presence of mEMG in our patients. We conclude that both structures may be implicated in the pathophysiology of lack of inhibition of unwanted EMG activity. The extent of myelin and axonal damage can be estimated by measuring the amount, orientation and distribution of water molecules in the ultrastructural cerebral white matter using DTI techniques (Le Bihan, 2003; Pierpaoli et al., 1996). Whereas AD changes are related to axonal damage, RD changes seem to be more sensitive to demyelination (Boretius et al., 2012). Callosal ultra-

structural damage in MS (Lenzi et al., 2007; Werring et al., 2001) may be due to both direct inflammatory processes and secondary Wallerian degeneration caused by diffuse hemispheric damage (Evangelou et al., 2000). We found higher MD and AD values in Cc of patients with mEMG than in patients without rather than higher Cc lesion-load, suggesting that wallerian axonal degeneration of transcallosal connections are most likely associated to mEMG than callosal focal lesions.

4.2. Enhanced reflex responses to cutaneous inputs

Our MS patients showed also enhancement of a type of unwanted activity different from mEMG that appeared at latency incompatible with generation from a descending command related to the voluntary reaction. Such response to the IS is compatible with the E2 component of CMRs (Jenner and Stephens, 1982). In upper limbs, CMRs are composed of short- (E1 and I1) and long-latency (E2 and I2) phases, which represent the excitatory and inhibitory effects of spinal and transcortical circuits of modulation of ongoing EMG activity (Jenner and Stephens, 1982; Valls-Solé and Deuschl, 2006). The E2 component is usually modulated according to the type of task (Evans et al., 1989). It is enhanced during contralateral activation (Mayston et al., 1999; Nadler et al., 2000) and inhibited when reflex activity is potentially disturbing (Turner et al., 2002). Reflex enhancement could interfere with the execution of a motor task by modifying the readiness for motoneuron firing. Presence of CMRs in muscles not required to be activated was more prominent in patients than in healthy subjects, suggesting reflex excitability enhancement.

Enhanced CMRs (mostly of E2) have been found in various degenerative diseases (Chen et al., 1992; Fuhr et al., 1992) and it is not surprising that CMRs were enhanced in MS patients. In fact, both mEMG and CMR have been associated to increased excitability in the motor cortex contralateral to the one being activated in unilateral reaction time tasks (Mayston et al., 1999; Ohtsuka et al., 2012). Considering the widespread lesional substrate typical of MS, lack of supraspinal inhibitory control on reflex circuits is likely expected, which may lead to exaggerated CMRs.

4.3. Study limitations

The findings reported here are just subclinical, i.e., we found enhancement of mEMG in patients with MS, which is probably not sufficient to lead to mirror movements, and we cannot know if these would eventually appear in more advanced stages of the disease. A longitudinal study would be needed to obtain such a potentially interesting information. We cannot exclude the possibility that the association we have found between enhancement of mEMG and brainstem and callosal tissue damage is, in fact, related to a more extended cerebral damage. This issue has not been examined in our study and would require a more thorough MRI examination. Nevertheless, our observations help with understanding the possible relation between slowness of reaction, preparation of the motor programme and lack of inhibition of unwanted activity. Certainly, our findings support the idea that MS patients show significant lack of inhibitory motor control. Another approach using standardized methodology for the assessment of CMRs could have brought more detailed information on the likely impaired control over spinal reflex responses in MS patients.

4.4. Conclusions

Simple reaction time tasks requiring interhemispheric transfer of inputs through commissural pathways (i.e., 'crossed' reaction time tasks) show enhancement of mEMG in MS patients as an

expression of the impairment of inhibitory mechanisms participating in motor control. The degree of such defective inhibition was associated with involvement of the brainstem and the corpus callosum. To our knowledge, this is the first study reporting enhanced mEMG in MS and its correlation with axonal degeneration of callosal pathways and brainstem atrophy.

Acknowledgements

Part of this work was possible thanks to the financial help from Fundacio TV3 Grant110930 and FIS (Formación en Investigación en Salud, Spain) Grant042964 to JVS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of manuscript.

Conflicts of interest: None of the authors have potential conflicts of interest to be disclosed.

References

- Addamo PK, Farrow M, Hoy KE, Bradshaw JL, Georgiou-Karistianis N. The effects of age and attention on motor overflow production—a review. *Brain Res Rev* 2007;54:189–204.
- Aoyama M, Hongo T, Kudo N, Tanaka R. Convergent effects from bilateral vestibulospinal tracts on spinal interneurons. *Brain Res* 1971;35:250–3.
- Armatas CA, Summers JJ, Bradshaw JL. Mirror movements in normal adult subjects. *J Clin Exp Neuropsychol* 1994;16:405–13.
- Bologna M, Caronni A, Berardelli A, Rothwell JC. Practice-related reduction of electromyographic mirroring activity depends on basal levels of interhemispheric inhibition. *Eur J Neurosci* 2012;36:3749–57.
- Boretius S, Escher A, Dallenga T, Wozos C, Tammner R, Bruck W, et al. Assessment of lesion pathology in a new animal model of MS by multiparametric MRI and DTI. *Neuroimage* 2012;59:2678–88.
- Brinkman J, Kuypers HG. Cerebral control of contralateral and ipsilateral arm, hand and finger movements in the split-brain rhesus monkey. *Brain* 1973;96:653–74.
- Brinkman C. Supplementary motor area of the monkey's cerebral cortex: short- and long-term deficits after unilateral ablation and the effects of subsequent callosal section. *J Neurosci* 1984;4:918–29.
- Brugger E, Galovic M, Weder BJ, Kägi G. Supplementary motor complex and disturbed motor control – a retrospective clinical and lesion analysis of patients after anterior cerebral artery stroke. *Front Neurol* 2015;6:209.
- Cabib C, Llufríu S, Martínez-Heras E, Saiz A, Vallis-Solé J. Abnormal control of orbicularis oculi reflex excitability in multiple sclerosis. *PLoS One* 2014;9:e103897.
- Cabib C, Llufríu S, Casanova-Molla J, Saiz A, Vallis-Solé J. Defective sensorimotor integration in preparation for reaction time tasks in patients with multiple sclerosis. *J Neurophysiol* 2015;113:1462–9.
- Carleton SC, Carpenter MB. Afferent and efferent connections of the medial, inferior and lateral vestibular nuclei in the cat and monkey. *Brain Res* 1983;278:29–51.
- Carson RG. Neural pathways mediating bilateral interactions between the upper limbs. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;49:641–62.
- Chan JL, Ross ED. Left-handed mirror writing following right anterior cerebral artery infarction: evidence for nonmirror transformation of motor programs by right supplementary motor area. *Neurology* 1988;38:59–63.
- Chen R, Ashby P, Lang AE. Stimulus-sensitive myoclonus in akinetic-rigid syndromes. *Brain* 1992;115:1875–88.
- Cincotta M, Borgheresi A, Balestrieri F, Giovannelli F, Rossi S, Ragazzoni A, et al. Involvement of the human dorsal premotor cortex in unimanual motor control: an interference approach using transcranial magnetic stimulation. *Neurosci Lett* 2004;367:189–93.
- Cincotta M, Ziemann U. Neurophysiology of unimanual motor control and mirror movements. *Clin Neurophysiol* 2008;119:744–62.
- Desikan RS, Ségonne F, Fischl B, Quinn BI, Dickerson BC, Blacker D, et al. An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage* 2006;31:968–80.
- Dietemann JL, Beigelman C, Rumbach L, Vouge M, Tajahmady T, Faubert C, et al. Multiple sclerosis and corpus callosum atrophy: relationship of MRI findings to clinical data. *Neuroradiology* 1988;30:478–80.
- Donchin O, Gribova A, Steinberg O, Mitz AR, Bergman H, Vaadia E. Single unit activity related to bimanual arm movements in the primary and supplementary motor cortices. *J Neurophysiol* 2002;88:3498–517.
- Eliassen JC, Baynes K, Gazzaniga MS. Anterior and posterior callosal contributions to simultaneous bimanual movements of the hands and fingers. *Brain* 2000;123:2501–11.
- Evangelou N, Konz D, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM. Regional axonal loss in the corpus callosum correlates with cerebral white matter lesion volume and distribution in multiple sclerosis. *Brain* 2000;123:1845–9.
- Evans AL, Harrison LM, Stephens JA. Task-dependent changes in cutaneous reflexes recorded from various muscles controlling finger movement in man. *J Physiol* 1989;418:1–12.
- Fuhr P, Zeffiro T, Hallett M. Cutaneous reflexes in Parkinson's disease. *Muscle Nerve* 1992;15:733–9.
- Fukushima K, Peterson BW, Wilson VJ. Vestibulospinal, reticulospinal and interstitiospinal pathways in the cat. *Prog Brain Res* 1979;50:121–36.
- Giovannelli F, Borgheresi A, Balestrieri F, Ragazzoni A, Zaccara G, Cincotta M, et al. Role of the right dorsal premotor cortex in 'physiological' mirror EMG activity. *Exp Brain Res* 2006;175:633–40.
- Kazennikov O, Hyland B, Corboz M, Babalian A, Rouiller EM, Wiesendanger M. Neural activity of supplementary and primary motor areas in monkeys and its relation to bimanual and unimanual movement sequences. *Neuroscience* 1999;89:661–74.
- Kennerley SW, Diedrichsen J, Hazeltine E, Semjen A, Ivry RB. Callosotomy patients exhibit temporal uncoupling during continuous bimanual movements. *Nat Neurosci* 2002;5:376–81.
- Kermadi I, Liu Y, Rouiller EM. Do bimanual motor actions involve the dorsal premotor (PMd), cingulate (CMA) and posterior parietal (PPC) cortices? Comparison with primary and supplementary motor cortical areas. *Somatosens Mot Res* 2000;17:255–71.
- Hashimoto T, Shindo M, Yanagisawa N. Enhanced associated movements in the contralateral limbs elicited by brisk voluntary contraction in choreic disorders. *Clin Neurophysiol* 2001;112:1612–7.
- Hoy KE, Georgiou-Karistianis N, Laycock R, Fitzgerald PB. Using transcranial magnetic stimulation to investigate the cortical origins of motor overflow: a study in schizophrenia and healthy controls. *Psychol Med* 2007;37:583–94.
- Hübner A, Orekhov Y, Ziemann U. Interhemispheric motor inhibition: its role in controlling electromyographic mirror activity. *Eur J Neurosci* 2008;28:364–71.
- Jenner JR, Stephens JA. Cutaneous reflex responses and their central nervous pathways studied in man. *J Physiol* 1982;333:405–19.
- Kutzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444–52.
- Le Bihan D. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:469–80.
- Lenzi D, Conte A, Mainero C, Frasca V, Fubelli F, Totaro P, et al. Effect of corpus callosum damage on ipsilateral motor activation in patients with multiple sclerosis: a functional and anatomical study. *Hum Brain Mapp* 2007;28:636–44.
- Leocani L, Cohen LG, Wassermann EM, Ikoma K, Hallett M. Human corticospinal excitability evaluated with transcranial magnetic stimulation during different reaction time paradigms. *Brain* 2000;123:1161–73.
- Leocani L, Rovaris M, Martinelli-Boneschi F, Annovazzi P, Filippi M, Colombo B, et al. Movement preparation is affected by tissue damage in multiple sclerosis: evidence from EEG event-related desynchronization. *Clin Neurophysiol* 2005;116:1515–9.
- Liepert J, Dettmers C, Terborg C, Weiller C. Inhibition of ipsilateral motor cortex during phasic generation of low force. *Clin Neurophysiol* 2001;112:114–21.
- Llufríu S, Blanco Y, Martínez-Heras E, Casanova-Molla J, Gabilondo I, Sepulveda M, et al. Influence of corpus callosum damage on cognition and physical disability in multiple sclerosis: a multimodal study. *PLoS One* 2012;7:e37167.
- Mayston MJ, Harrison LM, Stephens JA. A neurophysiological study of mirror movements in adults and children. *Ann Neurol* 1999;45:583–94.
- Mitani A, Ito K, Mitani Y, McCarley RW. Descending projections from the gigantocellular tegmental field in the cat: cells of origin and their brainstem and spinal cord trajectories. *J Comp Neurol* 1988;268:546–66.
- Morgante F, Dattola V, Crupi D, Russo M, Rizzo V, Ghilardi MF, et al. Is central fatigue in multiple sclerosis a disorder of movement preparation? *J Neurol* 2011;258:263–72.
- Nadler MA, Harrison LM, Stephens JA. Acquisition of a new motor skill is accompanied by changes in cutaneous reflex responses recorded from finger muscles in man. *Exp Brain Res* 2000;134:246–54.
- Nass R. Mirror movement asymmetries in congenital hemiparesis: the inhibition hypothesis revisited. *Neurology* 1985;35:1059–62.
- Ohtsuka H, Sasada S, Nakajima T, Futatsubashi G, Shimizu E, Komiyama T. Tuning of the excitability of transcortical cutaneous reflex pathways during mirror-like activity. *Exp Brain Res* 2012;216:135–44.
- Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia* 1971;9:97–113.
- Pelletier J, Suchet L, Witjas T, Habib M, Guttman CR, Salamon G, et al. A longitudinal study of callosal atrophy and interhemispheric dysfunction in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2001;58:105–11.
- Peterson BW, Maunz RA, Pitts NG, Mackel RG. Patterns of projection and branching of reticulospinal neurons. *Exp Brain Res* 1975;23:333–51.
- Peterson BW. Reticulospinal projections to spinal motor nuclei. *Annu Rev Physiol* 1979;41:127–40.
- Peterson BW, Pitts NG, Fukushima K. Reticulospinal connections with limb and axial motoneurons. *Exp Brain Res* 1979;36:1–20.
- Pierpaoli C, Jezzard P, Basser PJ, Barnett A, Di Chiro G. Diffusion tensor MR imaging of the human brain. *Radiology* 1996;201:637–48.
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292–302.
- Reddy H, Narayanan S, Woolrich M, Mitsumori T, Lapiere Y, Arnold DL, et al. Functional brain reorganization for hand movement in patients with multiple sclerosis: defining distinct effects of injury and disability. *Brain* 2002;125:2646–57.
- Reitz M, Müller K. Differences between 'congenital mirror movements' and 'associated movements' in normal children: a neurophysiological case study. *Neurosci Lett* 1998;256:69–72.

- Rocca MA, Gallo A, Colombo B, Falini A, Scotti G, Comi G, et al. Pyramidal tract lesions and movement-associated cortical recruitment in patients with MS. *Neuroimage* 2004;23:141–7.
- Sadato N, Yonekura Y, Waki A, Yamada H, Ishii Y. Role of the supplementary motor area and the right premotor cortex in the coordination of bimanual finger movements. *J Neurosci* 1997;17:9667–74.
- Schieppati M, Musazzi M, Nardone A, Seveso G. Interhemispheric transfer of voluntary motor commands in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1984;57:441–7.
- Serrien DJ, Nirkko AC, Wiesendanger M. Role of the corpus callosum in bimanual coordination: a comparison of patients with congenital and acquired callosal damage. *Eur J Neurosci* 2001;14:1897–905.
- Sharples SA, Almeida QJ, Kalmar JM. Cortical mechanisms of mirror activation during maximal and submaximal finger contractions in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2014;4:437–52.
- Shinoda Y, Ohgaki T, Futami T. The morphology of single lateral vestibulospinal tract axons in the lower cervical spinal cord of the cat. *J Comp Neurol* 1986;249:226–41.
- Soteropoulos DS, Baker SN. Different contributions of the corpus callosum and cerebellum to motor coordination in monkey. *J Neurophysiol* 2007;98:2962–73.
- Soteropoulos DS, Baker SN. Bilateral representation in the deep cerebellar nuclei. *J Physiol* 2008;586:1117–36.
- Soteropoulos D, Edgley S, Baker S. Spinal commissural connections to motoneurons controlling the primate hand and wrist. *J Neurosci* 2013;33:9614–25.
- Spidalieri G, Guandalini P, Franchi G. Motor responses mediated by orthodromic and antidromic activation of the rostral portion of the cat corpus callosum. *Exp Brain Res* 1986;64:133–42.
- Tanji J, Okano K, Sato KC. Neuronal activity in cortical motor areas related to ipsilateral, contralateral, and bilateral digit movements of the monkey. *J Neurophysiol* 1988;60:325–43.
- Turner LC, Harrison LM, Stephens JA. Finger movement is associated with attenuated cutaneous reflexes recorded from human first dorsal interosseous muscle. *J Physiol* 2002;542:559–66.
- Valls-Solé J, Deuschl G. Reflex responses, silent period and long latency reflexes. In: Kimura J, Daube JR, Mauguière F, editors. *Peripheral nerve diseases*. Amsterdam: Elsevier; 2006. p. 237–62. ISBN 0444513882.
- Van den Berg C, Beek PJ, Wagenaar RC, van Wieringen PC. Coordination disorders in patients with Parkinson's disease: a study of paced rhythmic forearm movements. *Exp Brain Res* 2000;134:174–86.
- Werring DJ, Clark CA, Droogan AG, Barker GJ, Miller DH, Thompson AJ. Water diffusion is elevated in widespread regions of normal-appearing white matter in multiple sclerosis and correlates with diffusion in focal lesions. *Mult Scler* 2001;7:83–9.
- Zaimi B, Edgley SA, Soteropoulos DS, Baker SN. Changes in descending motor pathway connectivity after corticospinal tract lesion in macaque monkey. *Brain* 2012;135:2277–89.
- Zeller D, Dang SY, Stefan K, Biller A, Bartsch A, Saur D, et al. Functional role of ipsilateral motor areas in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82:578–83.

VII. Síntesis de Resultados y Discusión

Con la realización de la presente tesis doctoral hemos confirmado nuestras hipótesis experimentales basadas en las características del sustrato neuropatológico típico en EM que favorecen la falta de control reflejo y motor en estos pacientes. Los hallazgos revelados en los tres artículos científicos expuestos aportan información relevante desde el punto de vista fisiopatológico sobre el rol del daño focal en situación anatómica estratégica con afectación de vías neurales de conducción específicas a nivel cerebral que se asocian a manifestaciones mayoritariamente subclínicas, aunque no por ello menos relevantes.

1. Trabajo 1

Este trabajo ha sido orientado a investigar la excitabilidad y el grado de simetría de los circuitos reflejos tronco-encefálicos en pacientes con EMRR, según el objetivo específico 1, habiendo examinado de forma extensa el reflejo de parpadeo desde el punto de vista neurofisiológico. El circuito del reflejo de parpadeo comprende la activación periférica de los nervios trigémino y facial, y la integración central de impulsos a nivel tronco-encefálico. La excitabilidad del circuito trigémino-facial puede ser modulada sea desde estructuras supratentoriales (corteza cerebral, ganglios de la base) a través de impulsos de naturaleza excitatoria y/o inhibitoria (Berardelli y cols., 1983a; Girlanda y cols., 1984), como desde impulsos sensoriales activados en paralelo a través de otros circuitos a nivel espinal como encefálico. Para el estudio de la excitabilidad refleja hemos utilizado una batería de medidas electrofisiológicas que comprenden la amplitud de R1 y el cociente R2c/R2 del reflejo de parpadeo trigeminal, el SBR, la curva BRER y el BRIP. Cabe destacar que éste es el primer estudio realizado en una cohorte de pacientes con EM que investiga de manera exhaustiva las alteraciones del reflejo de parpadeo (evocado y modulado por aferencias de modalidad diversa) y la asociación con la distribución neuropatológica de lesiones encefálicas examinada con técnicas cuantitativas de RMN.

Como resultado del primer artículo, hemos encontrado en 8 de 20 pacientes (40%) una asociación entre el retraso de las latencias de las respuestas del reflejo de parpadeo y la presencia de lesiones focales en el bulbo y/o la protuberancia del tronco-encéfalo (87.5%; la excepción fue 1 paciente que presentó exclusivamente una lesión de localización mesencefálica), sin historia clínica remota o actual de haber presentado mioquimias faciales en ninguno de estos pacientes. De hecho, considerando exclusivamente las latencias de las respuestas, se ha descrito previamente una prevalencia de alteraciones del reflejo de parpadeo en pacientes con EM entre el 26 y 78% en la era pre-RMN, y de entre el 40 y 91% en la era de la RMN (Namerrow y Etemadi, 1970; Kimura, 1970, 1975b; Khosbin y Hallett, 1981;

Sanders y cols., 1985; Nazliel y cols., 2002; Klissurski y cols., 2009; Degirmenci y cols., 2013), muy similares a la obtenida en esta tesis. Este resultado representa la frecuencia de los pacientes en los cuales existe una alteración en la conducción a través del circuito reflejo trigémino-facial como consecuencia de una lesión focal.

El hallazgo más relevante y novedoso del Trabajo 1 se relaciona con la excitabilidad del reflejo de parpadeo. En 7 (35%) pacientes distintos de aquellos con alteraciones en las

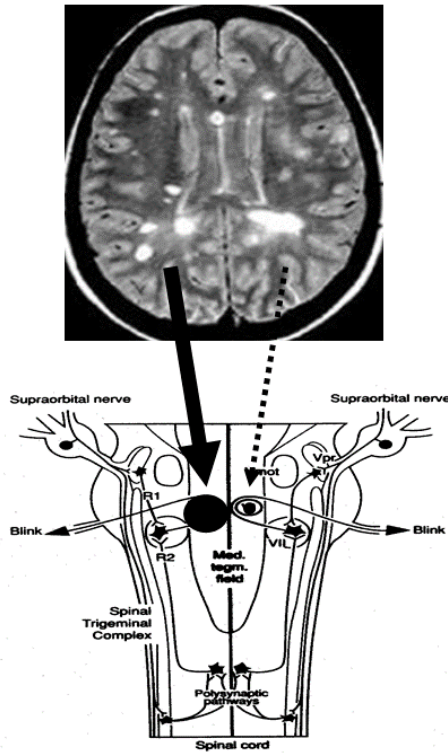


FIGURA 13. *Modulación supranuclear asimétrica (por distribución lesional desigual entre los hemisferios) sobre la excitabilidad del control reflejo tronco-encefálico en EM. El efecto neto (balance entre excitación e inhibición) de las influencias supranucleares es representado por el grosor de las flechas (a mayor grosor mayor excitación, y viceversa), mientras la excitabilidad de la vía de salida del circuito reflejo (motoneurona del facial) es representada por el tamaño del círculo. Adaptado de: Cruccu y cols., 1991.*

latencias, el reflejo de parpadeo mostró como única alteración una significativa asimetría en el tamaño de las respuestas R2 entre ambos lados del rostro, es decir una relación o cociente entre las repuestas R2 contralateral e ipsilateral mayor de 1. En 4 de estos pacientes se constató el antecedente reciente o remoto de mioquimias faciales y ninguno de ellos mostró lesiones bulbo-protuberanciales en la RMN. A destacar, así mismo, es la distribución asimétrica de lesiones a nivel supratentorial entre ambos hemisferios, a diferencia del grupo de pacientes con latencias retrasadas del reflejo de parpadeo que mostraron mayor carga lesional supratentorial y una distribución simétrica de las lesiones hemisféricas. Ambos subgrupos también se diferenciaron en que el primero se sitúa desde el punto de vista clínico en una etapa más precoz

de enfermedad con respecto al segundo. Los diferencias de tamaño observadas en las respuestas en OOc (cociente $R2c/R2 > 1$) se vieron confirmadas con el estudio de la curva de recuperación de la excitabilidad del reflejo de parpadeo (BRER), la cual fue significativamente asimétrica en el grupo de pacientes con alteraciones del cociente $R2c/R2$, con un significativo

aumento de excitabilidad en coincidencia con el lado donde las respuestas R2 eran de mayor tamaño. Una tendencia similar fue encontrada con respecto a la amplitud de R1, cuya diferencia entre lados fue significativamente asimétrica en estos pacientes. El conjunto de estos hallazgos sugiere que lesiones desmielinizantes supratentoriales pueden ejercer un efecto neto asimétrico (desbalance entre excitación e inhibición) sobre vías modulatorias descendentes cortico-nucleares que controlan el reflejo de parpadeo a ambos lados del tronco-encéfalo, lo que explica la asimetría en respuestas entre ambos lados del rostro (**Figura 13**).

En la discusión del manuscrito se postula que pueden coexistir varios mecanismos simultáneamente y desencadenar el efecto neto observado. Dichas alteraciones pueden situarse en distintas localizaciones del circuito reflejo (por ejemplo, en la cadena de interneuronas inhibitorias, en la motoneurona del nervio facial, entre otros). En efecto, ésta es una explicación plausible para la presencia y generación de mioquimias en la ausencia de lesiones bulbo-protuberanciales, como ya ha sido reportado en pacientes con EM (Jacobs y cols., 1994; Sedaro y cols., 2000; Dupeyron y cols., 2001). Las mioquimias faciales representan un fenómeno de hiperactividad ocasionado por la generación focal de descargas ectópicas a nivel nuclear o perinuclear facial frecuentemente encontrado en pacientes con EM (Gutmann y cols., 1993). Nuestros resultados sugieren que lesiones localizadas a distancia a nivel supranuclear podrían afectar de modo asimétrico la excitabilidad de los circuitos trigémino-faciales y favorecer fenómenos de hiperactividad facial, como por ejemplo, las descargas mioquímicas. En EM, las mioquimias faciales se suelen auto-limitar a unas pocas semanas (Silva y Pearce, 1972; Gutmann y Gutmann, 2004), típicamente entre dos semanas y seis meses, y raramente sobrepasan el año (Jacobs y cols., 1994). Sin embargo, se han descrito casos de pacientes con EM con mioquimias faciales de reciente aparición en las que la RMN no ha evidenciado una nueva lesión a nivel protuberancial (Sedano y cols., 2000; Dupeyron y cols., 2001). Algunos autores (Jacobs y cols., 1994; Parísí y cols., 2013) han propuesto la ausencia de lesión objetivable por estudios de imagen como consecuencia de la resolución de la lesión en concomitancia o precozmente después del cese del cuadro clínico en la mayoría de los sujetos que fueron estudiados. Otros autores (Emre Öge y cols., 1996; Sedano y cols., 2000) han propuesto que no sería necesario la presencia de una lesión focal a nivel bulbo-protuberancial en la generación de mioquimias faciales en EM, y que se podría explicar debido a la existencia de una hiperexcitabilidad de las fibras del nervio facial a nivel intra-axial debido a una posible des-aferentización funcional de las vías inhibitorias de su núcleo causada por las lesiones desmielinizantes a nivel supranuclear, de manera similar a lo sugerido por nuestros resultados. Los hallazgos del Trabajo 1 corroboran fuertemente las hipótesis realizadas previamente en

pacientes con ictus en la era pre-RMN del posible efecto de las influencias de estructuras supratentoriales sobre el control reflejo a nivel tronco-encefálico (Berardelli y cols., 1983a; Girlanda y cols., 1984) e investigado previamente solamente de manera parcial en pacientes con EM (Mikropoulos y cols., 2010), y que se sustentan con firmeza gracias a los resultados presentados aquí. El hallazgo de un cociente $R2c/R2$ alterado en pacientes con EM podría representar un indicador precoz de enfermedad a ser evaluado en futuras investigaciones.

En resumen, hemos encontrado una subpoblación de pacientes con EM que: 1. Muestran falta de control reflejo sobre los circuitos trigémino-faciales de manera unilateral, sin presentar alteración de la conducción a través del circuito del reflejo de parpadeo (latencias normales); 2. Se hallan en un estadio más precoz de enfermedad que los que no presentan dicha alteración, sea desde el punto de vista clínico como en magnitud de carga lesional; 3. En los cuales la alteración de la excitabilidad refleja se correlaciona con una distribución asimétrica de las lesiones evidenciadas por RMN a nivel supratentorial hemisférico. El conjunto de estos hallazgos sugiere que lesiones desmielinizantes supratentoriales pueden ejercer un efecto asimétrico sobre vías modulatorias descendentes cortico-nucleares que controlan el reflejo de parpadeo, lo que explica la asimetría en respuestas electrofisiológicas entre ambos lados y, de este modo, estar posiblemente relacionadas con fenómenos de hiperactividad facial en ausencia de lesiones bulbo-protuberanciales.

2. Trabajo 2

En consideración del objetivo específico número 2, el diseño experimental del Trabajo 2 ha sido orientado a investigar en pacientes con EM la integridad de las vías comisurales interhemisféricas y el grado de excitabilidad de los circuitos subcorticales involucrados en la preparación de un acto motor. En paradigmas de tiempo de reacción simple de activación balística, como el que se ha usado en la realización de esta tesis, los sujetos pueden preparar detalladamente su programa motor dado que conocen de antemano la tarea a ejecutar (Hallett, 1990; Pascual-Leone y cols., 1992a,b; Henderson y Dittrich, 1998). En este paradigma, el tiempo de reacción es una medida fiable de la integridad y excitabilidad de las estructuras y circuitos motores implicados en la ejecución de la tarea.

Los resultados del Trabajo 2 evidenciaron que en un paradigma de tiempo de reacción los pacientes con EM muestran lentitud en la ejecución de una tarea motora simple en comparación con sujetos sanos, un hallazgo previamente reportado en EM (Zeller y cols., 2001; Stoquart-Elsankari y cols., 2010) que ha sido atribuido mayormente a fenómenos de deterioro

en la función cognitiva y en el nivel atencional (Kujala y cols., 1995; Kail, 1998; De Sonneville y cols., 2002; Godefroy y cols., 2002). En términos generales, nuestros resultados muestran que la lentitud motora se correlacionó directamente con un enlentecimiento discreto del tiempo de conducción por vías primarias sensitivas y motoras, examinado mediante el estudio de los PEs. La afectación focal de vías de conducción sensorial o motora en el SNC es esperable como parte del daño multifocal y aleatorio típicamente encontrado en EM. Sin embargo, la sola dispersión espacial en la conducción de las voleas de comandos sensitivos y motores, no es capaz de explicar por sí solo el retraso claramente mayor observado en el tiempo de reacción.

Específicamente, hemos encontrado que el enlentecimiento motor en pacientes con EM se manifestó en dos situaciones experimentales concretas: 1. Durante la ejecución de tareas que requieren transferencia inter-hemisférica de información (condición de tiempo de reacción “cruzado”); 2. Durante la ejecución de tareas que involucran la activación subcortical de circuitos (condición de tiempo de reacción y efecto *StartReact*). Los hallazgos de ambas situaciones pueden encontrar explicación en el sustrato neuro-patológico específico de la EM previamente descrito. De la primera situación experimental, el retraso en el tiempo de reacción “cruzado” observado en pacientes con EM se correlacionó directamente con la prolongación del tiempo de conducción transcalloso medido por EMT, lo que sugiere que el daño de vías comisurales está en directa relación con el enlentecimiento motor observado en tareas cruzadas de integración sensitivo-motora. La disfunción inter-hemisférica en pacientes con EM ha sido previamente examinada mediante las pruebas neurofisiológicas de la audición dicotómica, la localización táctil cruzada del dedo, el *finger tapping* alternado y el iSP (Lindeboom y ter Horst, 1988; Pelletier y cols., 1993; Barkhof y cols., 1998). Desde el punto de vista metodológico es interesante notar la utilidad del estudio del tiempo transcalloso para la interpretación de los hallazgos presentados. En estudios previos la sensibilidad del iSP como prueba utilizada en la detección de la afectación callosa en pacientes con EM ha sido puesta en entredicho con resultados discordantes (Boroogerdi y cols., 1998; Höppner y cols., 1999; Schmierer y cols., 2002). Utilizando la latencia inicial y/o la duración del iSP como parámetros diagnósticos de dicha afectación, la sensibilidad de la prueba puede variar entre 28 y 80% en etapas precoces de enfermedad. Estas discrepancias pueden estar relacionadas con factores técnicos de adquisición del parámetro neurofisiológico (por ejemplo, el uso de músculos diferentes en el registro de la mano, FDI vs abductor breve del pulgar), como a la obtención de un parámetro falsamente positivo por lesiones localizadas “aguas abajo” en el sistema del tracto cortico-espinal contralateral (Jung y cols., 2006). En relación al último aspecto, en este trabajo hemos reparado en esta dificultad normalizando la latencia inicial del iSP (en cuyo valor total se incluye el tiempo de conducción a través de la vía cortico-espinal contralateral)

por la latencia inicial del PEM obtenido por EMT del hemisferio opuesto, una metodología ya reportada previamente (Schmierer y cols., 2000), con la cual se obtiene un valor que es representativo exclusivamente del tiempo de conducción transcalloso o inter-hemisférico. De este modo, hemos encontrado en pacientes con EM una significativa correlación entre el tiempo transcalloso y la diferencia calculada entre los tiempos de reacción cruzado y no cruzado. Podemos decir, en consecuencia, que el cálculo del tiempo de conducción

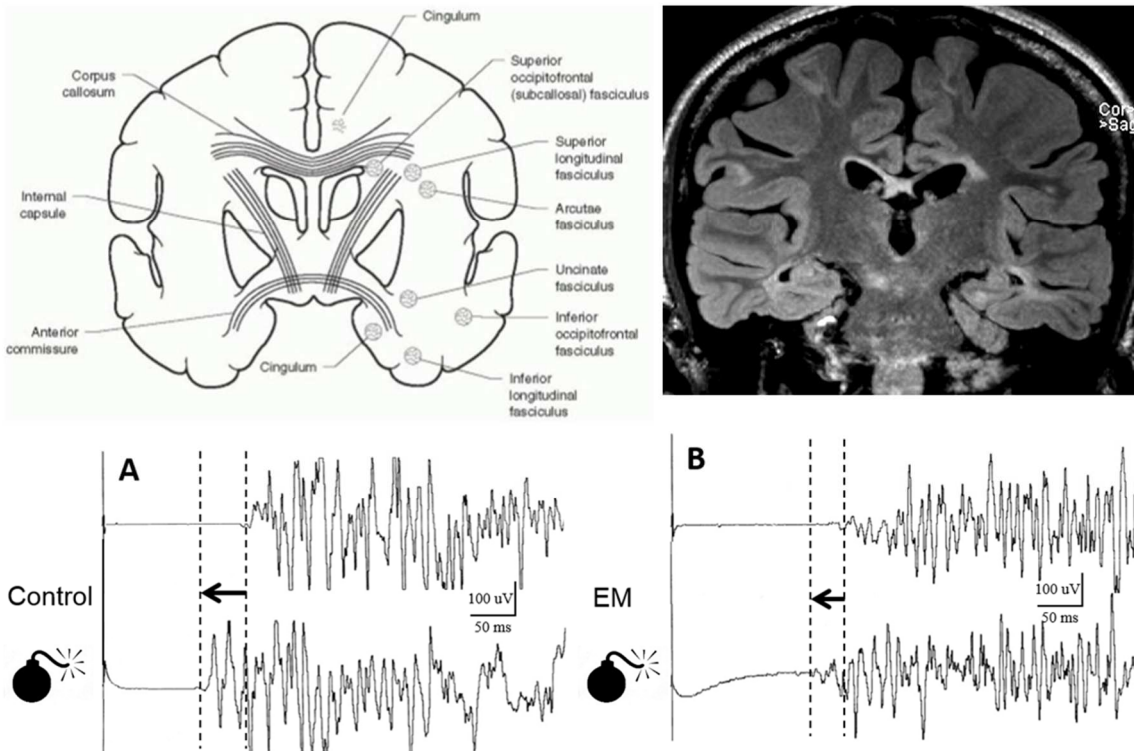


FIGURA 14. Arriba, representación gráfica y por neuroimagen (RMN, corte coronal en secuencia FLAIR) del encéfalo de las principales vías anatómicas comisurales en condiciones normales (izquierda, cuerpo calloso y comisura blanca anterior) y de la afectación de estructuras de línea media en un paciente con EM (derecha, hiperintensidades de sustancia blanca), respectivamente. Abajo, diferencias en el efecto StartReact entre un sujeto sano y un paciente con EM en el cual existe daño de estructuras subcorticales y comisurales que participan en la preparación motora, observándose una menor aceleración (longitud de flecha) en la reacción con sobresalto (bomba) con respecto a control.

transcalloso por estudio de EMT es una medida confiable de la conducción inter-hemisférica. Además, en nuestro estudio confirmamos que la ejecución de una tarea motora en el contexto de un tiempo de reacción “cruzado” puede ser utilizada como un paradigma que ciertamente involucra integración sensitivo-motora con transferencia inter-hemisférica de información, de manera similar a otras técnicas neurofisiológicas. Otros autores utilizando estudios con RMN funcional han demostrado que durante la ejecución de tareas unimanuales los pacientes con EM presentan incapacidad para focalizar la actividad cerebral en el hemisferio cerebral involucrado en el control del comando motor, es decir, en el hemisferio contralateral a la

ejecución del movimiento (Manson y cols., 2008; Zeller y cols., 2011). Además, se ha observado un aumento del reclutamiento funcional en las áreas corticales sensitivo-motoras del hemisferio homólogo (que, en condiciones fisiológicas no participa directamente en el comando primario de la ejecución de la tarea), lo cual sugiere disfunción en los mecanismos de inhibición transcallosa. Podemos concluir, de la primera condición experimental del Trabajo 2, que la disfunción en los mecanismos de integración sensitivo-motora en la preparación de un acto motor es un fenómeno fundamental en la lentitud motora observada en pacientes con EM, y que dicho fenómeno puede subyacer específicamente en el sustrato neuro-patológico de afectación de vías comisurales propio de la EM, mayormente de aquellas que transcurren por el cuerpo caloso.

Adicionalmente, para la evaluación de los mecanismos de preparación motora subcortical hemos examinado en el Trabajo 2 la reacción motora en respuesta a la señal imperativa, acompañada de un estímulo auditivo que provoca sobresalto (fenómeno *StartReact*). En condiciones fisiológicas, un EAS aumenta la excitabilidad de los circuitos subcorticales y acelera la ejecución del programa motor previamente preparado (Valls-Solé y cols., 1995, 1999), observándose un acortamiento del tiempo de reacción, conocido como efecto *StartReact*. En esta situación experimental, cuantificamos que los pacientes con EM muestran una reducción significativa del efecto *StartReact* que se manifestó sin relación con el paradigma de tiempo de reacción utilizado (“cruzado” vs “no cruzado”) en la ejecución de la tarea motora. El fenómeno *StartReact* se genera probablemente a nivel subcortical por activación de vías descendentes retículo-espinales, cuya energización es proporcional al grado de aceleración en la respuesta motora observada en condiciones fisiológicas y que es fundamental en los mecanismos de preparación que ocurren previamente a la ejecución de un acto motor (Valls-Solé y cols., 1999; Nonnekes y cols., 2014). Esto se correlaciona con los hallazgos de un estudio de Leocani y cols. (2005), el cual enfatiza la importancia de las conexiones cortico-corticales y cortico-subcorticales en la falta de preparación motora en pacientes con EM con significativa carga lesional cerebral en los cuales se observó una desincronización del ritmo electroencefalográfico *mu*. El hallazgo de una ineficiente preparación motora como mecanismo involucrado también puede encontrar explicación neuro-patológica en la afectación predominante que ocurre a nivel subcortical y específicamente en el tronco-encéfalo de pacientes con EM, de manera similar como ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por significativa pérdida neuronal a nivel tronco-encefálico (Valdeoriola y cols., 1998).

En resumen, los hallazgos del Trabajo 2 sugieren en su conjunto que el enlentecimiento motor típicamente observado en EM se asocia a una reducida energización de

los mecanismos de preparación subcortical para la ejecución de un programa motor, como también a una ineficiente integración de la información sensitivo-motora relacionada con la transferencia inter-hemisférica (**Figura 14**). Sin embargo, esto no descarta que otros mecanismos ya propuestos tales como la disfunción atencional y cognitiva, la fatiga muscular (Morgante y cols., 2011), entre otros, estén contribuyendo a la explicación del enlentecimiento motor.

3. Trabajo 3

En el trabajo 3 hemos utilizado el paradigma de tiempo de reacción “cruzado” y técnicas de RMN avanzada para estudiar la integridad de las vías comisurales del cuerpo calloso y tronco-encéfalo en relación al control motor durante la ejecución de movimientos estrictamente unimanuales. Hemos demostrado que los pacientes con EM muestran una significativa falta de control motor sobre actividad sincinética durante la ejecución de tareas unimanuales, manifestada como actividad electromiográfica en “espejo” (mEMG) exagerada. Adicionalmente, hemos observado que la presencia de mEMG en pacientes con EM se asocia a la afectación de estructuras comisurales cuantificado por estudios de RMN. El daño anatómico se observó mayormente a nivel microestructural del cuerpo calloso y a nivel estructural del tronco-encéfalo.

Específicamente, la actividad en “espejo” fue observada en musculatura homóloga del miembro opuesto al que ejecuta la acción, de manera subclínica en la mayoría de los pacientes, con excepción de 2 pacientes en los cuales se observaron consistentemente movimientos en espejo. La mEMG se manifestó con mayor frecuencia y amplitud en los pacientes que en los sujetos sanos, especialmente en la condición de reacción “cruzada”, es decir, en aquella en que la señal imperativa de tipo somatosensorial fue aplicada en una extremidad y la reacción debía realizarse con la extremidad contralateral. Esta metodología (paradigma de tiempo de reacción “cruzado”) necesariamente involucra, primero, el tránsito de *inputs* generados por la información sensorial procesada (señal imperativa de naturaleza somestésica) que deben ser transferidos al hemisferio contralateral a través de vías comisurales para su integración y posterior elaboración de la respuesta motora adecuada y, segundo, la participación activa de comandos inhibitorios a través de vías inter-hemisféricas que impidan la activación de musculatura no deseada.

Es interesante notar que los movimientos en espejo han sido descritos ampliamente en otras enfermedades neuro-psiquiátricas (Parkinson, Huntington, esquizofrenia) pero no en EM. Aunque la generación de la actividad en espejo ha sido mayormente atribuida a un

defectuoso mecanismo de inhibición inter-hemisférica (Hübers y cols., 2008), otros mecanismos también han sido involucrados (**Figura 15**), como la persistencia de un haz cortico-espinal ipsilateral no decusado (**Fig.15A y B**), la actividad generada desde el mismo hemisferio pero distribuido distalmente al lado contralateral (**Fig.15C**), la hiperactividad del haz cortico-espinal contralateral o bien al *overflow* (excesiva actividad motora de salida; **Fig.15D**) desde el haz

voluntariamente activado, entre otras causas (Mayston y cols., 1999). Utilizando nuestro paradigma de reacción cruzada, dos posibles mecanismos podrían estar teóricamente involucrados en la generación de la mEMG: 1. El *overflow* desde el hemisferio que comanda la orden motora, que llegaría a activar circuitos contralaterales; 2. La hiperactividad o exceso de función en corteza motora del hemisferio opuesto. Nuestros resultados mostraron que la actividad en espejo observada en pacientes se asocia mayormente a una hiperactividad en el hemisferio cerebral opuesto a donde el comando motor es

generado. Efectivamente, varios autores han descrito que los pacientes con EM muestran una capacidad defectuosa de focalizar la actividad cerebral durante la realización de tareas unimanuales observándose una exagerada activación o reclutamiento de regiones cerebrales del hemisferio contralateral (Zeller y cols., 2011), que podría ser de manera compensatoria para restituir la función deficitaria como indicativo de falta de inhibición trans-hemisférica.

Desde el punto de vista neuroanatómico, los resultados del Trabajo 3 muestran que la presencia de actividad en espejo en pacientes con EM se asocia a daño axonal del cuerpo calloso y a atrofia del tronco-encéfalo examinados por técnicas no convencionales de RMN. Es bien conocido que el cuerpo calloso es la principal estructura comisural del cerebro. En

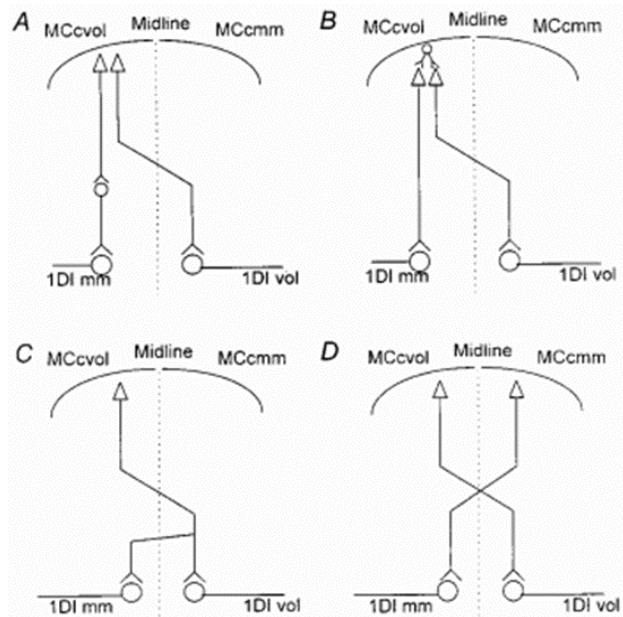


FIGURA 15. Mecanismos posiblemente involucrados en la generación de actividad en espejo. La vía de conducción cortico-espinal involucrada en el movimiento voluntario (decusada) es representada en cada panel junto con la vía de conducción que participa adicionalmente en la generación de la actividad sincinética no deseada: vía ipsilateral (A y B), ramificación distal de vía motora primaria (C) o vía contralateral (D). De: Mayston y cols., 1999.

pacientes con EM, son indicadores de afectación callosa tanto la presencia de lesiones desmielinizantes focales como la atrofia del cuerpo caloso, que pueden ser reveladas incluso en etapas precoces de enfermedad (Simon y cols., 1986; Gean-Marton y cols., 1991). En nuestro estudio, la carga lesional del cuerpo caloso no se correlacionó con mEMG pero sí lo fueron las medidas de daño microestructural por DTI (MD y AD). Las alteraciones encontradas en AD sugieren daño axonal microestructural en los tractos examinados (Boretius y cols., 2012). De este modo, la asociación encontrada entre la presencia de mEMG y el mayor daño axonal del cuerpo caloso (sin observarse diferencias en la carga lesional), sugieren que la actividad en espejo está relacionada con la presencia de lesiones hemisféricas y degeneración axonal walleriana secundaria de fibras trans-hemisféricas (que transcurren por el cuerpo caloso) y no a la interrupción directa de la conducción ocasionada por lesiones localizadas en el cuerpo caloso. El típico patrón de afectación callosa en “dedos de Dawson” es característico de un sustrato multi-lesional de tipo desmielinizante (confluencia de lesiones focales), más frecuentemente observado en estadios moderados y más avanzados de enfermedad. Es interesante considerar, sin embargo, que los hallazgos de este estudio se presentan en una población de pacientes con EMRR en un estadio más bien leve-moderado de enfermedad (EDSS<6) en los cuales el patrón de “dedos de Dawson” no es la regla, y que, por lo tanto, no podemos extrapolar estos efectos necesariamente a pacientes con estadios de la enfermedad más avanzados. Finalmente, se ha encontrado que la actividad en espejo se asocia a atrofia del tronco-encéfalo, la cual ha sido efectivamente reportada como un hallazgo habitual incluso en etapas precoces de EM (De Stefano y cols., 2001; Chard y cols., 2002b). A cada lado del tronco del encéfalo discurren en forma paralela los tractos cortico-espinales. Conexiones entre tractos cortico-espinales homólogos a través de interneuronas inhibitorias participan ciertamente en el control de la ejecución de tareas unimanuales a nivel infratentorial y espinal (Peterson y cols., 1975; Soteropoulos y cols., 2013). Aunque no se descarta que la atrofia tronco-encefálica sea un epi-fenómeno en pacientes con EM con mayor carga lesional en relación a estadios más avanzados de enfermedad (lo cual específicamente no ha sido examinado en detalle en este estudio), los resultados de este estudio muestran que la disfunción de estructuras cerebrales de la línea media sea a nivel supra-tentorial (cuerpo caloso) como infra-tentorial (tronco del encéfalo) impiden un correcto control unimanual.

VIII. Conclusiones

Actualmente, la EM es una de las enfermedades neurológicas que genera mayor discapacidad en personas activas laboralmente como consecuencia del curso crónico y lentamente progresivo en su evolución. El estudio de los mecanismos involucrados en la discapacidad funcional de aparición precoz es fundamental para orientar nuevas formas de tratamiento y eventualmente de prevención.

Esta tesis revela resultados que son relevantes desde el punto de vista fisiopatológico, neuroanatómico y clínico en los pacientes con EMRR. Primero, se confirma con técnicas neurofisiológicas que los pacientes con EM ya desde estadios con bajo grado de afectación neurológica (por escalas clínicas y cuantificación de carga lesional encefálica) presentan alteraciones subclínicas de la excitabilidad del control reflejo tronco-encefálico. Estas alteraciones se asocian a un efecto modulador anormal ocasionado por lesiones “a distancia” y distribuidas asimétricamente en los hemisferios cerebrales. Segundo, se ha evidenciado que la lentitud de reacción motora (típicamente atribuida a deterioro cognitivo) se relaciona significativamente con una disfunción en los mecanismos de preparación motora que involucra circuitos subcorticales y vías comisurales de integración sensitivo-motora. Tercero, los pacientes con EM muestran una falta de control con incapacidad de focalizar la actividad motora voluntaria en un segmento corporal, observándose que tal disfunción subyace en el daño de estructuras encefálicas de la línea media que conectan las vías motoras de ambos lados. En conjunto, estos hallazgos neurofisiológicos revelan las consecuencias funcionales del patrón típico de daño estructural en pacientes con EMRR: distribución de lesiones sub-hemisféricas de manera aleatoria en estadios iniciales de enfermedad, y predilección por afectación de estructuras comisurales como el cuerpo caloso y el tronco del encéfalo.

Los beneficios directos de la presente tesis doctoral permiten explicar: 1. Los fenómenos fisiopatológicos relevantes que ocurren en pacientes con EM en una etapa relativamente precoz de enfermedad y que pueden ser utilizados potencialmente como marcadores diagnósticos y de evolución (como por ejemplo, el cociente $R2c/R2$) y, 2. Los mecanismos neurofisiológicos asociados al sustrato neuropatológico típico que participan en la discapacidad de los pacientes con EM (por ejemplo, la bradicinesia y la falta de control motor). Esto permitirá posiblemente en el futuro buscar estrategias específicas para evitar el daño o compensar los mecanismos deficitarios encontrados en estos pacientes. En una época en la cual los estudios de neuroimagen han mostrado un auge como técnicas diagnósticas del sustrato neuropatológico a nivel estructural, en contrapartida, es fundamental reforzar la utilidad de las técnicas neurofisiológicas como una de las principales herramientas diagnósticas

en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en los trastornos de la excitabilidad refleja y del control motor de las enfermedades neurológicas (como ocurre en EM), los cuales no son susceptibles de ser examinados con similar profundidad y especificidad con otras técnicas diagnósticas.

IX. Bibliografía

- 1.** Alpini D, Pugnetti L, Caputo D, Cornelio F, Capobianco S, Cesarani A. Vestibular evoked myogenic potentials in multiple sclerosis: clinical and imaging correlations. *Mult Scler.* 2004;10(3):316-21.
- 2.** Abbruzzese G, Berardelli A. Sensorimotor integration in movement disorders. *Mov Disord.* 2003;18(3):231-40.
- 3.** Aoyama M, Hongo T, Kudo N, Tanaka R. Convergent effects from bilateral vestibulospinal tracts on spinal interneurons. *Brain Res* 1971;35:250–253.
- 4.** Armatas CA, Summers JJ, Bradshaw JL. Mirror movements in normal adult subjects. *J Clin Exp Neuropsychol* 1994;16(3):405-13.
- 5.** Barker AT, Jalinous R, Freeston IL. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet.* 1985;1(8437):1106-7.
- 6.** Barkhof FJ, Elton M, Lindeboom J, Tas MW, Schmidt WF, Hommes OR, Polman CH, Kok A, Valk J. Functional correlates of callosal atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. A preliminary MRI study. *J Neurol.* 1998;245(3):153-8.
- 7.** Basso MA, Evinger C. An explanation for reflex blink hyperexcitability in Parkinson's disease. II. Nucleus raphe magnus. *J Neurosci.* 1996;16(22):7318-30.
- 8.** Basso MA, Powers AS, Evinger C. An explanation for reflex blink hyperexcitability in Parkinson's disease. I. Superior colliculus. *J Neurosci.* 1996;16(22):7308-17.
- 9.** Berardelli A, Accornero N, Cruccu G, Fabiano F, Guerrisi V, Manfredi M. The orbicularis oculi response after hemispherical damage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1983a;46:837–843.
- 10.** Berardelli A, Rothwell JC, Day BL, Marsden CD. Pathophysiology of blepharospasm and oromandibular dystonia. *Brain.* 1985;108(Pt 3):593-608.
- 11.** Berardelli A, Sabra AF, Hallett M, Berenberg W, Simon SR. Stretch reflexes of triceps surae in patients with upper motor neuron syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1983b;46(1):54-60.
- 12.** Berardelli A, Rothwell JC, Day BL, Marsden CD. The pathophysiology of cranial dystonia. *Adv Neurol.* 1988;50:525-35.
- 13.** Bettoni L, Bortone E, Dascola I, Delsoldato S, Giorgi C, Mancina D. The masseteric inhibitory reflex in the diagnosis of multiple sclerosis. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* 1998;38(1):11-7.
- 14.** Blumenthal TD1, Goode CT. The startle eyeblink response to low intensity acoustic stimuli. *Psychophysiology.* 1991;28(3):296-306.

15. Bonfiglio L, Rossi B, Sartucci F. Prolonged intracortical delay of long-latency reflexes: electrophysiological evidence for a cortical dysfunction in multiple sclerosis. *Brain Res Bull.* 2006;69(6):606-13.
16. Boretius S, Escher A, Dallenga T, Wrzos C, Tammer R, Brück W, Nessler S, Frahm J, Stadelmann C. Assessment of lesion pathology in a new animal model of MS by multiparametric MRI and DTI. *Neuroimage* 2012;59(3):2678-88.
17. Boroojerdi B, Hungs M, Mull M, Töpper R, Noth J. Interhemispheric inhibition in patients with multiple sclerosis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1998;109(3):230-7.
18. Brown P, Rothwell JC, Thompson PD, Britton TC, Day BL, Marsden CD. New observations on the normal auditory startle reflex in man. *Brain.* 1991;114 (Pt 4):1891-902.
19. Brum M, Cabib C, Valls-Solé J. Clinical Value of the Assessment of Changes in MEP Duration with Voluntary Contraction. *Front Neurosci.* 2016;9:505.
20. Brunia CH. Waiting in readiness: gating in attention and motor preparation. *Psychophysiology.* 1993;30(4):327-39.
21. Caramia MD, Palmieri MG, Desiato MT, Boffa L, Galizia P, Rossini PM, Centonze D, Bernardi G. Brain excitability changes in the relapsing and remitting phases of multiple sclerosis: a study with transcranial magnetic stimulation. *Clin Neurophysiol.* 2004;115(4):956-65.
22. Carlsen AN, Chua R, Inglis JT, Sanderson DJ, Franks IM. Can prepared responses be stored subcortically? *Exp Brain Res.* 2004;159(3):301-9.
23. Carlsen AN, Chua R, Inglis JT, Sanderson DJ, Franks IM. Prepared movements are elicited early by startle. *J Mot Behav* 2004;36:253–264.
24. Casanova-González MF, Cabrera-Gómez JA, Aquino-Cías J, Aneiros-Rivas R, Fernández-Bermúdez R. Neurophysiological assessment in patients with clinically defined multiple sclerosis with special reference to P300 wave study]. *Rev Neurol.* 1999;29(12):1134-7.
25. Chard DT, Griffin CM, McLean MA, Kapeller P, Kapoor R, Thompson AJ, Miller DH. Brain metabolite changes in cortical grey and normal-appearing white matter in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain.* 2002a;125(Pt 10):2342-52.
26. Chard DT, Griffin CM, Parker GJ, Kapoor R, Thompson AJ, Miller DH. Brain atrophy in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain.* 2002b;125(Pt 2):327-37.
27. Chiappa KH. Use of evoked potentials for diagnosis of multiple sclerosis. *Neurol Clin.* 1988;6(4):861-80.
28. Cohen LG, Ludlow CL, Warden M, Estegui M, Agostino R, Sedory SE, Holloway E, Dambrosia J, Hallett M. Blink reflex excitability recovery curves in patients with spasmodic dysphonia. *Neurology.* 1989;39(4):572-7.

29. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002;359(9313):1221-31.
30. Conte A, Lenzi D, Frasca V, Gilio F, Giacomelli E, Gabriele M, Bettolo CM, Iacovelli E, Pantano P, Pozzilli C, Inghilleri M. Intracortical excitability in patients with relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol*. 2009;256(6):933-8.
31. Cooper R, Mauguière F, Osselton JW, Prior PF, Tedman BM. Evoked potentials. In: *Clinical Neurophysiology: EMG, Nerve Conduction and Evoked Potentials (revised and enlarged edition)*. London: Elsevier, 2004, vol.1, p.355–401.
32. Cruccu G, Iannetti GD, Marx JJ, Thoemke F, Truini A, Fitzek S, Galeotti F, Urban PP, Romaniello A, Stoeter P, Manfredi M, Hopf HC. Brainstem reflex circuits revisited. *Brain*. 2005;128(Pt 2):386-94.
33. Davis M, Gendelman DS, Tischler MD, Gendelman PM. A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies. *J Neurosci*. 1982;2(6):791-805.
34. De Silva KL, Pearce J. Facial myokymia: a clue to the diagnosis of multiple sclerosis. *Postgrad Med J*. 1972;48(565):657-62..
35. De Sonneville LM, Boringa JB, Reuling IE, Lazeron RH, Adèr HJ, Polman CH. Information processing characteristics in subtypes of multiple sclerosis. *Neuropsychologia*. 2002;40(11):1751-65.
36. De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Arnaoutelis R, Tartaglia MC, Antel JP, Matthews PM, Arnold DL. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol*. 2001;58(1):65-70.
37. Degirmenci E1, Erdogan C, Bir LS. Correlation between blink reflex abnormalities and magnetic resonance imaging findings in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg*. 2013;113(3):265-9.
38. Deltenre P, Van Nechel C, Vercruyssen A, Strul S, Capon A, Ketelaer P. Results of a prospective study on the value of combined visual, somatosensory, brainstem auditory evoked potentials and blink reflex measurements for disclosing subclinical lesions in suspected multiple sclerosis. *Adv Neurol*. 1982;32:473-9.
39. Dengler R, Kossev A, Gippner C, Struppler A. Quantitative analysis of blink reflexes in patients with hemiplegic disorders. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1982;53(5):513-24.
40. Desikan RS, Ségonne F, Fischl B, Quinn BT, Dickerson BC, Blacker D, Buckner RL, Dale AM, Maguire RP, Hyman BT, Albert MS, Killiany RJ. An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage* 2006;31(3):968-80.

41. Deuschl G, Lüking CH. Physiology and clinical applications of hand muscle reflexes. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl.* 1990;41:84-101.
42. Deuschl G, Strahl K, Schenck E, Lüking CH. The diagnostic significance of long-latency reflexes in multiple sclerosis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1988;70(1):56-61.
43. Di Lazzaro V, Restuccia D, Nardone R, Tartaglione T, Quartarone A, Tonali P, Rothwell JC. Preliminary clinical observations on a new trigeminal reflex: the trigemino-cervical reflex. *Neurology.* 1996;46(2):479-85.
44. Diem R, Tschirne A, Bähr M. Decreased amplitudes in multiple sclerosis patients with normal visual acuity: a VEP study. *J Clin Neurosci.* 2003;10(1):67-70.
45. Dietemann JL, Beigelman C, Rumbach L, Vouge M, Tajahmady T, Faubert C, Jeung MY, Wackenheim A. Multiple sclerosis and corpus callosum atrophy: relationship of MRI findings to clinical data. *Neuroradiology.* 1988;30(6):478-80.
46. Dupeyron A, Chaury F, Guiraud-Chaumeil C, Tranchant C. Hemicontracture and facial myokymia as the first manifestation of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris).* 2001;157:315—7.
47. Eekhof JL, Aramideh M, Bour LJ, Hilgevoord AA, Speelman HD, Ongerboer de Visser BW. Blink reflex recovery curves in blepharospasm, torticollis spasmodica, and hemifacial spasm. *Muscle Nerve.* 1996;19(1):10-5.
48. Emerson RG. Evoked potentials in clinical trials for multiple sclerosis. *J Clin Neurophysiol.* 1998;15(2):109-16.
49. Emre Öge A, Boyacıyan A, Sarp A, Yazici J. Facial myokymia: segmental demyelination demonstrated by magnetic stimulation. *Muscle Nerve* 1996;19:246—9.
50. Esteban A, Giménez-Roldán S. Blink reflex in Huntington's chorea and Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 1975;52(2):145-57.
51. Evangelou N, Konz D, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM. Regional axonal loss in the corpus callosum correlates with cerebral white matter lesion volume and distribution in multiple sclerosis. *Brain* 2000;123:1845-9.
52. Friese M, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2014.
53. Fuhr P, Borggrefe-Chappuis A, Schindler C, Kappos L. Visual and motor evoked potentials in the course of multiple sclerosis. *Brain.* 2001;124(Pt 11):2162-8.
54. Gabelić T, Krbot M, Šefer AB, Išgum V, Adamec I, Habek M. Ocular and cervical vestibular evoked myogenic potentials in patients with multiple sclerosis. *J Clin Neurophysiol.* 2013;30(1):86-91.

55. Gajofatto A, Monaco S, Fiorini M, Zanusso G, Vedovello M, Rossi F, Turatti M, Benedetti MD. Assessment of outcome predictors in first-episode acute myelitis: a retrospective study of 53 cases. *Arch Neurol*. 2010;67(6):724-30.
56. Gean-Marton AD, Vezina LG, Marton KI, Stimac GK, Peyster RG, Taveras JM, Davis KR. Abnormal corpus callosum: a sensitive and specific indicator of multiple sclerosis. *Radiology*. 1991;180(1):215-21.
57. Girlanda P, Dattola R, Messina C. Blink reflex in hemiplegia. *Eur Neurol*. 1984;23(3):221-7.
58. Gómez-Wong E, Martí MJ, Tolosa E, Valls-Solé J. Sensory modulation of the blink reflex in patients with blepharospasm. *Arch Neurol* 1998;55:1233–7.
59. Gronseth GS, Ashman EJ. Practice parameter: the usefulness of evoked potentials in identifying clinically silent lesions in patients with suspected multiple sclerosis (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2000;54(9):1720-5.
60. Gutmann L, Gutmann L. Myokymia and neuromyotonia 2004. *J Neurol*. 2004;251(2):138-42.
61. Gutmann L, Hopf HC, Gutierrez A, Burton V. Intrapontine generation of myokymia in multiple sclerosis. *Muscle Nerve*. 1993;16(9):981-2.
62. Guttmann CR, Wei X, Warfield SK, Eliasziw M, Mitchell JR. Has your patient's multiple sclerosis lesion burden or brain atrophy actually changed? *Mult Scler*. 2004;10(4):402-6.
63. Habek M. Evaluation of brainstem involvement in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 2013;13(3):299-311.
64. Hallett M. Clinical neurophysiology of akinesia. *Rev Neurol (Paris)*. 1990;146(10):585-90.
65. Hashimoto T, Shindo M, Yanagisawa N. Enhanced associated movements in the contralateral limbs elicited by brisk voluntary contraction in choreic disorders. *Clin Neurophysiol* 2001;112(9):1612-7.
66. Heenan M, Scheidt RA, Woo D, Beardsley SA. Intention tremor and deficits of sensory feedback control in multiple sclerosis: a pilot study. *J Neuroeng Rehabil*. 2014 Dec 19;11(1):170.
67. Henderson L, Dittrich WH. Preparing to react in the absence of uncertainty: I. New perspectives on simple reaction time. *Br J Psychol* 1998;89: 531–554.
68. Hickman SJ, Toosy AT, Miszkiel KA, Jones SJ, Altmann DR, MacManus DG, Plant GT, Thompson AJ, Miller DH. Visual recovery following acute optic neuritis--a clinical, electrophysiological and magnetic resonance imaging study. *J Neurol*. 2004;251(8):996-1005.

69. Höppner J, Kunesch E, Buchmann J, Hess A, Grossmann A, Benecke R. Demyelination and axonal degeneration in corpus callosum assessed by analysis of transcallosally mediated inhibition in multiple sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 1999;110(4):748-56.
70. Hoy KE, Georgiou-Karistianis N, Laycock R, Fitzgerald PB. Using transcranial magnetic stimulation to investigate the cortical origins of motor overflow: a study in schizophrenia and healthy controls. *Psychol Med.* 2007;37(4):583-94.
71. Humm AM, Magistris MR, Truffert A, Hess CW, Rösler KM. Central motor conduction differs between acute relapsing-remitting and chronic progressive multiple sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 2003;114(11):2196-203.
72. Inglis WL, Winn P. The pedunculo-pontine tegmental nucleus: where the striatum meets the reticular formation. *Prog Neurobiol.* 1995;47(1):1-29.
73. Invernizzi P, Bertolasi L, Bianchi MR, Turatti M, Gajofatto A, Benedetti MD. Prognostic value of multimodal evoked potentials in multiple sclerosis: the EP score. *J Neurol.* 2011;258(11):1933-9.
74. Iriarte LM, Chacón J, Madrazo J, Chaparro P, Vadillo J. Blink reflex in 57 parkinsonian patients with correlation between the clinical and electrophysiological parameters. *Funct Neurol.* 1988;3(2):147-56.
75. Ison JR, Sanes JN, Foss JA, Pinckney LA. Facilitation and inhibition of the human startle blink reflexes by stimulus anticipation. *Behav Neurosci.* 1990;104(3):418-29.
76. Jacobs L, Kaba S, Pullicino P. The lesion causing continuous facial myokymia in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 1994;51:1115—9.
77. Jung P, Beyerle A, Humpich M, Neumann-Haefelin T, Lanfermann H, Ziemann U. Ipsilateral silent period: a marker of callosal conduction abnormality in early relapsing-remitting multiple sclerosis? *J Neurol Sci.* 2006;250(1-2):133-9.
78. Jung P, Beyerle A, Ziemann U. Multimodal evoked potentials measure and predict disability progression in early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008;14(4):553-6.
79. Kail R. Speed of information processing in patients with multiple sclerosis. *J Clin Exp Neuropsychol.* 1998;20(1):98-106.
80. Kale N, Agaoglu J, Onder G, Tanik O. Correlation between disability and transcranial magnetic stimulation abnormalities in patients with multiple sclerosis. *J Clin Neurosci.* 2009;16(11):1439-42.
81. Kallmann BA, Fackelmann S, Toyka KV, Rieckmann P, Reiners K. Early abnormalities of evoked potentials and future disability in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2006;12(1):58-65.

- 82.** Kennedy DM, Wang C, Shea CH. Reacting while moving: influence of right limb movement on left limb reaction. *Exp Brain Res.* 2013;230(1):143-52.
- 83.** Khoshbin S, Hallett M. Multimodality evoked potentials and blink reflex in multiple sclerosis. *Neurology.* 1981;31(2):138-44.
- 84.** Kidd D, Barkhof F, McConnell R, Algra PR, Allen IV, Revesz T. Cortical lesions in multiple sclerosis. *Brain.* 1999;122 (Pt 1):17-26.
- 85.** Kimura J, Rodnitzky RL, Okawara SH. Electrophysiologic analysis of aberrant regeneration after facial nerve paralysis. *Neurology.* 1975;25(10):989-93.
- 86.** Kimura J. Alteration of the orbicularis oculi reflex by pontine lesions. Study in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 1970;22(2):156-61.
- 87.** Kimura J. Disorder of interneurons in Parkinsonism. The orbicularis oculi reflex to paired stimuli. *Brain.* 1973;96(1):87-96.
- 88.** Kimura J. Electrically elicited blink reflex in diagnosis of multiple sclerosis. Review of 260 patients over a seven-year period. *Brain.* 1975;98(3):413-26.
- 89.** Klissurski M, Novachkova S, Tzvetanov P, Alexiev F. Orbicularis oculi reflex abnormalities in patients with multiple sclerosis: a clinical, EMG, and MRI investigation. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* 2009;49(1):59-63.
- 90.** Kobayashi M, Pascual-Leone A. Transcranial magnetic stimulation in neurology. *Lancet Neurol.* 2003;2(3):145-56.
- 91.** Koch M, Kungel M, Herbert H. Cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus are involved in the mediation of prepulse inhibition of the acoustic startle response in the rat. *Exp Brain Res.* 1993;97(1):71-82.
- 92.** Kofler M, Stetkárová I, Wissel J. Nociceptive EMG suppression in triceps brachii muscle in humans. *Clin Neurophysiol.* 2004;115(5):1052-6.
- 93.** Kohl S, Heekeren K, Klosterkötter J, Kuhn J. Prepulse inhibition in psychiatric disorders--apart from schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2013;47(4):445-52.
- 94.** Koutsis G, Kokotis P, Papagianni AE, Evangelopoulos ME, Kilidireas C, Karandreas N. A neurophysiological study of facial numbness in multiple sclerosis: Integration with clinical data and imaging findings. *Mult Scler Relat Disord.* 2016;9:140-6.
- 95.** Kujala P, Portin R, Revonsuo A, Ruutiainen J. Attention related performance in two cognitively different subgroups of patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1995;59(1):77-82.
- 96.** Godefroy O, Lhullier-Lamy C, Rousseaux M. SRT lengthening: role of an alertness deficit in frontal damaged patients. *Neuropsychologia.* 2002;40(13):2234-41.

- 97.** Kukowski B. Duration, configuration and amplitude of the motor response evoked by magnetic brain stimulation in patients with multiple sclerosis. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* 1993;33(5):295-7.
- 98.** Kutzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444-1452.
- 99.** Lenzi D, Conte A, Mainero C, Frasca V, Fubelli F, Totaro P, Caramia F, Inghilleri M, Pozzilli C, Pantano P. Effect of corpus callosum damage on ipsilateral motor activation in patients with multiple sclerosis: a functional and anatomical study. *Hum Brain Mapp* 2007;28(7):636-44.
- 100.** Leocani L, Cohen LG, Wassermann EM, Ikoma K, Hallett M. Human corticospinal excitability evaluated with transcranial magnetic stimulation during different reaction time paradigms. *Brain* 2000;123:1161-73.
- 101.** Leocani L, Colombo B, Magnani G, Martinelli-Boneschi F, Cursi M, Rossi P, Martinelli V, Comi G. Fatigue in multiple sclerosis is associated with abnormal cortical activation to voluntary movement--EEG evidence. *Neuroimage.* 2001;13(6 Pt 1):1186-92.
- 102.** Leocani L, Martinelli V, Natali-Sora MG, Rovaris M, Comi G. Somatosensory evoked potentials and sensory involvement in multiple sclerosis: comparison with clinical findings and quantitative sensory tests. *Mult Scler.* 2003;9(3):275-9.
- 103.** Leocani L, Medaglini S, Comi G. Evoked potentials in monitoring multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 2000;21(4 Suppl 2):S889-91.
- 104.** Leocani L, Medaglini S, Comi G. Evoked potentials in monitoring multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 2000;21(4 Suppl 2):S889-91.
- 105.** Leocani L, Nuara A, Houdayer E, Schiavetti I, Del Carro U, Amadio S, Straffi L, Rossi P, Martinelli V, Vila C, Sormani MP, Comi G. Sativex(®) and clinical-neurophysiological measures of spasticity in progressive multiple sclerosis. *J Neurol.* 2015;262(11):2520-7.
- 106.** Leocani L, Rovaris M, Boneschi FM, Medaglini S, Rossi P, Martinelli V, Armadio S, Comi G. Multimodal evoked potentials to assess the evolution of multiple sclerosis: a longitudinal study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:1030–1035.
- 107.** Leocani L, Rovaris M, Martinelli-Boneschi F, Annovazzi P, Filippi M, Colombo B, Martinelli V, Comi G. Movement preparation is affected by tissue damage in multiple sclerosis: evidence from EEG event-related desynchronization. *Clin Neurophysiol.* 2005;116(7):1515-9. Epub 2005 Apr 26.
- 108.** León L, Casanova-Molla J, Lauria G, Valls-Solé J. The somatosensory blink reflex in upper and lower brainstem lesions. *Muscle Nerve.* 2011;43(2):196-202.

- 109.** Liegeois-Chauvel C, Morin C, Musolino A, Bancaud J, Chauvel P. Evidence for a contribution of the auditory cortex to audiospinal facilitation in man. *Brain*. 1989;112(Pt 2):375-91.
- 110.** Liepert J, Dettmers C, Terborg C, Weiller C. Inhibition of ipsilateral motor cortex during phasic generation of low force. *Clin Neurophysiol*. 2001;112(1):114-21.
- 111.** Lindeboom J, ter Horst R. Interhemispheric disconnection effects in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988;51(11):1445-7.
- 112.** Llufriu S, Blanco Y, Martinez-Heras E, Casanova-Molla J, Gabilondo I, Sepulveda M, Falcon C, Berenguer J, Bargallo N, Villoslada P, Graus F, Valls-Sole J, Saiz A. Influence of corpus callosum damage on cognition and physical disability in multiple sclerosis: a multimodal study. *PLoS One*. 2012;7(5):e37167.
- 113.** Magistris MR, Rösler KM, Truffert A, Myers JP. Transcranial stimulation excites virtually all motor neurons supplying the target muscle. A demonstration and a method improving the study of motor evoked potentials. *Brain*. 1998;121(Pt 3):437-50.
- 114.** Magnano I, Pes GM, Pilurzi G, Cabboi MP, Ginatempo F, Giaconi E, Tolu E, Achene A, Salis A, Rothwell JC, Conti M, Deriu F. Exploring brainstem function in multiple sclerosis by combining brainstem reflexes, evoked potentials, clinical and MRI investigations. *Clin Neurophysiol*. 2014;125(11):2286-96.
- 115.** Manca D, Muñoz E, Pastor P, Valdeoriola F, Valls-Solé J. Enhanced gain of blink reflex responses to ipsilateral supraorbital nerve afferent inputs in patients with facial nerve palsy. *Clin Neurophysiol*. 2001;112(1):153-6.
- 116.** Manson SC, Wegner C, Filippi M, Barkhof F, Beckmann C, Ciccarelli O, De Stefano N, Enzinger C, Fazekas F, Agosta F, Gass A, Hirsch J, Johansen-Berg H, Kappos L, Korteweg T, Polman C, Mancini L, Manfredonia F, Marino S, Miller DH, Montalban X, Palace J, Rocca M, Ropele S, Rovira A, Smith S, Thompson A, Thornton J, Yousry T, Frank JA, Matthews PM. Impairment of movement-associated brain deactivation in multiple sclerosis: further evidence for a functional pathology of interhemispheric neuronal inhibition. *Exp Brain Res*. 2008;187(1):25-31
- 117.** Margaritella N, Mendozzi L, Garegnani M, Nemni R, Colicino E, Gilardi E, Pugnetti L. Exploring the predictive value of the evoked potentials score in MS within an appropriate patient population: a hint for an early identification of benign MS? *BMC Neurol*. 2012;12:80.
- 118.** Martin R, Sturzebecher CS, McFarland HF. Immunotherapy of multiple sclerosis: where are we? Where should we go? *Nat Immunol* 2001;2:785-8.

- 119.** Matsumoto H, Kaneshige Y. Correlation of somatosensory evoked potentials and long loop reflexes in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1990;95(3):335-43.
- 120.** Matthews WB. Ratio of maximum H reflex to maximum M response as a measure of spasticity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1966;29(3):201-4.
- 121.** Mayston MJ, Harrison LM, Stephens JA. A neurophysiological study of mirror movements in adults and children. *Ann Neurol.* 1999;45(5):583-94.
- 122.** McGavern DB, Murray PD, Rivera-Quiñones C, Schmelzer JD, Low PA, Rodriguez M. Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain.* 2000;123 Pt 3:519-31.
- 123.** Meyer BU, Röricht S, Gräfin von Einsiedel H, Kruggel F, Weindl A. Inhibitory and excitatory interhemispheric transfers between motor cortical areas in normal humans and patients with abnormalities of the corpus callosum. *Brain* 1995;118:429–440.
- 124.** Michels R, Wessel K, Klöhn S, Kömpf D. Long-latency reflexes, somatosensory evoked potentials and transcranial magnetic stimulation: relation of the three methods in multiple sclerosis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1993;89(4):235-41.
- 125.** Mikropoulos EH, Papathanasiou AA, Hadjigeorgiou G, Tsironi E, Papadimitriou A. Supratentorial multiple sclerosis lesions affect the blink reflex test. *Open Neurol J.* 2010;4:92-9.
- 126.** Misuli KE, Fakhoury T. 'Spehlmann's Evoked Potential Primer', 3^{ed}, 2001.
- 127.** Miwa H, Yamaji Y, Abe H, Mizuno Y. Evaluation of the somatosensory evoked blink response in patients with neurological disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996;60(5):539-43.
- 128.** Morgante F, Dattola V, Crupi D, Russo M, Rizzo V, Ghilardi MF, Terranova C, Girlanda P, Quartarone A. Is central fatigue in multiple sclerosis a disorder of movement preparation? *J Neurol* 2011;258(2):263-72.
- 129.** Nakashima K, Shimoyama R, Yokoyama Y, Takahashi K. Auditory effects on the electrically elicited blink reflex in patients with Parkinson's disease. *Electroenceph clin Neurophysiol* 1993;89:108–12.
- 130.** Namerow NS, Etemadi A. The orbicularis oculi reflex in multiple sclerosis. *Neurology.* 1970;20(12):1200-3.
- 131.** Nantes JC, Zhong J, Holmes SA, Narayanan S, Lapierre Y, Koski L. Cortical Damage and Disability in Multiple Sclerosis: Relation to Intracortical Inhibition and Facilitation. *Brain Stimul.* 2016a;9(4):566-73.

- 132.** Nantes JC, Zhong J, Holmes SA, Whatley B, Narayanan S, Lapierre Y, Arnold DL, Koski L. Intracortical inhibition abnormality during the remission phase of multiple sclerosis is related to upper limb dexterity and lesions. *Clin Neurophysiol.* 2016b;127(2):1503-11.
- 133.** Nass R. Mirror movement asymmetries in congenital hemiparesis: the inhibition hypothesis revisited. *Neurology.* 1985;35(7):1059-62.
- 134.** Nazliel B, Irkeç C, Koçer B. The roles of blink reflex and sympathetic skin response in multiple sclerosis diagnosis. *Mult Scler.* 2002;8(6):500-4.
- 135.** Nielsen JF, Sinkjaer T. A comparison of clinical and laboratory measures of spasticity. *Mult Scler.* 1996;1(5):296-301.
- 136.** Nonnekes J, Oude Nijhuis LB, de Niet M, de Bot ST, Pasman JW, van de Warrenburg BP, Bloem BR, Weerdesteyn V, Geurts AC. StartReact restores reaction time in HSP: evidence for subcortical release of a motor program. *J Neurosci.* 2014;34(1):275-81.
- 137.** O'Connor P. and Canadian Multiple Sclerosis Working Group. Key issues in the diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *Neurology.* 2002; 59: S1-33.
- 138.** Ongerboer de Visser BW, Goor C. Cutaneous silent period in masseter muscles: a clinical and electrodiagnostic evaluation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1976;39(7):674-9.
- 139.** O'Riordan JI, Gallagher HL, Thompson AJ, Howard RS, Kingsley DP, Thompson EJ, McDonald WI, Miller DH. Clinical, CSF, and MRI findings in Devic's neuromyelitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996;60(4):382-7.
- 140.** Palasí A, Martínez-Sánchez N, Bau L, Campdelacreu J. Mioquimias palpebrales unilaterales como forma de presentación de una esclerosis múltiple. *Neurologia* 2013;28(3):187-94.
- 141.** Pallix-Guyot M, Guennoc AM, Blasco H, de Toffol B, Corcia P, Praline J. Predictive value of motor evoked potentials in clinically isolated syndrome. *Acta Neurol Scand.* 2011;124(6):410-6.
- 142.** Pascual-Leone A, Houser CM, Grafman J, Hallett M. Reaction time and transcranial magnetic stimulation. *Lancet.* 1992a;339(8806):1420.
- 143.** Pascual-Leone A, Valls-Solé J, Wassermann EM, Brasil-Neto J, Cohen LG, Hallett M. Effects of focal transcranial magnetic stimulation on simple reaction time to acoustic, visual and somatosensory stimuli. *Brain.* 1992b;115(Pt 4):1045-59.
- 144.** Pauletti G, Berardelli A, Cruccu G, Agostino R, Manfredi M. Blink reflex and the masseter inhibitory reflex in patients with dystonia. *Mov Disord.* 1993;8(4):495-500.
- 145.** Pelletier J, Habib M, Lyon-Caen O, Salamon G, Poncet M, Khalil R. Functional and magnetic resonance imaging correlates of callosal involvement in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 1993;50(10):1077-82.

- 146.** Pelletier J, Suchet L, Witjas T, Habib M, Guttmann CR, Salamon G, Lyon-Caen O, Chérif AA. A longitudinal study of callosal atrophy and interhemispheric dysfunction in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2001;58(1):105-11.
- 147.** Peterson BW, Maunz RA, Pitts NG, Mackel RG. Patterns of projection and branching of reticulospinal neurons. *Exp Brain Res* 1975;23:333–351.
- 148.** Pierpaoli C, Jezzard P, Basser PJ, Barnett A, Di Chiro G. Diffusion tensor MR imaging of the human brain. *Radiology*. 1996;201(3):637-48.
- 149.** Pierrot-Deseilligny E. Electrophysiological assessment of the spinal mechanisms underlying spasticity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*. 1990;41:264-73.
- 150.** Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292-302.
- 151.** Powers RK, Marder-Meyer J, Rymer WZ. Quantitative relations between hypertonia and stretch reflex threshold in spastic hemiparesis. *Ann Neurol*. 1988;23(2):115-24.
- 152.** Rasminsky M. Hyperexcitability of pathologically myelinated axons and positive symptoms in multiple sclerosis. *Adv Neurol*. 1981;31:289-97.
- 153.** Reese NB, Garcia-Rill E, Skinner RD. The pedunculo pontine nucleus--auditory input, arousal and pathophysiology. *Prog Neurobiol*. 1995;47(2):105-33.
- 154.** Reitz M, Müller K. Differences between 'congenital mirror movements' and 'associated movements' in normal children: a neurophysiological case study. *Neurosci Lett*. 1998;256(2):69-72.
- 155.** Rico A, Audoin B, Franques J, Eusebio A, Reuter F, Malikova I, Ali Cherif A, Pouget J, Pelletier J, Attarian S. Motor evoked potentials in clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2009;15(3):355-62.
- 156.** Rossi A, Scarpini C. Gating of trigemino-facial reflex from low-threshold trigeminal and extratrigeminal cutaneous fibres in humans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992;55(9):774-80.
- 157.** Rovaris M, Filippi M, Minicucci L, Iannucci G, Santuccio G, Possa F, Comi G. Cortical/subcortical disease burden and cognitive impairment in patients with multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000;21(2):402-8.
- 158.** Sanders EA, Ongerboer de Visser BW, Barendswaard EC, Arts RJ. Jaw, blink and corneal reflex latencies in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1985;48(12):1284-9.

- 159.** Sartucci F, Bonfiglio L, Logi F, Pellegrinetti A, Murri L. Changes in long-latency reflexes onset latencies across full-wave rectified and non-rectified recordings. *Clin Neurophysiol.* 1999;110(11):1975-7.
- 160.** Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011;476:214-9.
- 161.** Schicatano EJ, Peshori KR, Gopaldaswamy R, Sahay E, Evinger C. Reflex excitability regulates prepulse inhibition. *J Neurosci.* 2000;20(11):4240-7.
- 162.** Schieppati M, Musazzi M, Nardone A, Seveso G. Interhemispheric transfer of voluntary motor commands in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1984;57:441–447.
- 163.** Schlaeger R, D'Souza M, Schindler C, Grize L, Kappos L, Fuhr P. Combined evoked potentials as markers and predictors of disability in early multiple sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 2012;123(2):406-10.
- 164.** Schlaeger R, Schindler C, Grize L, Dellas S, Radue EW, Kappos L, Fuhr P. Combined visual and motor evoked potentials predict multiple sclerosis disability after 20 years. *Mult Scler.* 2014;20(10):1348-54.
- 165.** Schmierer K, Irlbacher K, Grosse P, Rörich S, Meyer BU. Correlates of disability in multiple sclerosis detected by transcranial magnetic stimulation. *Neurology.* 2002;59(8):1218-24.
- 166.** Schmierer K, Niehaus L, Rörich S, Meyer BU. Conduction deficits of callosal fibres in early multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000;68(5):633-8.
- 167.** Scholes KE, Martin-Iverson MT. Disturbed prepulse inhibition in patients with schizophrenia is consequential to dysfunction of selective attention. *Psychophysiology.* 2010;47(2):223-35.
- 168.** Schulte T, Sullivan EV, Müller-Oehring EM, Adalsteinsson E, Pfefferbaum A. Corpus callosal microstructural integrity influences interhemispheric processing: a diffusion tensor imaging study. *Cereb Cortex.* 2005;15(9):1384-92.
- 169.** Sedano MJ, Trejo JM, Macarrón JL, Polo JM, Berciano J, Calleja J. Continuous facial myokymia in multiple sclerosis: treatment with botulinum toxin. *Eur Neurol.* 2000;43(3):137-40.
- 170.** Siegmund GP, Inglis JT, Sanderson DJ. Startle response of human neck muscles sculpted by readiness to perform ballistic head movements. *J Physiol.* 2001;535(Pt 1):289-300.
- 171.** Silva KL, Pearce J. Facial myokymia: a clue to the diagnosis of multiple sclerosis. *Post Grad Med J.* 1972;48:657—61.

- 172.** Simon JH, Holtås SL, Schiffer RB, Rudick RA, Herndon RM, Kido DK, Utz R. Corpus callosum and subcallosal-periventricular lesions in multiple sclerosis: detection with MR. *Radiology*. 1986;160(2):363-7.
- 173.** Sinkjaer T, Toft E, Hansen HJ. H-reflex modulation during gait in multiple sclerosis patients with spasticity. *Acta Neurol Scand*. 1995;91(4):239-46.
- 174.** Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:683-747.
- 175.** Soteropoulos D, Edgley S, Baker S. Spinal Commissural Connections to Motoneurons Controlling the Primate Hand and Wrist. *J Neurosci* 2013;33(23):9614–9625.
- 176.** Stetkarova I, Kofler M. Differential effect of baclofen on cortical and spinal inhibitory circuits. *Clin Neurophysiol*. 2013;124(2):339-45.
- 177.** Stoquart-Elsankari S, Bottin C, Roussel-Pieronne M, Godefroy O. Motor and cognitive slowing in multiple sclerosis: an attentional deficit? *Clin Neurol Neurosurg*. 2010;112(3):226-32.
- 178.** Swayne O, Rothwell J, Rosenkranz K. Transcallosal sensorimotor integration: effects of sensory input on cortical projections to the contralateral hand. *Clin Neurophysiol*. 2006;117(4):855-63.
- 179.** Swingler RJ, Compston DA. The morbidity of multiple sclerosis. *Q J Med*. 1992;83(300):325-37.
- 180.** Takasoh M, Mizota A, Adachi-Usami E. Comparative studies on pattern VECF between patients with ischemic optic neuropathy and optic neuritis. *Acta Ophthalmol Scand*. 2000;78(4):407-10.
- 181.** Tallantyre EC, Bø L, Al-Rawashdeh O, Owens T, Polman CH, Lowe JS, Evangelou N. Clinico-pathological evidence that axonal loss underlies disability in progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2010;16(4):406-11.
- 182.** Tataroglu C, Genc A, Idiman E, Cakmur R, Idiman F. Cortical relay time for long latency reflexes in patients with definite multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci*. 2004;31(2):229-34.
- 183.** Thickbroom GW, Sacco P, Faulkner DL, Kermode AG, Mastaglia FL. Enhanced corticomotor excitability with dynamic fatiguing exercise of the lower limb in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2008;255(7):1001-5.
- 184.** Toft E, Sinkjaer T, Andreassen S, Hansen HJ. Stretch responses to ankle rotation in multiple sclerosis patients with spasticity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1993;89(5):311-8.

- 185.** Tolosa E, Montserrat L, Bayes A. Blink reflex studies in focal dystonias: enhanced excitability of brainstem interneurons in cranial dystonia and spasmodic torticollis. *Mov Disord.* 1988;3(1):61-9.
- 186.** Toru S, Yokota T, Tomimitsu H, Kanouchi T, Yamada M, Mizusawa H. Somatosensory-evoked cortical potential during attacks of paroxysmal dysesthesia in multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2005;12(3):233-4.
- 187.** Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 1998;338(5):278-85.
- 188.** Valldeoriola F, Valls-Solé J, Tolosa E, Ventura PJ, Nobbe FA, Martí MJ. Effects of a startling acoustic stimulus on reaction time in different parkinsonian syndromes. *Neurology.* 1998;51(5):1315-20.
- 189.** Valls-Solé J, Muñoz JE, Valldeoriola F. Abnormalities of prepulse inhibition do not depend on blink reflex excitability: a study in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Clin Neurophysiol.* 2004;115(7):1527-36.
- 190.** Valls-Solé J, Pascual-Leone A, Wassermann EM, Hallett M. Human motor evoked responses to paired transcranial magnetic stimuli. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1992;85(6):355-64.
- 191.** Valls-Solé J, Rothwell JC, Goulart F, Cossu G, Muñoz E. Patterned ballistic movements triggered by a startle in healthy humans. *J Physiol.* 1999;516(Pt 3):931-8.
- 192.** Valls-Solé J, Solé A, Valldeoriola F, Muñoz E, Gonzalez LE, Tolosa ES. Reaction time and acoustic startle in normal human subjects. *Neurosci Lett.* 1995;195(2):97-100.
- 193.** Valls-Solé J, Tolosa ES. Blink reflex excitability cycle in hemifacial spasm. *Neurology.* 1989;39(8):1061-6.
- 194.** Valls-Solé J, Valldeoriola F, Molinuevo JL, Cossu G, Nobbe F. Prepulse modulation of the startle reaction and the blink reflex in normal human subjects. *Exp Brain Res.* 1999;129(1):49-56.
- 195.** Valls-Solé J, Valldeoriola F, Tolosa E, Martí MJ. Distinctive abnormalities of facial reflexes in patients with progressive supranuclear palsy. *Brain.* 1997;120(Pt 10):1877-83.
- 196.** Van den Berg C, Beek PJ, Wagenaar RC, van Wieringen PC. Coordination disorders in patients with Parkinson's disease: a study of paced rhythmic forearm movements. *Exp Brain Res.* 2000;134(2):174-86.
- 197.** Van der Poel JC, Jones SJ, Miller DH. Sound lateralization, brainstem auditory evoked potentials and magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Brain.* 1988;111(Pt 6):1453-74.

- 198.** Waxman SG. Acquired channelopathies in nerve injury and MS. *Neurology*. 2001;56(12):1621-7.
- 199.** Weinschenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain*. 1989;112(Pt 1):133-46.
- 200.** Witelson SF. Hand and sex differences in the isthmus and genu of the human corpus callosum. A postmortem morphological study. *Brain*. 1989;112(Pt 3):799-835.
- 201.** Zajicek J, Fox P, Sanders H, Wright D, Vickery J, Nunn A, Thompson A; UK MS Research Group. Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003;362(9395):1517-26.
- 202.** Zeller D, Dang SY, Stefan K, Biller A, Bartsch A, Saur D, Bendszus M, Rieckmann P, Toyka KV, Classen J. Functional role of ipsilateral motor areas in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82(5):578-83.
- 203.** Ziemann U. Pharmaco-transcranial magnetic stimulation studies of motor excitability. *Handb Clin Neurol*. 2013;116:387-97.