



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Enfermería y Obstetricia

Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Efecto de la radiación holocraneal en los  
Potenciales Evocados Visuales y actividad  
cerebral en un modelo en rata”**

**TESIS**

Para Obtener el Grado de:  
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. en C. Zareth Ortiz Arzate

Comité Tutorial:

Dr. Miguel Ángel Camacho López

Tutor Académico

Dr. Rigoberto Oros Pantoja

Tutor Interno

Dra. Paola Ballesteros Zebadúa

Tutor Externo

Toluca, Estado de México.

Año 2018.





---

**La presente investigación se desarrolló en el Departamento de Física Médica de manera conjunta con los departamentos de Formación Reticular y Radioneurocirugía del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN) bajo la dirección de la Dra. Paola Ballesteros Zebadúa como parte del proyecto (CONACYT 258296), “Efecto del tratamiento anti-inflamatorio sobre las citocinas cerebrales y los patrones de sueño tras la irradiación holocraneal”.**

*“Las palabras nunca alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma”*

*Julio Cortázar*

## **A Dios**

Por su inmenso amor, misericordia y por darme la oportunidad de hacer realidad este sueño.

## **A mi Familia**

A mis amados padres, **Hilda Arzate Quiñones** y **Roberto Ortiz Terrazas** por su valioso apoyo, por brindarme su dulce cobijo y por los valores inculcados con los que hoy me enfrento a la vida. A mis hermanos **Areli, Jonatán e Hilda** por rodearme de alegría, apoyo y amor.

## **A Jorge Ramírez Franco**

Por ser mi alegría, equilibrio, ilusión, confidente, mi abrigo en tiempos de tristeza y frustración; tu amor ha sido un soporte y tus brazos mi refugio.

# AGRADECIMIENTOS

---

*“El agradecimiento es la memoria del corazón”*

*Lao-tsé*

A la **Dra. Paola Ballesteros Zebadúa** cuya dirección, enseñanzas, apoyo y contribución en la realización de este trabajo de investigación es completamente invaluable y más allá de la interacción profesional agradezco su confianza, calidad humana y entereza.

Al **Dr. Javier Franco Pérez** por su apoyo, sus enseñanzas y por cada uno de sus atinados aportes en la realización de esta investigación.

Al **Dr. Miguel Ángel Camacho López** y al **Dr. Rigoberto Oros Pantoja** por su apoyo, compromiso y valioso respaldo profesional.

Al **M. Francisco Javier Láez** por su loable ayuda para irradiar a los animales a primeras horas del día, por su compañía y amistad que hicieron llevadera mi estancia en la unidad de Radioneurocirugía.

Al **Dr. Joaquín Manjarrez** por sus enseñanzas en la manipulación y realización de cirugías en animales.

Al **Dr. César Augusto Rodríguez** y al **MVZ. Daniel Hernández** por brindarme su apoyo desinteresado, amistad y por darme todas las facilidades en el bioterio.

Al **Departamento de Física Médica y a todo el personal de la Unidad de Radioneurocirugía** por su paciencia, compañía, apoyo moral y su disposición de ayuda en todo momento.

A **“Paquito”** del Departamento de neuroimagen por su disposición y ayuda para la adquisición de Tomografías Computarizadas de ratas.

A **Norma, Carlos, Moisés, Adriana, Manuel y Mariana** por su apoyo incondicional durante el desarrollo de mis actividades en el laboratorio. En especial a Norma y Carlos con quienes la comida era un momento divertido, gracias por su amistad amigos.

Al **Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN)** por la formación, las facilidades, accesibilidad y los recursos proporcionados para la ejecución del proyecto.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado.

# ÍNDICE

---

	<b>Página</b>
<b>Introducción</b>	1
<b>1. Antecedentes</b>	3
1.1. Radiación ionizante	4
Efecto fotoeléctrico	5
Efecto Compton	6
Producción de pares	6
1.2. Efectos biológicos de la radiación	6
1.3. Efectos de la radiación ionizante en el cerebro	9
1.3.1. Efectos de la radiación ionizante en la vía visual	11
1.4. Corteza estriada y vía visual	12
1.5. Actividad eléctrica en el cerebro	17
1.5.1. Electroencefalograma	18
1.5.2. Ritmos cerebrales	22
Ritmo delta	22
Ritmo tetha	23
Ritmo alfa	23
Ritmo beta	23
Ritmo Gamma	24
1.5.3. Potenciales Evocados Visuales	24
<b>2. Planteamiento del problema</b>	26
<b>3. Justificación</b>	28
<b>4. Hipótesis</b>	30
<b>5. Objetivos: General y específicos</b>	32
<b>6. Diseño metodológico</b>	34
6.1. Diseño del estudio	35
6.2. Universo y Muestra	35

6.3. Procedimientos	35
Iluminancia e intensidad luminosa de la lámpara Flash LED: EBNeuro	35
Implantación de electrodos	35
Registros PEV	36
Registros EEG	36
Irradiación	37
6.4. Criterios de inclusión	38
6.5. Criterios de exclusión	38
6.6. Instrumentos	38
6.7. Recolección de datos	38
6.8. Análisis de datos	39
6.9. Aspecto ético	40
<b>7. Resultados</b>	41
7.1. Artículo y/o capítulo de libro aceptado	42
7.1.1. Título del artículo	42
7.1.2. Página frontal (portada) de la publicación del artículo	42
7.1.3. Carta de aceptación	43
7.1.4. Resumen	43
7.1.5. Apartados del artículo	44
Introducción	44
Metodología	45
Resultados	48
Discusión de resultados	52
Conclusiones	53
Referencias	54
7.2. Artículo enviado	56
7.2.1. Título del artículo enviado	56
7.2.2. Carta de envío del artículo	56
7.2.3. Resumen	57
7.2.4. Apartados del artículo	58

Introducción	58
Métodos	58
Resultados	60
Discusión	61
Conclusiones	62
Referencias	61
<b>8. Resultados adicionales</b>	64
<b>9. Discusión General</b>	82
<b>10. Conclusiones generales</b>	86
<b>11. Bibliohemerografía utilizada</b>	88
<b>12. Anexos</b>	93

# ABREVIATURAS

---

**SNC.** Sistema Nervioso Central  
**RH.** Radiación holocraneal  
**LLA.** Leucemia Linfoblástica Aguda  
**PEV.** Potenciales Evocados Visuales  
**EEG.** Electroencefalográficos  
**ADN.** Ácido Desoxirribonucleico  
**LET.** Transferencia Lineal de Energía  
**keV.** Kilo electron-volts  
**MV.** Megavolts  
**Gy.** Gray  
**IL-1 $\beta$ .** Interleucina 1-beta  
**TNF- $\alpha$ .** Factor de Necrosis Tumoral-alfa  
**COX-2.** Cicloxigenasa-2  
**NF- $\kappa$  $\beta$ .** Factor nuclear kappa-beta  
**IQ.** Coeficiente intelectual  
**NGL.** Núcleo Geniculado Lateral  
**FFT.** Transformada Rápida de Fourier  
**BH.** Barrera hematoencefálica  
**LED:** Diodo emisor de luz  
**CBCT.** Tomografía Computarizada de Haz Cónico  
**ms.** Milisegundos  
 **$\mu$ V.** Microvoltios  
**OAR.** Órgano de riesgo  
**PTV.** Volumen de tratamiento planeado  
**INDO.** Indometacina  
**GI-** Sistema gastrointestinal  
**GFAP.** Proteína gliofibrilar ácida  
**COX-1.** Cicloxigenasa-1  
**IL-6.** Interleucina-6  
**PG.** Prostaglandina  
**WBRT.** Whole Brain Radiotherapy  
**ELISA.** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

# INTRODUCCIÓN

---

La incidencia del cáncer en cabeza y cuello afecta a casi 500,000 personas en todo el mundo (Barret, 2018). Para el 2012 la Organización Mundial de la Salud reportó que se dieron 256,213 casos de cáncer en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Farley, 2013). Actualmente, la radioterapia es una opción ampliamente usada para el tratamiento de tumores cerebrales y metástasis. Sin embargo, el uso terapéutico de la radiación ionizante está limitado a los efectos secundarios que puede provocar. La muerte celular es el principal efecto que se ha descrito pero también se presentan efectos como el síndrome de somnolencia post-radiación (Ballesteros, 2014), la desmielinización (Tofilon and Fike, 2000), la neuro-inflamación (Monje, 2003), perturbaciones en la sustancia blanca (Uberall, 1996) entre otros, de los cuales aún no se conoce completamente su etiología.

La radiación holocraneal (RH) o radiación a cerebro completo es una de las principales opciones empleadas para el tratamiento terapéutico de metástasis y linfoma no-Hodgkin, también se emplea como tratamiento profiláctico de la Leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Menshref, 2013; Rades, 2008). El uso de radiación ionizante ha sido ampliamente evaluada en estructuras cerebrales como el hipocampo en estudios de neurogénesis (Monje, 2003) y el hipotálamo en estudios de síndrome de somnolencia post irradiación (Ballesteros, 2014), sin embargo, la corteza visual es una estructura que ha sido pobremente evaluada. El uso de RH como tratamiento profiláctico en niños con LLA a distintas dosis de radiación holocraneal (12, 18 Gy y 24 Gy) demostró que la vía visual se ve afectada tras el tratamiento de irradiación. Los procesos por los cuales ocurre el daño son desconocido, sin embargo, se consideran dos hipótesis; la presencia de lesiones axonales o desmielinización y la neuroinflamación. La integridad de la vía visual puede ser evaluada mediante la técnica neurofisiológica de Potenciales Evocados Visuales (PEV) (Menshref, 2013; Russo, 1987). Los PEV son generados a nivel de corteza visual por la actividad combinada de potenciales post-sinápticos tras una emisión de estímulos luminosos (You, 2011; Charng, 2013; Yan, 1995) y sus componentes PEV están clasificadas en tempranas (P1-N1) y tardías (P2 en adelante) las cuales reflejan la

integridad del nervio óptico y al procesamiento por los centros corticales (Charng, 2013; Holder, 2004; Aminoff, 1994; Tobimatsu, 2006). Los parámetros característicos a evaluar son la amplitud medida en microvolts y la latencia medida en milisegundos. El uso de PEV se ha empleado en investigaciones para estudios farmacológicos y en la evaluación de efectos neuroprotectores, ya que proporcionan un medio para monitorear la actividad neural y el procesamiento sensorial in vivo (de Vries, 1996). En pacientes tratados con radioterapia holocraneal es difícil discriminar si los efectos observados en los PEV y en las bandas de frecuencia resultado de registros EEG (electroencefalográficos) puedan deberse a la enfermedad misma del paciente, a la localización del tumor, a los medicamentos adyuvantes o a la radioterapia en sí. Por lo tanto, en esta investigación se optó por realizar estudios en tejido sano, para ello se empleó un modelo murino (ratas) el cual fue irradiado de forma holocraneal a 20 Gy y se adquirieron registros de PEV y EEG tanto en grupos control y grupos con irradiación holocraneal. Antes de la adquisición de PEV se estandarizó la técnica con el uso del marco de estereotáxia y se eligieron los parámetros claves para garantizar la reproducibilidad de los datos obtenidos.

*“Evoluciones progresivas que crecen cada vez más, son la materia de la historia”*

*Novalis*

---

---

# Antecedentes

---

---

# 1. ANTECEDENTES

---

## 1.1. Radiación ionizante

La radiación se describe como la energía que puede ser transferida ya sea en forma de partículas o como onda electromagnética. Esta energía transita es capaz de interactuar con objetos mediante el proceso de excitación o ionización. Dentro de la radiación de partículas subatómicas en movimiento y que poseen masa y carga eléctrica se encuentran las partículas alfa las cuales son núcleos de helio  $^4\text{He}$ , las partículas beta que son electrones rápidos o  $\beta^-$  y positrones o  $\beta^+$ , ambas partículas son producto del decaimiento de algunos radionúclidos. En el caso de los electrones rápidos, éstos también pueden producirse por medio de un acelerador de partículas.

Además de las partículas también existe la radiación en forma de onda electromagnética (fotones). Las ondas electromagnéticas poseen campos magnéticos y eléctricos que son propagados a la velocidad de la luz, su energía varía dentro de un rango y se pueden clasificar en ondas de radio, microondas, luz visible, radiación ultravioleta, los rayos X empleados para estudios de radiodiagnóstico y radioterapia, los rayos gamma también empleados para radioterapia y radiodiagnóstico los cuales son generados principalmente por núcleos radiactivos. Los rayos X pueden provenir de los orbitales de los electrones del átomo que han sido estimulados artificialmente o por radiación de frenado también llamada bremsstrahlung que consiste en desacelerar electrones con velocidades grandes haciéndolos interactuar con objetos metálicos (Khan, 2000; Hall, 2012). Se le llama radiación ionizante a aquella que posee suficiente energía para interactuar con la materia produciendo ionización, es decir, que origina partículas de carga eléctrica (iones).

La radiobiología se encarga del estudio de la acción de la radiación ionizante sobre las cosas vivas. Cuando la radiación ionizante interactúa con los átomos de la materia ocurrirá el fenómeno de excitación o ionización y de esta forma se comienza una serie de eventos que

conduce a un cambio biológico. El cambio biológico está directamente relacionada la cantidad de energía depositada por unidad de longitud a esto se le llama Transferencia Lineal de Energía o LET (Liner Energy Transfer) la cual es dependiente del tipo de radiación y se expresa en kiloelectronvolts por micrómetro ( $\text{keV}/\mu\text{m}$ ). Las partículas alfa poseen alto LET por lo que poseen más habilidad de ionización y menor penetración a diferencia de las partículas betas (Hall, 2012). El depósito de energía de las partículas alfa es en trayectorias rectas en comparación con las betas que lo hacen de forma tortuosa y no homogénea. Los rayos X producen iones de forma dispersa e indirecta ya que la energía depositada se realiza a través de los electrones secundarios que se liberan de la interacción de los rayos X con los átomos.

Los rayos gamma presentan un poder de ionización relativamente bajo pero capacidad de penetración más larga, característica que es imprescindible en el diseño de blindajes y acciones relacionadas a la protección radiológica. A diferencia de las partículas cargadas (alfas y betas) la radiación electromagnética (rayos x y  $\gamma$ ) no poseen masa ni carga eléctrica, por lo cual su interacción con la materia no es por medio de atracción o repulsión eléctrica. Cuando interactúa el fotón con el medio puede absorberse, desintegrarse o ser disparado cambiando su dirección, con o sin pérdida de energía. Los principales mecanismos de intervención de los fotones con la materia son:

### **Efecto fotoeléctrico**

Ocurre con la interacción de un fotón y un átomo absorbedor, en el cual el fotón desaparece totalmente, desprendiendo un electrón del átomo (fotoelectrón) (Khan, 2000). El origen más probable del fotoelectrón son las capas electrónicas interiores, o sea K, L. Después de que sale el fotoelectrón, las capas electrónicas del átomo que cedió el electrón se reacomodan. Este mecanismo puede ocurrir de la siguiente manera: Si el fotón se originó en la capa K, uno de la capa L bajará a la capa K emitiendo un fotón (rayo x característico) cuya energía es igual a la diferencia de energía entre la capa L y la K, así sucedería con la capa L y la capa M y así sucesivamente. El proceso fotoeléctrico es el predominante en la interacción de los rayos

gamma (o rayos X) de baja energía y para materiales absorbedores de alto número atómico como lo es en el uso de rayos X en imágenes de radiodiagnóstico (Hall, 2012).

### **Efecto Compton**

El rayo  $\gamma$  o X interacciona con un electrón orbital, cediendo sólo una parte de su energía a la vez que es desviado un ángulo  $\theta$ , cuanto mayor sea el ángulo, mayor será la energía cedida al electrón. La mayor parte de la energía del fotón es cedida al electrón y la restante es la que posee el rayo X o  $\gamma$  desviado (Khan, 2000). El efecto Compton es un mecanismo presente para fotones de altas energías de megavolt (MV) como las usadas en radioterapia (Hall, 2012).

### **Producción de pares**

Este proceso es sólo viable para rayos X o  $\gamma$  de alta energía, es decir, que su energía sea mayor a 1.022 MeV. Esta interacción ocurre con el campo eléctrico del núcleo del átomo, el fotón desaparece y da origen a un par electrón y positrón, los cuales ceden su energía al medio, en el caso del positrón cuando este alcanza el reposo se recombina con un electrón cercano y ambas partículas son aniquiladas generando dos fotones de 511 keV que viajan de direcciones opuestas (Khan, 2000), mientras que el electrón se recombina con el medio.

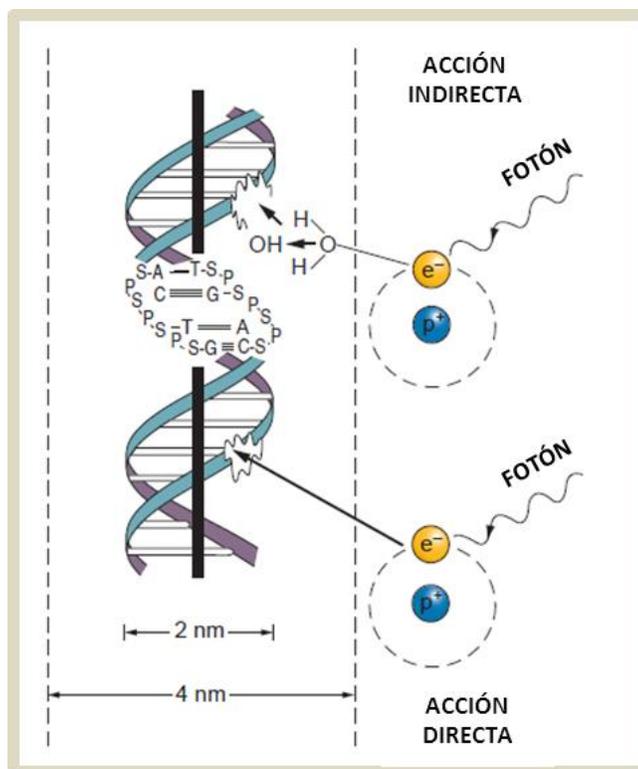
La cantidad depositada en el medio absorbedor tanto de partículas o radiación electromagnética (rayos X y rayos  $\gamma$ ) se expresa en dosis absorbida Gray (Gy), que es la cantidad de energía absorbida por unidad de masa de tejido (Hall, 2012).

## **1.2. Efectos biológicos de la radiación**

La radiación interactúa con los átomos de la materia viva provocando principalmente ionización y en consecuencia, cambios importantes en las células, tejidos, órganos y en el individuo en su totalidad (Hall, 2012). El tipo y la magnitud del daño dependen de la naturaleza del tipo de radiación, de su energía, de la dosis absorbida, de la zona afectada y del

tiempo de exposición. Al igual que ocurre con una lesión de otro tipo en la que dependiendo de la severidad de la lesión el individuo pueda recuperarse, en este caso la edad y el estado de la salud son factores importantes. La severidad de la lesión es dependiente de factores físicos (naturaleza del tipo de radiación), fisiológicos (edad, metabolismo, genética, etc.) y ambientales (presión ambiental del oxígeno) (Manual ESR AV, ININ)

Cuando las células absorben radiación tienen lugar procesos de ionización y excitación, produciendo la formación de moléculas estables o inestables o bien radicales libres, con los cuales se producen nuevas reacciones químicas con moléculas contiguas. Los procesos de ionización o excitación pueden producirse en macromoléculas biológicas como el ácido desoxirribunocleico (ADN) o bien, en el medio en el que están suspendidos los orgánulos celulares como lo es el citoplasma compuesto principalmente por agua (Hall, 2012). La acción de la radiación se clasifica en directa e indirecta, según el lugar donde se produzcan estas interacciones (**Figura 1**).



**Figura 1.** Acción directa e indirecta de la radiación ionizante (Hall, 2012).

Como se observa en la **Figura 1** la acción directa ocurre cuando una partícula ionizante o radiación ionizante interactúa y es absorbida por el ADN de manera que la formación de radicales libres ocurre dentro de la macromolécula. La ionización indirecta ocurre cuando la radiación ionizante interactúa primeramente con el medio circundante, principalmente el agua, formando iones y radicales libres dando pauta al inicio de una serie de reacciones en cadena hasta lograr dañar el ADN. La reacción de los electrones formados por ionización en el agua es llamada radólisis en la cual el agua genera radicales libres altamente reactivos incluyendo al radical hidroxilo (OH·), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el reductor radical hidrógeno (H·). Estas especies transitorias reaccionan con cualquier constituyente orgánico en solución, lo cual puede producir en la célula su muerte, una mutación, o mantenerla en estado latente (Hall, 2012). Aunque durante la interacción de la radiación con el agua se producen muchas otras reacciones y se forman otros productos, los radicales libres como el OH· son un factor fundamental en la producción de lesiones celulares ya que al tener sólo un electrón orbital no aparejado lo hace fuertemente reactivo, debido a la tendencia del electrón a no emparejarse con otro electrón (Hall, 2012).

La acción directa o indirecta de la radiación depende del lugar en donde se produzca la ionización y la absorción de energía en la célula, debido a la gran cantidad de agua que contienen los componentes estructurales, la probabilidad de que la radiación produzca daños por la vía indirecta es mucho mayor que la probabilidad de que ocurran por la vía directa. Así mismo, dependiendo de la LET de la partícula puede predecirse el tipo de acción predominante: las partículas alfa y neutrones al tener alta LET propiciarán la acción directa con el ADN mientras que los rayos X y  $\gamma$  causan mayor daño biológico mediante la acción indirecta (Hall, 2012).

La severidad de la lesión al ADN y su reparación depende de la interacción de la radiación ionizante con la doble hélice del ADN. Cuando su interacción es con una sola hebra del ADN hay una activación de sensores y vías moleculares de respuesta y el daño posiblemente sea reparado. Sin embargo, el daño no siempre puede ser reparado y esto ocurre mayormente cuando la interacción de la radiación se da con ambas hebras del ADN ya que son fraccionadas y difícilmente los mecanismos moleculares que intervienen logran revertir el

daño. Esto desemboca en la muerte celular (apoptosis), la pérdida de capacidad proliferativa, aberraciones cromosómicas e inmunodeficiencias (Hall, 2012). El rango de energía de los fotones empleados en radioterapia induce un daño al ADN frecuentemente de una sola hebra la cual puede repararse en la mayoría de los casos sin tener gran consecuencia biológica (Hall, 2012).

Los daños biológicos también están relacionados con la radiosensibilidad. La radiosensibilidad está en función del estado metabólico del tejido irradiado según la Ley de Bergonié y Tribondeau la cual afirma que mientras más jóvenes son los tejidos y los órganos, más radiosensibles son, por lo que la radiosensibilidad aumenta al aumentar la rapidez de proliferación celular y la rapidez del crecimiento de tejidos. Esta ley tiene una aplicación contundente en la radioterapia y en la radiología diagnóstica (Hall, 2012). Dentro del ciclo celular las células que se encuentran en mitosis son más susceptibles a sufrir daño en el ADN mediante un rompimiento de la doble hebra del ADN (Hall, 2012).

### **1.3. Efectos de la radiación ionizante en el cerebro**

Anatómicamente el sistema nervioso se encuentra clasificado en el SNC el cual se encuentra integrado por el encéfalo y la médula espinal situados respectivamente dentro de la protección del cráneo y la columna vertebral, y el sistema nervioso periférico el cual está constituido por doce pares de nervios craneales y treinta y un pares de nervios raquídeos que tienen sus ramificaciones dentro del cuerpo (Muñoz, 2008).

Los órganos que integran al sistema nervioso están formados por tejido nervioso el cual está conformado de células altamente especializadas en la conducción de impulsos eléctricos estas células son las neuronas. Las células que dan sostén y protección a las neuronas son la neuroglia o células gliales las cuales constituyen en mayor proporción al sistema nervioso (Muñoz, 2008). La neuroglia está dividida en macroglia y microglia las cuales están integradas de estirpes celulares que tienen una función específica que desempeñar. La macroglía se encuentra integrada por los oligodendrocitos y astrocitos. Los oligodendrocitos son células requeridas para la formación y mantenimiento de las vainas de mielina (Greene, 2012; Bear,

2008). La mielina es la responsable de la propagación rápida y eficiente de los impulsos nerviosos y una pérdida de esta puede dar origen a la desmielinización de los axones (van der Kogel, 1986). Los astrocitos tienen diversas funciones entre ellas desempeñan el rol de soporte neuronal, modulan la transcripción sináptica, la secreción de factores neurotróficos tales como los factores de crecimiento de fibroblastos que promueven la neurogénesis y son consideradas células protectoras de las neuronas ante lesiones oxidativas, que tienen la capacidad de reparar el tejido dañado y la cicatrización (Greene, 2012; Bear, 2008). Los astrocitos constituyen el 50% de todas las células gliales (Greene, 2012). La microglia es considerada como las células inmunes del cerebro y ante un daño o lesión actúa como macrófago, estas células representan un 12 % de las células cerebrales totales (Greene, 2012). El sistema nervioso también se encuentra integrado por células madres las cuales podrán diferenciarse en neuronas, astrocitos u oligodendrocitos mediante la neurogénesis la cual ocurre principalmente en el hipocampo (Monje, 2003). El sistema nervioso se encuentra protegido por una capa vascular llamada barrera hematoencefálica (BH) que está asociada a la permeabilidad de las sustancias del torrente sanguíneo al sistema nervioso evitando el paso de sustancias neurotóxicas (Banks, 2015).

En la actualidad se han descrito investigaciones sobre los efectos que causa la radiación ionizante después de irradiación fraccionada a cerebro parcial o a cerebro completo en modelos *in vivo* tanto como *in vitro*. En el ser humano, la expresión clínica de las lesiones en el cerebro está clasificada con respecto al tiempo en el que se presentan y se dividen en agudas, a corto-plazo y a largo-plazo (Greene, 2012; Tofilon, 2000). Las lesiones cerebrales tempranas o agudas suelen presentarse días o semanas tras el tratamiento, las a corto-plazo suelen presentarse de 1 a 6 semanas tras irradiación como la desmielinización y la somnolencia. Tanto las lesiones agudas como las lesiones a corto-plazo, usualmente son reversibles y se resuelven espontáneamente, sin embargo, las lesiones a largo plazo se presentan después 6 meses tras la irradiación e involucran anomalías vasculares, desmielinización y necrosis de la materia blanca, y suelen ser irreversibles y progresivas (Greene, 2012; Ballesteros, 2012). Las lesiones en las funciones cognitivas tras radioterapia han sido observadas después de 6 meses de irradiación (Herman, 2003; Kondiziolka, 2005; Meshref, 2013) y han sido relacionadas a la pérdida de la neurogénesis hipocampal. Estudios

en ratas muestran las lesiones ocasionadas tras el uso de radiación dentro de las cuales destacan: la disminución en la neurogénesis relacionada a la presencia de la activación de citocinas pro-inflamatorias (Monje, 2003; Kyrkanides, 2002; Moore, 2005), la gliosis astrocítica observada (Hwang, 2006) y el síndrome de somnolencia presente después de 6 a 8 semanas tras radiación (Ballesteros, 2012; Littman, 1984). Otro proceso observado ha sido la neuro-inflamación debido a la presencia de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (Ballesteros, 2012), COX-2 (Kyrkanides, 2002; Hwang, 2006; Morovan, 2011), y factores de transcripción como el NF- $\kappa$  $\beta$  (Maggio, 2015).

Como se ha reportado anteriormente que la radiación ionizante ha mostrado tener múltiples efectos en el tejido cerebral y aunque el efecto mayormente descrito es la ruptura de la cadena del ADN y la muerte celular actualmente se sabe que la respuesta ante la radiación es continua y dinámica, en donde la muerte celular no es el único efecto ante la radiación, sino que hay otros efectos secundarios de los cuales aún se desconoce su etiología, entre ellos se encuentran la inflamación previamente mencionada y el daño de la vía visual.

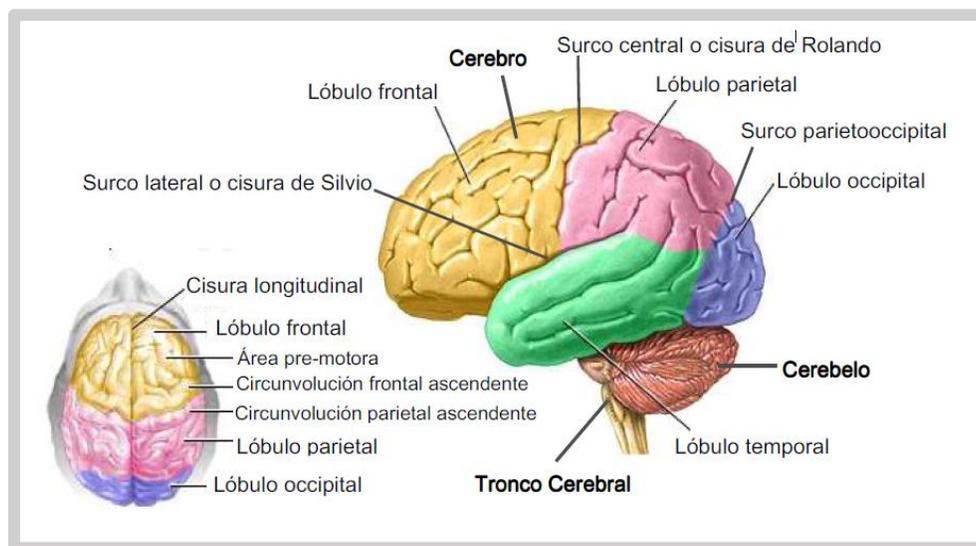
### **1.3.1. Efectos de la radiación ionizante en la vía visual**

El uso de radiación ionizante como tratamiento profiláctico o terapéutico en lesiones cerebrales también puede generar efectos secundarios a la vía visual. Estudios en niños con LLA que fueron sometidos a un tratamiento profiláctico con RH y dosis de radiación de 12 y 18 Gy mostraron mediante estudios de PEV, que la vía visual había sufrido cambios, observándose incrementos significativos en la latencia significativos de los componentes tardíos (P2, N2 y P3) (Meshref, 2013). Asimismo, con el uso de pruebas psicológicas demostraron afectaciones en las funciones cognitivas como el coeficiente intelectual (IQ), déficit de aprendizaje, pérdida de la concentración, las cuales se vieron agravadas a mayor dosis (24 Gy) (Halberg, 1992; Meshref, 2013). Otros estudios que emplearon radioterapia para tratar lesiones de cabeza y cuello tales como el carcinoma nasofaríngeo (70 Gy) y en cuello (50 Gy) mostraron latencias y amplitudes VEP anormales durante los 2 y 3 años tras irradiación (Hu, 2003). En animales también se han reportado alteraciones de memoria

después de siete meses de irradiación con dosis de 30 Gy (Lamproglou, 1995). Resultados similares se observaron al irradiar ratas con dosis craneales de 40 Gy repartida en 8 fracciones en 24 días (Yoneoka, 1999).

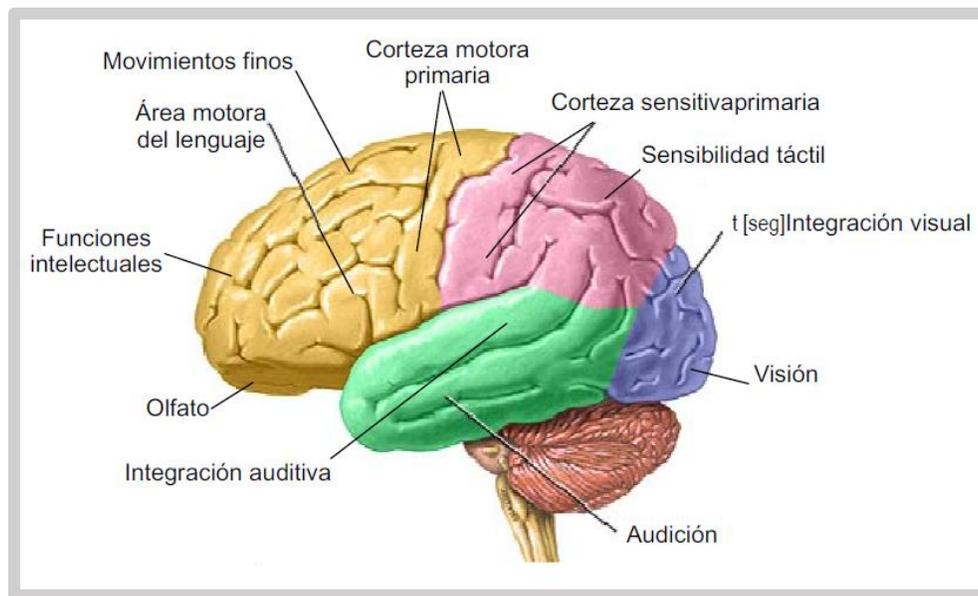
#### 1.4. Corteza estriada y vía visual

La corteza cerebral es la cubierta externa de la materia gris sobre los hemisferios. Típicamente tiene un grosor de 2 a 3 mm y cubre las prominencias o circunvalaciones y cisuras (Swenson, 2006) que delimitan las diferentes zonas o regiones del cerebro. La más importante es la denominada cisura longitudinal, que divide al cerebro en los hemisferios derecho e izquierdo y a su vez, cada hemisferio se subdivide en cuatro cortezas primarias: temporal, frontal, parietal y occipital (**Figura 2**).



**Figura 2.** Monografía del cerebro humano. Vista en el plano axial y sagital.

Cada una de las áreas de la corteza cerebral es responsable de funciones específicas (**Figura 3**), por ejemplo, el lóbulo parietal detalla un mapa de la sensibilidad, el lóbulo occipital se encarga de la visión, el temporal del oído y el lóbulo frontal es el encargado de un gran número de funciones como resolver problemas complejos, control de la actividad muscular, etc.

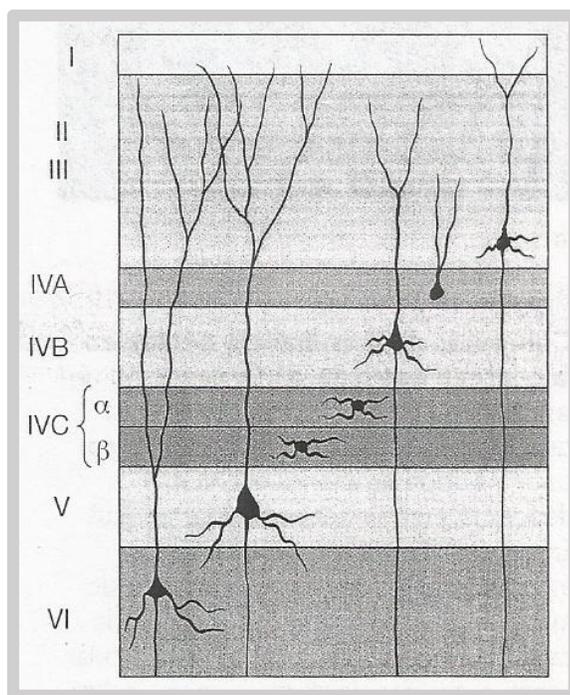


**Figura 3.** Funciones de las distintas áreas de la corteza cerebral.

La mayor parte de corteza cerebral es neocorteza. La corteza tiene los cuerpos neuronales organizados en alrededor de seis capas que contienen entre 10 y 14 mil millones de neuronas. A cada una de las seis capas se les adjudica un número romano que van desde la capa superficial hasta la más profunda. La capa I es la capa molecular localizada por debajo del piamadre (meninge cerebral) compuesta por axones y dendritas, la capa II es llamada granular externa, capa III es la piramidal externa, capa IV denominada granular interna (contiene IVA, IVB y IVC), capa V es la piramidal interna y la capa VI llamada multiforme o fusiforme. Cada una de las capas contiene distintas formas neuronales, tamaños y densidad, así como diferentes organizaciones de fibras nerviosas. Funcionalmente, las capas de la corteza cerebral se pueden dividir en tres partes: (1) Capas supragranulares (capa I a III) son de origen primario y la terminación de las conexiones intracorticales que son asociativas (con otras del mismo hemisferio) o comisurales (conexiones con el hemisferio opuesto principalmente a través del cuerpo calloso). Esta capa está altamente desarrollada y permite la comunicación entre una proporción de la corteza y otras regiones. (2) Capa granular interna (capa IV) recibe conexiones talamocorticales (TC) especialmente de los núcleos talámicos específicos. (3) Capas infragranulares (capa V y VI) conectan principalmente la corteza cerebral con las regiones subcorticales. Estas capas están más desarrolladas en áreas motoras las cuales tienen

capas granulares extremadamente pequeñas o inexistentes y a menudo se denomina “corteza agranular”. La capa V da lugar a todas las principales proyecciones eferentes corticales a ganglios basales, tronco encefálico y médula espinal. La capa VI se proyecta principalmente al tálamo. Hay distintos tipos de células neuronales distribuidas en la corteza cerebral; las neuronas piramidales se encuentran en las capas III y V las cuales contienen una dendrita apical que se extiende hasta la capa I. Las dendritas de las neuronas corticales tienen muchas espinas que son sitios de sinapsis y un axón delgado que surge de la base de la célula piramidal que tiene un proceso colateral y largo que permite una conexión con distintas regiones cerebrales y que se extiende a través de la sustancia blanca hacia la corteza. Las células estrelladas o granulares son más prominentes en la capa IV y sus axones permanecen en la corteza (Swenson, 2006). La corteza cerebral tiene un rol prevalente en la generación y sincronización de diferentes ritmos cerebrales. Los principales tipos y redes neuronales implicados en las oscilaciones cerebrales son: neuronas corticotálámicas (TC), el circuito inhibitorio recurrente entre las neuronas tálamo-reticulares (RE) y TC y las proyecciones tallo-tálamo colinérgicas (y otros neuromoduladores) (Steriade, 2006).

En la corteza estriada o corteza visual primaria, se han identificado neuronas de distintas formas, pero principalmente a las definidas por su apariencia de árboles dendríticos: Neuronas estrelladas espinosas y células piramidales. Las células estrelladas espinosas son pequeñas neuronas dendritas cubiertas por espinas que salen del cuerpo celular y que se encuentran en las dos filas de la capa IVC. Fuera de esta capa se encuentra poblado por las células piramidales (**Figura 4**). Las células piramidales también están cubiertas por espinas, las células piramidales pueden tener dendritas que se extiendan hacia otras capas y solamente ellas poseen axones hacia fuera de la corteza estriada para formar conexiones con otras regiones del cerebro. Los axones de las células estrelladas realizan conexiones locales en la corteza visual. Además de las neuronas espinosas también se encuentran dispersas en todas las capas corticales neuronas inhibitorias que carecen de espinas y se encargan de realizar conexiones locales (Bear, 2008).

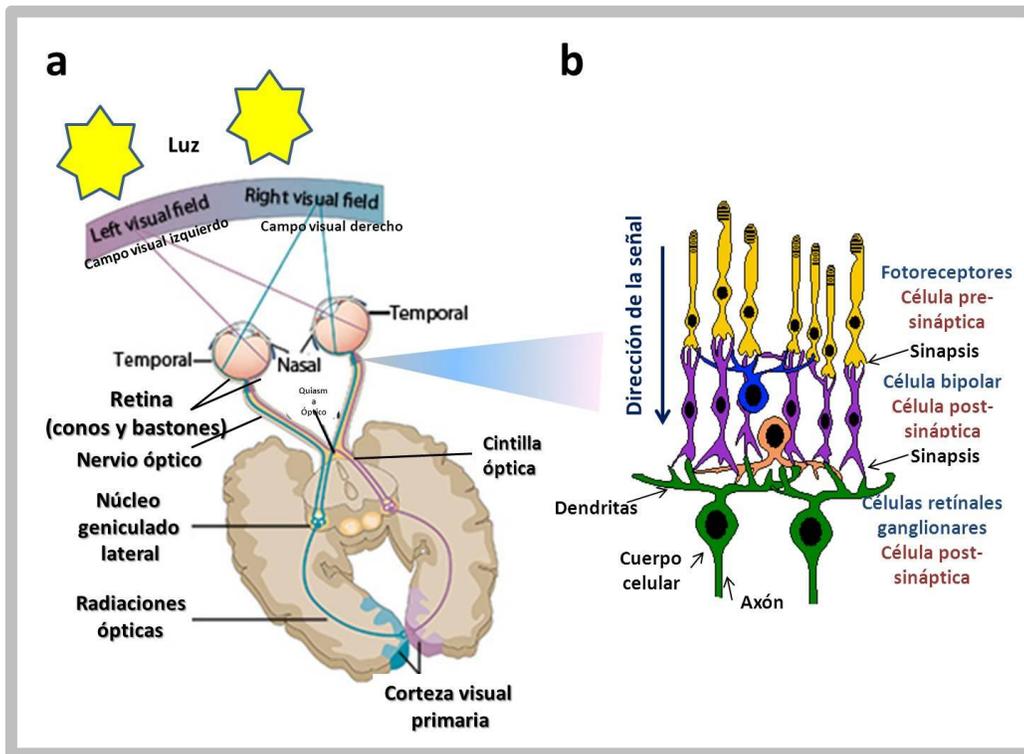


**Figura 4.** Morfología dendrítica de algunas de las células de la corteza estriada (Bear, 2008).

Dentro de citoarquitectura de la corteza cerebral la corteza visual primaria (también llamada V1 y corteza estriada) que representa el área 17 de Brodmann y se localiza en la parte occipital la cual juega un rol importante en el procesamiento de la información visual. Esta parte del SNC tiene la habilidad de detectar e interpretar la información de la luz visible para construir una representación del entorno circundante. El sistema visual lleva a cabo una serie de tareas complejas, que incluyen la percepción de la luz y la formación de representaciones monoculares, identificación y categorización de los objetos visuales, evaluar las distancias que hay entre los objetos y guiar los movimientos del cuerpo en relación de los objetos vistos (Bear, 2008).

Las interacciones entre la luz y el entorno pueden ser perceptibles a través del ojo. El ojo es un órgano especializado en la detección, localización y análisis de la luz. La anatomía del ojo está integrada por la pupila que es una abertura circular que permite la entrada de la luz al ojo para que alcance la retina y tiene un color oscuro a causa de los pigmentos de la retina que absorben a luz. La pupila está rodeada por el iris que contiene dos músculos que pueden modificar el tamaño de la pupila uno lo hace más pequeña cuando se contrae y el otro la hace

mayor. La pupila y el iris están cubiertos por una superficie externa transparente llamada córnea. La córnea se continúa con la esclera (parte blanca del ojo) que forma la pared del glóbulo ocular. El glóbulo ocular se sitúa en una fosa del cráneo, también llamada órbita ocular. Una vez que el ojo percibe la luz y ésta alcanza la retina, comienza el procesamiento de la información. La vía para la salida de información visual del ojo es desde los fotorreceptores a las células bipolares y de ahí a las células ganglionares. Las células ganglionares disparan potenciales de acción en respuesta a la luz y los impulsos se propagan a través del nervio óptico al resto del cerebro, el procesamiento retiniano está influenciado por las células horizontales que reciben las señales de los fotorreceptores y proyectan neuritas lateralmente para influir a las células bipolares de alrededor y a los fotorreceptores. Las células amacrinas reciben señales de las células bipolares y proyectan lateralmente para influir en las células ganglionares. Los fotorreceptores son las únicas células sensibles a la luz en la retina y las células ganglionares son las únicas fuentes de salida de información desde la retina (Bear, 2008). La retina contiene una organización laminar por donde la luz debe pasar antes de llegar a los fotorreceptores; las capas son: ganglionares (contiene a las células ganglionares), plexiforme interna, nuclear interna (contiene a las células bipolares, horizontales y amacrinas), plexiforme externa, nuclear externa (contiene a los cuerpos de fotorreceptores) y la capa de segmentos externos a los fotorreceptores (contiene los elementos sensibles a la luz de la retina) y están insertados en el epitelio de pigmentación el cual absorbe cualquier rayo de luz que pase enteramente a través de la retina minimizando la reflexión de la luz dentro del ojo que emborraría la imagen. Una vez que llega la luz, los fotorreceptores convierten o transducen la energía lumínica en cambios del potencial de membrana y comienza la fototransducción con los bastones (que son 20 veces más números en la retina humana que los conos). Uno de los modos en que la información se representa en el SNC es por cambios en el potencial de membrana de las neuronas (Bear, 2008). Los potenciales de acción son disparadas por las células ganglionares mediante sus axones que abandonan la retina para pasar al nervio óptico, el quiasma óptico y la cintilla óptica (**Figura 5**).



**Figura 5.** Proyección retinofuga. a) muestra el nervio óptico, quiasma, cintilla óptica, núcleo lateral geniculado (NGL), radiación óptica y la corteza visual primaria. b) Vía desde las células ganglionares retinales hasta los fotorreceptores.

Un pequeño número de axones de la cintilla óptica hacen sinapsis (comunicación de neuronas por medio de una señal eléctrica o química) con células del hipocampo y el otro 10% pasa por el tálamo e inerva en el mesencéfalo que inerva en el NGL del tálamo dorsal. De las neuronas del NGL surgen axones que se proyectan en la corteza visual primaria, esta proyección se conoce como radiación óptica (Bear, 2008).

### 1.5. Actividad eléctrica en el cerebro

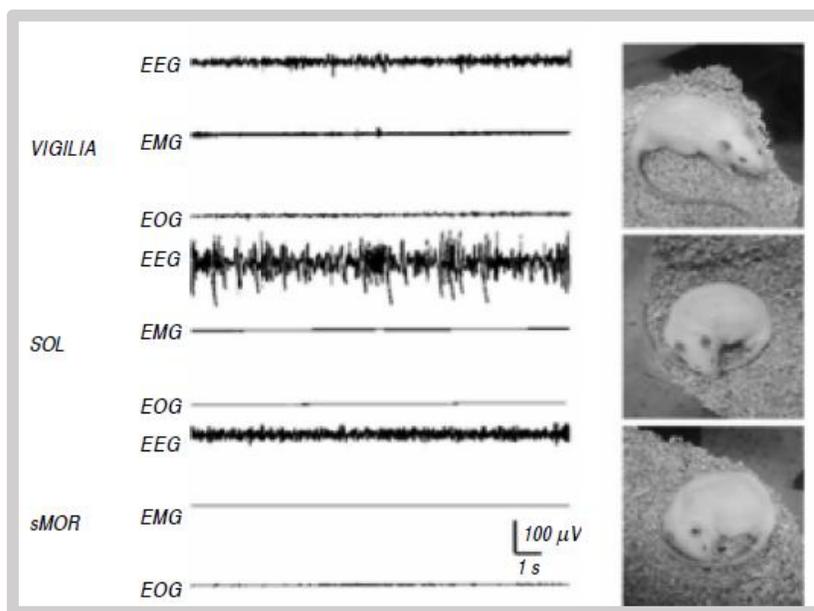
La actividad eléctrica del cerebro está conformada por biopotenciales generados en la corteza externa de las neuronas piramidales que constituyen el tejido nervioso. Las señales eléctricas poseen una naturaleza iónica. La frecuencia de la actividad eléctrica espontánea del cerebro, refleja propiedades intrínsecas de las membranas de neuronas, así como la organización e

interconectividad de la red a la que pertenecen (Lopes da Silva, 1991). Las redes que se forman pueden ser locales o pueden estar distribuidas por distintas partes del cerebro abarcando gran número de neuronas. La actividad sincronizada del grupo de neuronas produce señales eléctricas, las cuales difieren en frecuencia y amplitud, dando lugar a los ritmos cerebrales. Cuando hay una gran actividad sináptica y se encuentra distribuida en la corteza cerebral se propician señales eléctricas de baja frecuencia y alta amplitud, mientras que cuando la señal está localizada en una región y hay menor cuerpos neurales las señales se manifiestan con frecuencias más altas y amplitudes bajas tal es el caso como las señales de las bandas alfa y las beta o gamma, respectivamente (Neuper y Pfurtscheller, 2001). La actividad cerebral se propaga a través del tejido circundante y puede ser detectada por electrodos que cumplan la función de transductores, convirtiendo las señales iónicas en señales eléctricas para su posterior procesamiento y análisis.

### **1.5.1. Electroencefalograma**

El electroencefalograma (EEG, ondas cerebrales) es una técnica neurofisiológica normalmente no invasiva que consiste en una señal compleja y sirve como un indicador importante del estado cerebral por ejemplo en estado de vigilia y/o sueño (**Figura 6**).

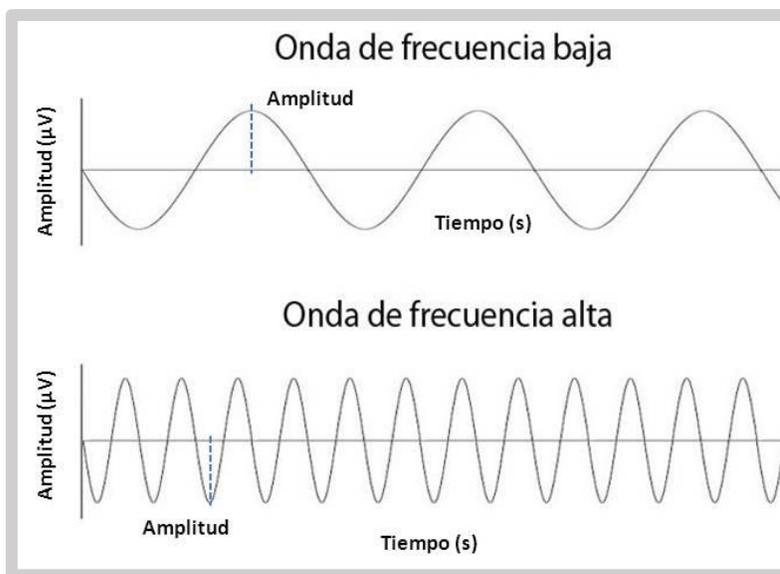
Las investigaciones cerebrales están íntimamente vinculadas en la viabilidad de adquirir registros EEG y su análisis cuantitativo. El análisis espectral consiste en la descomposición de una señal en sus componentes de frecuencia que los constituye, además es un método importante para investigar la actividad cerebral (Achermann, 2009). Los EEG son registros colectados por electrodos, los cuales pueden variar debido a su posición de colocación. Hay microelectrodos invasivos que se implantan en el interior del cerebro mediante intervención quirúrgica, otros que son colocados directamente en la corteza cerebral y también puede requerir cirugía, por último, hay electrodos subdérmicos los cuales son colocados con pegamentos especiales sobre el cuero cabelludo. Las señales complejas de los EEG son el resultado de potenciales de células piramidales corticales (Achermann, 2009).



**Figura 6.** Registro poligráfico de rata adulta. Se muestra la actividad cortical (EEG) del músculo del cuello (EMG) y movimientos oculares (EOG), así como la postura típica de la rata en cada etapa. Durante la vigilia el EEG muestra predominantemente actividad de bajo voltaje ( $40\text{-}60\ \mu\text{V}$ ) y alta frecuencia ( $30\text{-}50\ \text{Hz}$ ). Durante el SOL se presentan ondas de baja frecuencia ( $0.1\text{-}10\ \text{Hz}$ ) y gran amplitud ( $200\text{-}400\ \mu\text{V}$ ). En el sMOR el EEG consiste de ondas de alta frecuencia ( $20\text{-}40\ \text{Hz}$ ) y baja amplitud ( $50\text{-}80\ \mu\text{V}$ ) (Franco, 2012).

El análisis espectral es una aproximación matemática que cuantifica el EEG y se basa en la descomposición de las frecuencias constitutivas de la señal. El método matemático comúnmente empleado para obtener el espectro es la transformada rápida de Fourier (FFT, acrónimo en inglés). La FFT convierte una señal analógica a digital (A/D) con el fin de ser procesadas con una computadora mediante el uso de filtros antialiasing (antialiasing filter) usando para limpiar la señal al realizar esta conversión de señal seguida de una calibración. Las señales EEG son diferencias de potencial eléctrico que varían continuamente con el tiempo. La conversión de señales (A/D) involucra el muestreo y la cuantificación de las señales, durante el muestreo la frecuencia debe evitar el aliasing, es decir, el reflejo de las frecuencias rápidas en un rango de baja frecuencia, esto significa que el muestreo de la frecuencia debe ser igual o mayor que dos veces la frecuencia del componente más alto presente en la señal, en la práctica es necesario un filtrado de paso bajo adecuado antes del

muestreo para evitar el aliasing ya que después de la conversión de señales (A/D) los efectos antialiasing no pueden ser reconocidos o eliminados. Con respecto a la grabación es recomendable realizar una calibración anterior a cada grabación para facilitar el cálculo y los espectros sean escalados correctamente (Achermann, 2009). Como se muestra en la **Figura 2** el registro EEG se integra de señales de onda que poseen una frecuencia (Hz) y una amplitud ( $\mu\text{V}$ ), la frecuencia hace referencia a la cantidad de ondas por unidad de tiempo y se clasifican en altas y bajas frecuencias dependiendo de la cantidad de sus ondas transcurridas en un periodo (tiempo entre dos puntos transcurridos equivalentes de la onda). La frecuencia es baja cuando menos sucesos sucedan en un periodo y viceversa, cuando pasen más sucesos en el mismo periodo se trata de una frecuencia alta (**Figura 7**). La amplitud es la distancia entre el punto más alejado de una onda y el punto medio o de equilibrio ver **Figura 7**.



**Figura 7.** Esquema que ejemplifica las frecuencias altas, bajas y amplitud.

La FFT es un algoritmo ampliamente usado en programas computacionales y una de sus principales aplicaciones es en la electrónica específicamente en el análisis de EEG de ondas complejas mediante la transformación de señales analógicas a digitales. En donde se eligen  $N$  puntos de datos y se obtiene una serie discreta de Fourier, que está definida como (Cooley, 1969):

$$X(j) = \sum_{n=0}^{N-1} A(n) W_N^{jn} \dots \dots \dots (Expresión 1)$$

En donde A(n) es una secuencia de las amplitudes complejas de Fourier en función de la frecuencia n. La X(j), j = 0, 1, ..., N-1 se considera una secuencia compleja y en un problema puede representar una muestra en N puntos de muestreo. W<sub>N</sub> se representa en:

$$W_N = \exp\left(\frac{2\pi i}{N}\right) \dots \dots \dots (Expresión 2)$$

W<sub>N</sub> en términos de senos y cosenos para hacer más fácil la notación y derivación de las fórmulas se expresa como:

$$W_N = \cos\left(\frac{2\pi}{N}\right) + i \sin\left(\frac{2\pi}{N}\right) \dots \dots \dots (Expresión 3)$$

Empleando las expresiones anteriores y realizando las operaciones se obtienen los valores de X(j) que representan las componentes digitales que integran la señal analógica. En las resultantes de X(j) se obtienen partes reales e imaginarias ejemplo (0, -4j) que en el plano cartesiano se representa la parte real en el eje horizontal y la parte imaginaria en el eje vertical. Cabe mencionar que la señal analógica puede adquirir todos los valores posibles de un intervalo mientras que las señales digitales solo pueden tomar dos valores posibles (0 y 1).

Otro parámetro a considerar es el espectro de potencia (poder) o varianza sobre la frecuencia de las componentes de una señal, que está definido como la FFT de la función de autocorrelación. Los espectros de densidad de potencia se pueden estimar por el método del paralelogramo (Welch, 1967) para este efecto, la señal se divide en segmentos que pueden superponerse, los segmentos son ponderados en función de una señal no rectangular para reducir los efectos de borde (fuga) antes de la FFT. Los valores absolutos de la FFT son cuadrados para obtener la densidad de potencia de los valores. Para la estimación del espectro de densidad de potencia se promedian varios segmentos contenedores de la frecuencia con el

fin de reducir la varianza. La resolución de la frecuencia está dada por el inverso de la longitud del segmento en el tiempo. Las unidades de valores de la densidad de poder se expresan en  $V^2/Hz$  o  $\mu V^2/Hz$ . Los distintos rangos de frecuencias se suman entre sí y las unidades resultantes de la potencia son  $V^2$  o  $\mu V^2$  (Achermann, 2009).

### **1.5.2. Ritmos cerebrales**

Los ritmos cerebrales se definen como ondas regulares a lo largo del tiempo y se caracterizan por su frecuencia, localización y asociación con varios aspectos de funcionamiento y el estado del cerebro. Dicha actividad se produce o inhibe según los mecanismos o estados del cerebro como, por ejemplo, la vigilia, el sueño, el coma o determinadas acciones ejecutadas por el sujeto. Los ritmos cerebrales se producen sobre un grupo de neuronas y pueden ser bloqueados o atenuados cuando se presentan eventos que afectan la zona cortical involucrada, a este fenómeno se le llama desincronización relacionada al evento (ERD, acrónimo en inglés) (Spinelli, 2000). Actualmente la neurociencia ha reconocido la importancia de los fenómenos oscilatorios y la funcionalidad del EEG. Los ritmos de frecuencia se han dividido según las bandas de frecuencia que ocupan y se les ha denominado con letras griegas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\theta$  y  $\Upsilon$  las cuales se diferencian por su localización y por su funcionalidad.

#### **Ritmo delta**

El ritmo delta posee una gran amplitud y baja frecuencia, su banda típica se encuentra de 0.5 a 3.9 Hz (Franco, 2012) y presenta amplitudes de 20 a 200  $\mu V$ . Se encuentra durante el sueño profundo, en caso de que el sujeto esté en vigilia indica alguna anomalía cerebral. El ritmo delta es el más predominante bajo el uso de un anestésico (Brown, 2010). Delta también está ligado a funciones cognitivas como detección de señales y toma de decisiones, esta banda se encuentra localizada en el área parietal, central y frontal (Schurmann, 1995)

## **Ritmo tetha**

El ritmo tetha es el ritmo menos frecuente se presenta en la banda de frecuencia de 4 a 7.9 Hz (Franco, 2012) con amplitudes que oscilan de 20 a 100  $\mu\text{V}$ . Mayormente es encontrado en niños, adultos sanos puede detectarse en estado de adormecimiento (parestesia) y sueño. Se registra en el lóbulo frontal y está relacionada fuertemente con el procesamiento cognitivo (Basar, 1998) y la atención selectiva (Basar-Eroglu, 1992). La respuesta de tetha en la componente P300 es más estable (Basar, 2001). Experimentos de búsqueda y comportamiento motor en gatos mostraron que tetha está relacionado con el estado de alerta y disposición para procesar la información (Basar, 1998).

## **Ritmo alfa**

El ritmo alfa se presenta en la banda de frecuencia entre 8 a 12.9 Hz (Franco, 2012) con amplitudes que oscilan entre 20 y 60  $\mu\text{V}$ . Son encontrados en adultos en estado de reposo visual (ojos cerrados) y tranquilidad mental. El ritmo es atenuado o bloqueado por la atención visual y esfuerzo mental o físico. Durante el sueño profundo las ondas alfa se ausentan, las frecuencias se encuentran concentradas principalmente en el área occipital (Gray, 1989; Eckhorn, 1968) sin embargo, también son generadas en el circuito tálamo-cortical, hipocampo y formación reticular. En tanto a funciones cognitivas alfa influye significativamente en la componente P300, alfa también se relaciona a nivel celular, sensorial (Basar, 2001). Alfa está fuertemente correlacionado con la memoria de trabajo y posiblemente con engramas de memoria a largo plazo (Klimesh, 1994).

## **Ritmo beta**

El ritmo beta es un ritmo irregular con frecuencias de 13 a 19.9 Hz (Franco, 2012) y amplitud de entre 2 y 20  $\mu\text{V}$ , suele asociarse a un estado de concentración mental. Se detecta principalmente en la región central y frontal, cerca o sobre la corteza motora primaria (Pfurtscheller, 1998). La actividad beta se transforma en oscilaciones gamma bajo una despolarización de la membrana y en estudios en humanos de EEG se considera a estos dos

grupos como una sola entidad ya que ocurren en conjunto y fluctúan simultáneamente durante diferentes actividades mentales (Steriade, 2006).

### **Ritmo gamma**

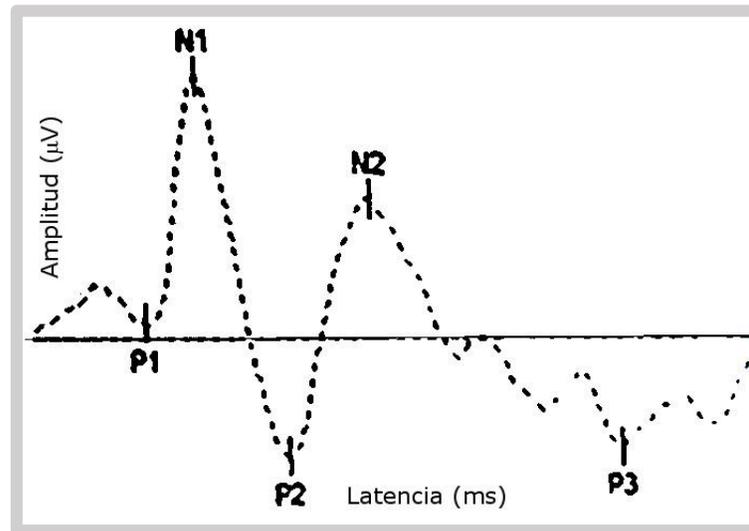
El ritmo gamma se manifiesta frecuencias de 20 a 100 Hz (Franco, 2012) y amplitudes de entre 5 y 10  $\mu$ V. Es una actividad armónica como resultado de estímulos sensoriales. La banda gamma se encuentra distribuida selectivamente en diferentes estructuras corticales y subcorticales. Este ritmo se encuentra sincronizado con el ritmo alfa (Klimesch, 1997; Sigala, 2014). Las oscilaciones gamma, así como delta y tetha controlan las funciones integradoras del cerebro en absoluto a nivel sensorial y cognitivos (Basar, 2001). La frecuencia gamma se relaciona con la componente P300 ligada a procesos cognitivos (Basar-Eroglu, 1991).

La dinámica cerebral se rige por la sincronía de las oscilaciones alfa, delta, tetha, gamma que proporcionan la integración de funciones cerebrales, especialmente para la comunicación, percepción, movimiento y funciones asociativas relacionadas con la atención aprendizaje y la memoria (Basar, 2001). Los ritmos cerebrales se relacionan también a la regulación del sueño-vigila, presencia de anestesia y en múltiples funciones cognitivas (Klimesch, 1997; Sigala, 2014).

### **1.5.3. Potenciales Evocados Visuales**

Al igual que los registros EEG, los PEV son ampliamente usados como técnicas no invasivas que son usados tanto en laboratorio como en la clínica debido a que son técnicas que pueden realizarse en tiempo real e *in vivo*. Los PEVs se usan para investigar la fisiología y la patofisiología tanto de la vía visual como de la corteza visual. Se basa en el estudio de señales eléctricas que son generadas a nivel de la corteza estriada mediante la combinación de actividades post-sinápticas (Tobimatsu, 2006; Creutzfeldt, 1969) tras la estimulación luminosa. Las respuestas obtenidas con los estudios PEV es una señal promedio de 50 a 100 estímulos visuales y se cuantifican dos parámetros: la latencia y la amplitud. La latencia es el tiempo en milisegundos (ms) que tarda en aparecer la señal tras haber realizado la

estimulación luminosa y la amplitud que es el tamaño de la respuesta en microvoltios ( $\mu\text{V}$ ). Las respuestas PEV se clasifican en componentes tempranos llamados P1 y N1 los cuales reflejan la integridad del nervio óptico (Holder, 2004; You, 2011) y componentes tardíos representados por las respuestas de P2 en adelante los cuales son componentes que se relacionan a las funciones cognitivas como aprendizaje, memoria, atención, etc. (Aminoff, 1994; Tobimatsu 2006). Los PEVs han sido ampliamente usados en distintos animales entre ellos las ratas empleadas para medir el efecto de un fármaco, para comparar efectos tóxicos o terapéuticos. Los PEV en ratas han empleados con distintas configuraciones de electrodos tales como agujas subdérmicas y electrodos implantados, también se han reportado distintas formas de estimulación visual empleando instrumentos luminosos como estrobos fotoestimuladores, sistemas de campo completo llamados Ganzfeld y diodos LED (You, 2011). Un ejemplo de traza adquirida de PEV para su cuantificación se muestra en la siguiente **Figura 8**.



**Figura 8.** Representación de un Potencial Evocado Visual.

*“Si no conozco una cosa, la investigaré”*

*Louis Pasteur*

---

---

# Planteamiento del problema

---

---

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

La radioterapia es una alternativa usada ampliamente en México para el tratamiento de diversas lesiones neoplasias. La radioterapia intracraneal es un tratamiento comúnmente emplead en el tratamiento curativo y paliativo de neoplasias benignas y malignas del SNC.

La radioterapia holocraneal o cráneo total se utiliza como esquema para el tratamiento de metástasis cerebrales, como tratamiento profiláctico para LLA y para el linfoma linfoblástico No-Hodking (Rades, 2008). El uso de radiaciones ionizantes provoca efectos directos como la muerte celular asociado al daño del ADN, sin embargo, en la actualidad el interés por estudiar los efectos secundarios de la radiación se ha fortalecido. Hasta ahora, la etiología de diversos efectos secundarios y a largo plazo no han sido del todo descrita o comprendida, si bien, lo que es sabido que el efecto provocado es dependiente tanto de la cantidad de dosis administrada, de la forma en que se administra (en forma de dosis única o fraccionada) y de la estructura anatómica en tratamiento.

Los efectos a largo plazo asociados con funciones cognitivas se han estudiado con el fin de tener una proyección de la calidad de vida del paciente tras radiación. Por ejemplo, en infantes con LLA los cuales se sometieron a distintos protocolos profilácticos con dosis de 24, 18 y 12 Gy, mostrando que los irradiados con 24 Gy presentan una disminución significativa del puntaje en su coeficiente intelectual, aprendizaje, concentración y capacidad de secuenciación y procesamiento a diferencia de los tratados con dosis de 12 Gy. Dichas anormalidades son el resultado de la interacción de la radiación ionizante con las células, pero aún son una incógnita los detalles de los procesos neurales que intervienen para causar dichos cambios.

La realización de este trabajo pretende trasladar los resultados descritos en niños con LLA en un modelo en rata con la finalidad de estudiar objetivamente los procesos neurales que ocurren y así aportar hallazgos sobre el papel que juega la RH sobre los efectos observados en estudios neurológicos como PEV y EEG.

*“Nada tiene tanto poder para ampliar la mente como la capacidad de investigar de forma sistemática y real todo lo que es susceptible de observación en la vida”*

*Marco Aurelio*

---

---

# Justificación

---

---

### 3. JUSTIFICACIÓN

---

La terapia intracraneal es usada convencionalmente para el tratamiento de metástasis y como terapia paliativa tanto para adultos como en niños. Sin embargo, en la actualidad los efectos secundarios de la radiación ionizante no son del todo evitados por lo que la calidad de vida del paciente a tiempos largos de haber recibido irradiación se ve afectada. La presente investigación busca elucidar el efecto a mediano plazo de la radiación holocraneal a nivel de la corteza visual con la ayuda de técnicas neurofisiológicas como los PEV y los registros EEG realizados en un modelo murino a un mes después de haber recibido radiación.

El uso de un modelo en rata es óptimo para usarse como modelo de efecto de tejido sano y así poder estudiar solamente el efecto de la radiación, ya que el uso de pacientes conlleva una cantidad de variables difíciles de controlar, entre las cuales se encuentra la enfermedad misma, la localización de la lesión o tumor y el uso de medicamentos coadyuvantes.

El desarrollo de la investigación busca reproducir los atrasos de latencia de PEV observados en niños que recibieron tratamiento profiláctico con dosis holocraneal de 24-18 Gy y así poder realizar estudios minuciosos en ratas que describan los procesos neurales que intervienen ocasionando dichos efectos, que de encontrarse abre las puertas a proponer algún tratamiento con el fin de aminorar o evitar su presencia a tiempos largos.

*“En algún lugar, algo increíble está esperando ser conocido”*

*-Carl Sagan*

---

---

# Hipótesis

---

---

## 4. HIPÓTESIS

---

### **Alternativa**

En un modelo en rata, el uso de radiación holocraneal causará cambios en la latencia de los componentes tardíos de los PEV y en la potencia de los ritmos cerebrales relacionados con la actividad cerebral a las cuatro semanas tras irradiación.

### **Nula**

En un modelo en rata, el uso de radiación holocraneal no causará cambios en la latencia de los componentes tardíos de los PEV y ni en la potencia de los ritmos cerebrales relacionados con la actividad cerebral a las cuatro semanas tras irradiación.

*“Cuando más alto coloque el hombre su meta, tanto más crecerá”*

*Friedrich Schiller*

---

---

# Objetivos

---

---

# 5. OBJETIVOS: GENERALES Y ESPECÍFICOS

---

## Objetivo general

Medir los efectos de la radiación holocraneal en los PEV y en los registros EEG en un modelo en rata después de cuatro semanas de irradiación.

## Objetivos específicos

- 1) Diseñar un plan de tratamiento de irradiación holocraneal en rata con una dosis de 20 Gy al isocentro protegiendo estructuras como la mucosa orofaríngea, tráquea, ojos y el conducto auditivo.
- 2) Caracterizar la intensidad luminosa e iluminancia de la lámpara Flash LED: EBNeuro usada para la adquisición de PEV.
- 3) Determinar variaciones neurales en la corteza visual y actividad cerebral en ratas con y sin radiación a cerebro completo cuatro semanas tras irradiación mediante técnicas neurofisiológicas como registros PEV y EEG.
- 4) Comparación de parámetros como: latencia, amplitud y el poder de las frecuencias cerebrales entre el grupo control (sham) y el irradiado usando la prueba U de Mann-Whitney para muestras separadas.

*“Siempre se debe preferir la acción a la crítica”*

*Franklin D. Roosevelt*

---

---

# Metodología

---

---

# 6. DISEÑO METODOLÓGICO

---

## 6.1 Diseño del estudio

Este estudio tiene un enfoque analítico, transversal, observacional y de seguimiento de medidas experimentales con asignación aleatoria y grupo control.

## 6.2 Universo y Muestra

22 ratas macho de la cepa wistar de 240-260 g.

Muestra no probabilística

## 6.3 Procedimientos

### **Iluminancia e intensidad luminosa de la lámpara Flash LED: EBNeuro**

La lámpara es un estimulador fótico que genera flashes de duración corta de luz blanca por medio de 96 LEDs de estado sólido. La lámpara se colocó en la posición inicial o de origen (0, 7,0) y a partir de este punto se realizaron los desplazamientos a cada 2 cm a lo largo de los planos XYZ del espacio que ofrece el marco estereotáxico 8x8x8 cm. El luxómetro se fijó a la torre de estereotáxia a la altura del porta cánula de esta manera se garantizó el libre movimiento a través del espacio en estudio. La colección de datos se realizó bajo la luz natural del ambiente y se tomaron en cuenta los luxes iniciales para la corrección de la iluminancia por fondo.

### **Implantación de electrodos**

Las ratas fueron anestesiadas vía intraperitoneal con ketamina y xilazina (80mg/kg y 10mg/kg, respectivamente) y fueron colocadas en un marco de estereotáxia fijándolas con lápices interauriculares. El pelo se removió y se limpió el cuero cabelludo con una solución de

polividona yodada (isodine). En el cuero cabelludo se realizó una incisión a lo largo de la línea media y se dejaron al descubierto las suturas craneales (bregma, lambda y la línea media), la piel fue retraída a los extremos, misma que fue tratada tópicamente con isodine. Con una fresa odontológica se procedió a realizar pequeñas cuencas craneales mediante trépanos para fijar al electrodo de referencia y al electrodo activo. El electrodo de referencia fue situado 5 mm antes de bregma y el electrodo activo se colocó a nivel de la corteza visual primaria con coordenadas anteroposterior 7 mm después de bregma y lateral 3 mm de la línea media. Los electrodos utilizados fueron de tipo disco (EBNeuro, Italia). Un electrodo tierra fue colocado en el lóbulo de la oreja derecha de la rata sujetado con un caimán.

### **Registros PEV**

Tras la cirugía para la colocación de los electrodos el ojo izquierdo de la rata fue tratado con un midriático de tropicamida (TP Ofteno, Sophia) para estimular la dilatación de la pupila con el fin de asegurar la entrada de la mayor cantidad de luz. La rata fue adaptada a la oscuridad por una duración de 5 min. El PEV fue adquirido a los 25 min tras la colocación de la anestesia para implantación de electrodos. La estimulación consistió en el uso de una lámpara Flash LED: EBNeuro diseñada para estudios en seres humanos pero probada en ratas exclusivamente para este estudio (Ortiz, 2018). La lámpara fue configurada para suministrar una serie de 100 flashes con una frecuencia de 1 Hz, un tamaño de paso de los filtros mínimos y máximos de 1 y 100 Hz respectivamente con tiempo de estudio de 200 ms. Mediante la obtención de la traza PEV se procedió a la evaluación de cada uno de sus componentes tempranos (P1, N1, P2) y tardíos (N2 y P3) características como la latencia (ms) y la amplitud ( $\mu\text{V}$ ).

### **Registros EEG**

Con el mismo posicionamiento de los electrodos colocados en la corteza cerebral y con amplificador (NEMUS F36589) se adquirió un registro EEG de 3 min con el fin de realizar un análisis espectral y corroborar que la rata estuviera completamente anestesiada. El análisis

espectral se realizó con el software Galileo NT considerando los ritmos cerebrales delta (3 – 4 Hz), teta (4 – 8 Hz), alfa (8 – 12.9 Hz), beta (12 – 19 Hz) y bajo gamma (19 – 50 Hz).

## **Irradiación**

La irradiación holocraneal consistió primeramente en asegurar la fijación de la rata para cubrir este requerimiento se empleó el sistema de fijación previamente desarrollado por Ballesteros, 2014. El diseño consiste a partir de una mascarilla termoplástica empleada en pacientes y una base de acrílico. La fijación es importante para asegurar que la dosis depositada cubra adecuadamente el cerebro completo y al mismo tiempo se protejan estructuras circundantes más radiosensibles como son la mucosa orofaríngea, conducto auditivo y en este estudio los ojos. Las ratas previamente anestesiadas con ketamina y xilazina (80mg/kg y 10mg/kg, respectivamente) fueron colocadas en la base de fijación estereotáxica para ser irradiadas con una dosis de 20 Gy al isocentro. Posteriormente se obtuvo un CBCT (Cone beam Tomography) para realizar correcciones por posición en la mesa de tratamiento.

La dosis se seleccionó de acuerdo con las dosis empleadas in vivo en las cuales se ha reportado un decremento de la latencia PEV y la presencia de efectos secundarios en las funciones cognitivas a largo plazo (Meshref, 2013; Halberg, 1992). La irradiación se llevó a cabo en un acelerador lineal dedicado TrueBeam STx® con una energía nominal de fotones de 6 MV, empleando una técnica de radioterapia estereotáxica a partir de las imágenes de tomografía computarizada de la rata que se tomarán previamente para la planeación del tratamiento. Se delineó de manera automática corte a corte el cerebro de acuerdo a las imágenes de tomografía. La irradiación se realizó a cerebro completo, es decir, cubriendo la totalidad del cráneo, pero protegiendo las estructuras circundantes. A su vez como grupo control se emplearon ratas pseudo-tratadas, ya que fueron montadas en la base de fijación y sometidas a las condiciones de irradiación incluyendo la anestesia a manera de simulación pero que no recibieron dosis de radiación alguna.

#### **6.4 Criterios de inclusión**

- Ratas machos de la cepa wistar con un peso de 240 a 260 g sanos.
- Ratas bajo anestesia general con ketamina/xilazina.

#### **6.5 Criterios de exclusión**

- Ratas con enfermedades respiratorias, enfermas o con ácaros.
- Ratas consientes o con poco grado de anestesia.
- Ratas con registros EEG con alta heterogeneidad de la señal (ruido).

#### **6.6. Instrumentos**

- Acelerador Lineal (TrueBeam STx®) de 6 MV acoplado a un micro colimador multihojas.
- Lámpara Flash LED: EBNeuro (Modelo BE Plus, EBNeuro S.P.A, Italia) con amplificador (NEMUS 2, EBNeuro, Italia).
- Medidor digital de luminancia (luxómetro HER-410, Japón)
- Marco y torre de estereotaxia para rata (Kopf, Estados Unidos).

#### **6.7 Recolección de datos**

La colección de datos para la caracterización de la lámpara Flash LED requirió la lectura de la iluminancia (luxes) de 130 coordenadas distribuidas en un espacio tridimensional ofrecido por el marco de estereotaxia de 8x8x8 cm. Por cada coordenada se realizaron 15 lecturas de iluminancia.

Los datos contemplados para los registros PEV del grupo control e irradiación se obtuvieron 25 min después de la administración de la anestesia para realizar la implantación de los electrodos y 5 min después de la colocación del midriático con una adaptación a la oscuridad de 5 min.

Los registros EEG están integrados por oscilaciones de onda obtenidas 10 min después de haber adquirido los registros PEV conservando la posición de los electrodos.

La dosis en Gy que reciben las estructuras de riesgo (OAR, Organs at-Risk) y el cerebro completo (PTV, Planning Treatment Volume) fueron adquiridas del histograma dosis-volumen del plan de irradiación usando cuatro arcos dinámicos.

### **6.8 Análisis de datos**

La distribución de la iluminancia en cada coordenada del espacio estereotáxico se determinó mediante la media de las quince lecturas obtenidas. La intensidad luminosa (cd) se calculó como el promedio de la media de iluminancia en cada coordenada y el cuadrado de la distancia conocida del luxómetro y la lámpara. El análisis de parámetros como la latencia y la amplitud PEV de cada grupo en estudio se basó en el cálculo de la media y la desviación estándar. La distribución de iluminancia se representó en gráficas de superficie plano XZ por cada valor de Y. La intensidad luminosa se representó en gráficas XY al máximo y mínimo valor de Z (4 y -4, respectivamente).

El poder de las bandas de frecuencia cerebral se normalizó con respecto al grupo control, posteriormente, se seleccionaron épocas de 2 seg del registro EEG para análisis de bandas de frecuencia cerebral. Se eligieron épocas pequeñas con el fin de descartar la mayor cantidad de ruido posible en la señal.

Los resultados de la latencia PEV se graficaron en diagramas de caja y bigotes, este tipo de gráfico se basa en el análisis de la mediana del conjunto ordenado de datos en el que la mediana se representa con una línea gruesa horizontal en el interior de la caja. La mediana nos indica que la mitad de los datos se encuentra por debajo y la otra mitad por arriba de ese valor. La línea inferior de la caja representa el primer cuartil y la línea superior el tercer cuartil, por lo tanto la caja abarca el rango intercuartílico, que se define como la diferencia entre el tercero y el primer rango. Los bigotes se extienden de cada extremo de la caja dentro de 1,5 rangos intercuartílicos. El bigote inferior va del primer cuartil al punto mínimo dentro del rango y el

bigote superior va del tercer cuartil al punto máximo dentro del rango. Cualquier punto fuera de los bigotes se le llama puntos atípicos y puntos atípicos extremos, los cuales se representan como puntos individuales afuera de las cajas y los bigotes.

El análisis de comparación de latencia PEV y el % de poder de las bandas de frecuencia cerebral para animales control e irradiados se realizó mediante un análisis estadístico no paramétrico: prueba U de Mann-Whitney para muestras separadas con un nivel de significancia  $p < 0.05$ .

### **6.9 Aspecto ético**

La investigación realizada es considerada ciencia básica por lo que se emplearon animales de laboratorio, para los cuales se siguieron las reglas especificadas por el Comité y de Uso y Cuidado Animal del Instituto de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y también de acuerdo con las reglas y regulaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999.

Los desechos biológicos se manejaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana de Bioseguridad NOM-087-ECOL-SSAI-2002.

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”*  
*Mahatma Gandhi*

---

---

# Resultados

---

---

# 7. RESULTADOS

## 7.1 Artículo aceptado

**Z. Ortiz-Arzate, M. A. Camacho-López, P. Ballesteros-Zebadúa, J. Franco-Pérez, C. Treviño-Palacios, R. Oros-Pantoja.** “Caracterización de la Lámpara Flash ELD: EBNeuro usada para adquirir Potenciales Evocados visuales en ratas”. **Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica 39(1): 21-28 (2018).**

### 7.1.1 Título del artículo

Caracterización de la Lámpara Flash ELD: EBNeuro usada para adquirir Potenciales Evocados visuales en ratas.

### 7.1.2 Página frontal (portada) del artículo

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Vol. 39 | No. 1 | ENERO - ABRIL 2018 | pp 21-28



[dx.doi.org/10.17488/RMIB.39.1.2](https://doi.org/10.17488/RMIB.39.1.2)

## Caracterización de la Lámpara Flash-LED: EBNeuro Usada para Adquirir Potenciales Evocados Visuales en Ratas

Characterization of the Flash-LED Lamp: EBNeuro Used to Acquired Visual Evoked Potentials in Rats

Z. Ortiz-Arzate<sup>1</sup>, M. A. Camacho-López<sup>1</sup>, P. Ballesteros-Zebadúa<sup>2</sup>, J. Franco-Pérez<sup>2</sup>, C. Treviño-Palacios<sup>3</sup>, R. Oros-Pantoja<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx)

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN)

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE)

### RESUMEN

La señal de la amplitud en análisis de Potenciales Evocados Visuales (PEVs) es una variable que depende del tipo de los electrodos, de la fuente luminosa, del estímulo visual y por consecuente, de la intensidad luminosa por lo que es fundamental reportarla para cada diseño experimental y así, garantizar su reproducibilidad. El objetivo de este trabajo es caracterizar una lámpara con 96 LEDs para la adquisición de PEVs en ratas. Se midió la iluminancia y la intensidad luminosa promedio en un sistema espacial XYZ de 8 cm<sup>3</sup> aplicable a un sistema estereotáxico para la fijación de ratas. Se realizaron desplazamientos cada 2 cm en cada plano. Se observó que debido a la distribución geométrica de los LEDs la distribución de la iluminancia no sigue la ley del inverso cuadrado, ya que aumenta conforme la lámpara se aleja. Finalmente, se seleccionó una coordenada para la colocación del ojo de la rata empleando una intensidad luminosa promedio para la adquisición del PEV de 1.043 cd e iluminancia de 128.77 luxes a una distancia ojo-lámpara de 9 cm. Una vez caracterizada la intensidad luminosa y de acuerdo con los PEVs obtenidos, esta lámpara puede utilizarse para estudios PEV en ratas en investigaciones posteriores.

**PALABRAS CLAVE:** Lámpara Flash-LED; iluminancia; intensidad luminosa; Potenciales Evocados Visuales; ratas.

### 7.1.3 Carta de aceptación



Ciudad Juárez, Chihuahua, México a 08 de noviembre del 2017

**Miguel Ángel Camacho López.**  
**Universidad Autónoma del Estado de México.**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto me permito hacer de su conocimiento que el artículo titulado:

**“Caracterización de la Lámpara Flash-LED: EBNeuro Usada para Adquirir  
Potenciales Evocados Visuales en Ratas”**

Que fue sometido para su posible publicación a la Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica ha sido **ACEPTADO** en la modalidad de **ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN** por el grupo editorial de la Revista.

El cual será publicado en el Volumen 39 - 1 de la Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica.

Una vez más, gracias por someter su manuscrito a la Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica.

Reciba un cordial saludo.

**Dra. Nelly Gordillo Castillo**  
Editora de la Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica  
[www.rmib.mx](http://www.rmib.mx)

La Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica está incluida en SCOPUS, SciELO, REDALyC, EBSCO, LATINDEX y en Sistema de Clasificación de Revistas Científicas y Tecnologías del CONACYT – Q4.

#### **7.1.4 Resumen**

La señal de la amplitud en análisis de Potenciales Evocados Visuales (PEVs) es una variable que depende del tipo de los electrodos, de la fuente luminosa, del estímulo visual y por consiguiente, de la intensidad luminosa por lo que es fundamental reportarla para cada diseño experimental y así, garantizar su reproducibilidad. El objetivo de este trabajo es caracterizar una lámpara con 96 LEDs para la adquisición de PEVs en ratas. Se midió la iluminancia y la intensidad luminosa promedio en un sistema espacial XYZ de 8 cm<sup>3</sup> aplicable a un sistema estereotáxico para la fijación de ratas. Se realizaron desplazamientos cada 2 cm en cada plano. Se observó que debido a la distribución geométrica de los LEDs la distribución de la iluminancia no sigue la ley del inverso cuadrado, ya que aumenta conforme la lámpara se aleja. Finalmente, se seleccionó una coordenada para la colocación del ojo de la rata empleando una intensidad luminosa promedio para la adquisición del PEV de 1.043 cd e iluminancia de 128.77 luxes a una distancia ojo-lámpara de 9 cm. Una vez caracterizada la intensidad luminosa y de acuerdo.

#### **7.1.5 Apartado del artículo**

##### **Introducción**

Los Potenciales Evocados Visuales (PEVs) son pruebas neurofisiológicas que se consideran no invasivas y tienen como objetivo medir la integridad de la vía visual. El estudio se lleva a cabo registrando electrográficamente la actividad combinada de potenciales post-sinápticos generados a nivel de la corteza estriada [1-3]. Los PEVs han sido usados en investigaciones para estudios farmacológicos y en la evaluación de efectos neuroprotectores, ya que proporcionan un medio para monitorear la actividad neural y el procesamiento sensorial in vivo. Los PEVs han sido adquiridos en diversos modelos animales [2]. Sin embargo, las ratas son la especie más utilizada en laboratorio para estudios de PEVs, debido a que son de fácil acceso y poseen un ciclo de crecimiento corto [4]. Los registros de PEVs han sido descritos en la literatura considerando parámetros como el tipo de electrodo y la fuente de estimulación [1-2,5-10]. Sin embargo, hay escasos reportes en los que se ha medido la intensidad luminosa suministrada para la adquisición del registro de PEVs. Esto es muy importante ya que

garantiza la reproducibilidad de los resultados de PEVs, independientemente del modelo experimental empleado. Actualmente se desconoce la caracterización espacial de la intensidad luminosa de una lámpara con un conjunto de múltiples LEDs, diseñada para estudios neurofisiológicos en seres humanos, la cual se empleará en la adquisición de PEVs en rata (marca EBNeuro-Italia). El propósito de esta investigación fue caracterizar espacialmente la intensidad luminosa promedio de la lámpara Flash LED (marca EBNeuro-Italia) para evaluar si es apta como fuente de estimulación visual para la adquisición de PEVs en un modelo murino. La metodología propuesta consiste en evaluar la distribución de iluminancia a partir de la medición de los luxes a cada 2 cm de distancia en un espacio XYZ de 8 cm<sup>3</sup> usando un marco estereotáxico para roedores. La intensidad luminosa promedio se calculó a la distancia más cercana y más lejana de la lámpara. Finalmente, a partir de los datos de iluminancia y de la intensidad luminosa promedio se obtuvo un PEV en rata.

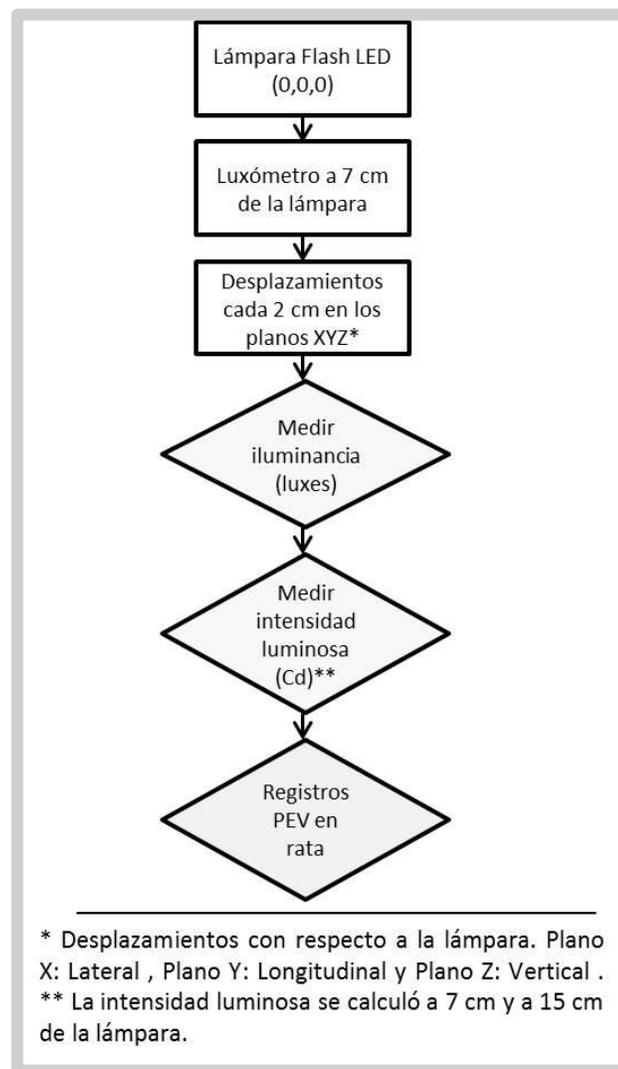
## **Metodología**

En primera instancia, fue necesario un medidor digital de luminancia (luxómetro HER-410, Japón), este instrumento cumple con el espectro de color estándar que establece la Comisión Internacional de Iluminancia (CIE). El luxómetro cuenta con un fotodiodo de silicio con filtro como sensor con dimensiones de 83x52x20.5 mm y con una precisión de respuesta de +/- (5% + 2d) [11].

El dispositivo empleado para estimulación visual fue la lámpara Flash LED stimulator (Modelo BE Plus, EBNeuro S.P.A, Italia) diseñada con propósitos médicos para la adquisición de PEVs acoplado a un sistema de registros electroencefalográficos (EEG). La lámpara es un estimulador fótico que genera flashes de duración corta de luz blanca por medio de 96 LEDs de estado sólido con una distribución rectangular y con dimensiones de 20.95x6.35x5.08 cm y un peso de 201.28 g. Los flashes se controlan desde el host de una PC típicamente sobre una tasa de repetición de entre 1 y 60 Hz. La lámpara emite un flujo luminoso estándar de 182.4 lúmenes. La duración de los flashes es de 5 ms (milisegundos). Sus interfaces son un cable macho TRIAD de 5 pines, una fuente de alimentación y la señal de control (disparador). La tasa de disparo de flashes es de 60 por segundo (control externo). Las respuestas a los

estímulos visuales se registraron mediante un sistema electrográfico (EBNeuro, Italia) y se amplificaron con una configuración de filtros pasa banda bajo y alto de 1 y 100 Hz, respectivamente (NEMUS 2 Amplificador, EBNeuro, Italia) [12]. Para el estudio se usó una tasa de disparo de flash de 100 Hz con una anchura de pulso de 20 ms.

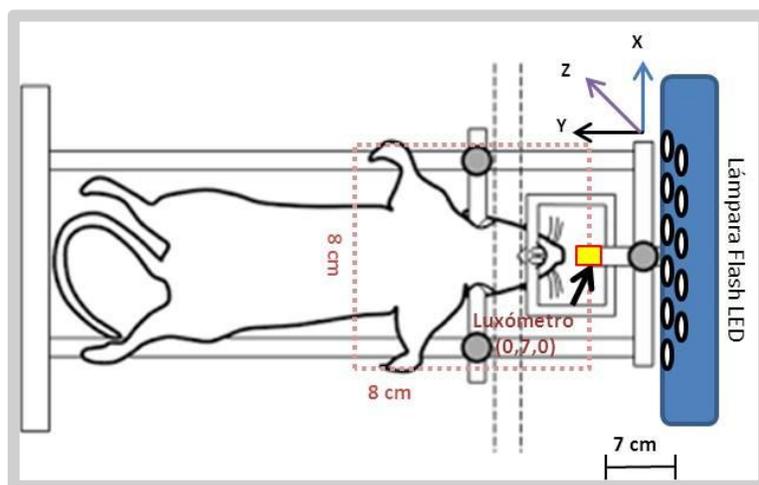
El espacio tridimensional fue definido por un marco estereotáxico normalmente empleado para cirugía de roedores guiada mediante coordenadas (Kopf, Estados Unidos). La metodología propuesta para realizar la caracterización de la lámpara se divide en tres etapas, como se muestra en la Figura 1a.



**Figura 1a.** Metodología propuesta.

La lámpara se colocó en la posición inicial o de origen (0,7,0) y a partir de este punto se realizaron los desplazamientos a cada 2 cm a lo largo de los planos XYZ, adquiriéndose 15 valores por cada posición. El luxómetro se fijó a la torre de estereotaxia a la altura del porta cánula de esta manera se garantizó el libre movimiento a través del espacio en estudio. La colección de datos se realizó bajo la luz natural del ambiente y se tomaron en cuenta los luxes iniciales para la corrección de la iluminancia por fondo.

El espacio definido del marco estereotáxico fue un cubo de 8 cm de longitud (ver Figura 1b).



**Figura 1b.** Distribución del espacio coordinado para evaluación de la intensidad promedio de la lámpara LED para su uso en un modelo en rata. Se muestra la coordenada inicial en la que se colocó el luxómetro (0,7,0) a partir de la cual se hicieron desplazamientos de 2 cm.

Se utilizaron gráficas de superficie para representar la distribución de la iluminancia en el plano XZ para cada valor del plano Y (rebanadas perpendiculares a la lámpara). La distribución de la intensidad luminosa promedio a una distancia Y de 7 cm y 15 cm de la lámpara se representaron en gráficas en XY con respecto a  $z = 4$  y  $z = -4$ .

### Adquisición del Potencial Visual Evocado en rata

De acuerdo con la intensidad luminosa promedio evaluada, se seleccionó la iluminancia de 128.7 luxes correspondiente a una intensidad luminosa promedio de 1.043 cd observada a 9 cm

de la lámpara en la coordenada (2, 9,-4) donde se colocó el ojo de la rata. Se seleccionó esta posición de la lámpara por tratarse de una posición fácilmente reproducible con base a referencias físicas del marco estereotáxico. Se adquirió un PEV a esta intensidad luminosa empleando ratas Wistar ( $n = 4$ ) con peso de 230-260 g. Los animales se mantuvieron en cajas esterilizadas con camas de aserrín a  $24 \pm 1$  °C de temperatura, 85% de humedad y ruido constante con periodos de luz/oscuridad de 12/12 h. La manipulación de los animales se realizó bajo las regulaciones especificadas por el Comité de Uso y Cuidado Animal del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez y también de acuerdo con las reglas y regulaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina: xilazina (80:10 mg/kg).

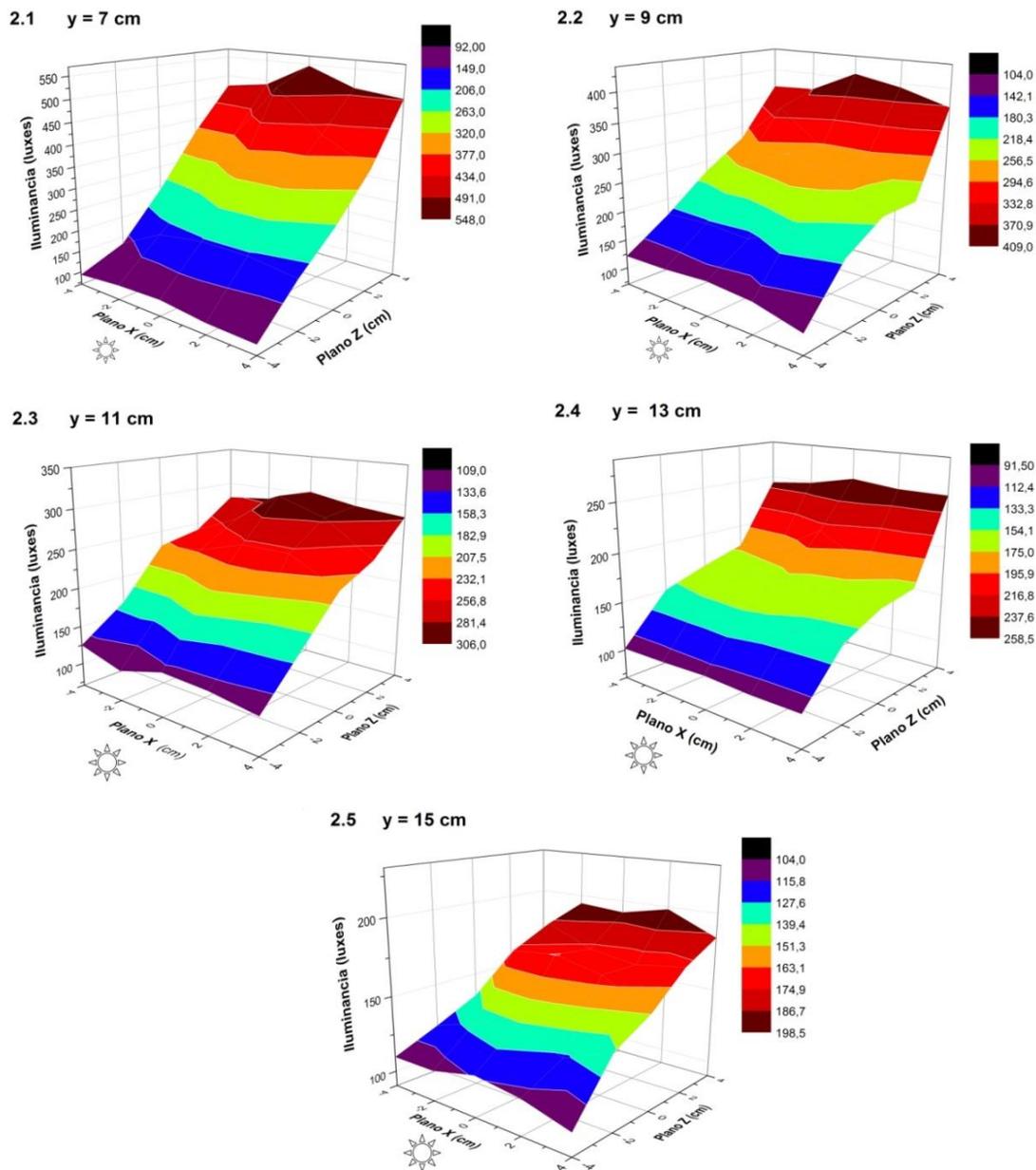
Mediante una intervención quirúrgica se implantó el electrodo de referencia y el electrodo activo. El electrodo de referencia fue colocado 5 mm atrás de bregma y el electrodo activo 7 mm delante de bregma y lateral a 3 mm de la línea media [2]. -El electrodo tierra se colocó en la oreja de la rata. Para garantizar una buena absorción de luz se colocó un midriático (T-P Ofteno, Sophia) en el ojo izquierdo de la rata y se adaptó a oscuridad por 5 min, posteriormente se adquirió el PEV. Se analizó la latencia y la amplitud de los componentes PEV: P1, N1, P2, N2 y P3.

## **Resultados**

### **Distribución de la iluminancia**

Se estudió la distribución de la iluminancia de la lámpara sobre el espacio del marco estereotáxico usado en ratas y se encontró cómo la iluminancia cambia con la posición vertical o plano Z del luxómetro (de arriba- a abajo). La iluminancia mínima ( $92.57 \pm 9.19$  luxes) y máxima ( $546.90 \pm 10.472$  luxes) se encontraron a una distancia Y entre la lámpara y el luxómetro de 7 cm en las coordenadas (4,7-4) y (0, 7,4), respectivamente. La coordenada (4,7,-4) representa el extremo derecho de la lámpara a una distancia de 7 cm del luxómetro en la posición inferior del espacio y la coordenada (0,7,4) es el centro de la lámpara en X a 7 cm

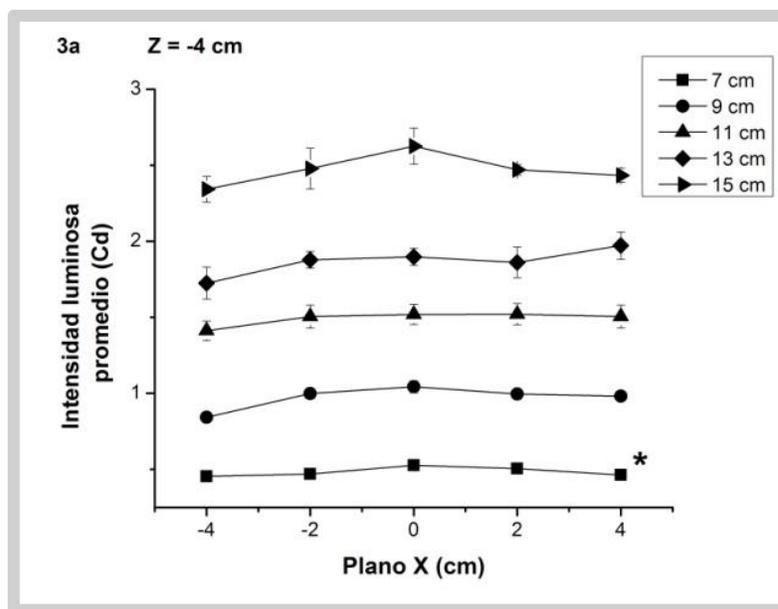
de distancia del luxómetro en la posición superior del espacio Z. La distribución de la iluminancia en el espacio XZ para cada valor de Y se muestran en las Figuras 2.1-2.5.

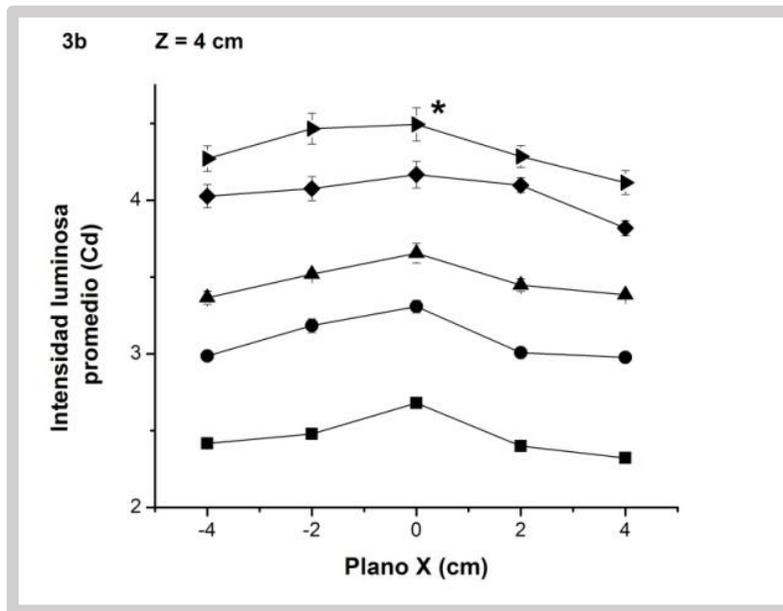


**Figura 2.** Distribución de la iluminancia de la Lámpara Flash LED: EBNeuro. Las imágenes 2.1 a 2.5 muestran gráficas de superficie de la distribución de iluminancia sobre el plano X a cada 2 cm desplazados sobre el eje Y. Considerando como punto de origen (0,7,0) de la lámpara. La iluminancia se cuantificó en unidades de luxes.

### Distribución de Intensidad Luminosa Promedio

La intensidad luminosa promedio se calculó en unidades de candelas (*cd*) y fue la resultante del producto de la iluminancia (luxes) y la distancia al cuadrado entre la lámpara y el luxómetro ( $m^2$ ). En la Figura 3 se muestra la distribución de la intensidad luminosa promedio en el plano X con respecto a los valores extremos (superior e inferior) de la coordenada Z ( $z = 4$  y  $z = -4$ , respectivamente). La intensidad luminosa promedio máxima y mínima fue de  $4.494 \pm 0.109$  *cd* y de  $0.455 \pm 0.012$  *cd* localizadas en las coordenadas (0,15,4) y (4,7,-4), respectivamente. La coordenada (0,15,4) representa el centro de la lámpara en el plano X a 15 *cm* de distancia de la lámpara en la parte superior del espacio y la coordenada (4,7,-4) representa el extremo derecho de la lámpara a 7 *cm* de distancia a la lámpara de la parte inferior del espacio estereotáxico. Por lo tanto, la mayor cantidad de luz se concentra en la parte central del marco estereotáxico y disminuye conforme se aproxima a los extremos. A partir del punto de origen, la intensidad luminosa promedio se incrementa conforme la lámpara se aleja; hallando el valor máximo de intensidad a 15 *cm* de la lámpara y la mínima a 7 *cm*. El comportamiento antes descrito se visualiza en la Figura 3.

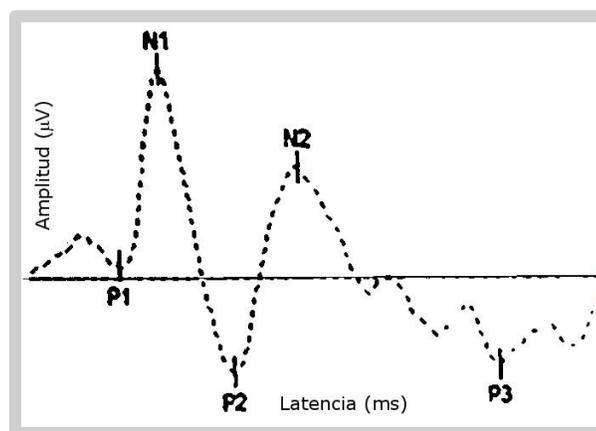




**Figura 3.** Perfiles de intensidad luminosa promedio en el plano X. 3a) Mínima ( $z = -4$ ) y 3b) Máxima ( $z = 4$ ). Los datos muestran el valor promedio  $\pm$  error estándar. \*Denota el perfil de intensidad luminosa promedio mínimo y máximo correspondiente.

### Potencial Visual Evocado en ratas

En la Figura 4 se muestra la traza de un PEV adquirido en rata y en la Tabla 1 se muestran los valores de latencia y amplitud de los componentes de PEV.



**Figura 4.** Representación de un Potencial Evocado Visual experimental en rata. Software: Galileo NT.

**Tabla 1.** Comparación de latencia y amplitud de PEV en ratas obtenidos con valores previamente publicados.

Componente	Latencia (ms)			Amplitud ( $\mu V$ )	
	Ortiz Z.	Ref. [2]		Ortiz Z.	Ref. [2]
<b>P1</b>	42.1 $\pm$ 2.8	24.09 $\pm$ 1.6	<b>P1-N1</b>	2.31	28
<b>N1</b>	72.3 $\pm$ 4.8	36.29 $\pm$ 1.6	<b>N1-P2</b>	7.8	36.09
<b>P2</b>	100.1 $\pm$ 5.8	56.21 $\pm$ 2.5	<b>P2-N2</b>	11.82	41.65
<b>N2</b>	131.3 $\pm$ 1.4	85.33 $\pm$ 6.3	<b>N2-P3</b>	5.99	66.23
<b>P3</b>	152.3 $\pm$ 7.2	163.29 $\pm$ 7.2			

*Los valores de latencia y amplitud se muestran como el valor promedio  $\pm$  desviación estándar.*

## Discusión de resultados

Dentro del procedimiento para la adquisición de PEVs es fundamental proporcionar un valor de la intensidad luminosa que posee el estímulo visual para lograr iniciar la cascada sináptica que inicia en la retina y finaliza en la corteza visual, de esta manera poder coleccionar una traza electrográfica que permita realizar la evaluación de la vía visual en estudio. En el presente trabajo fue posible conocer la intensidad de luz promedio suministrada por la lámpara EBNeuro con un arreglo de 96 LEDs para la adquisición del PEV en ratas a partir de variables fotométricas como la iluminancia y la intensidad luminosa promedio.

La distribución de intensidad luminosa promedio de la lámpara Flash LED a través del marco estereotáxico muestra un fenómeno óptico que va aparentemente en contra de la ley del inverso al cuadrado de la distancia para fuentes puntuales de la luz ( $I \propto 1/r^2$ ), ya que la lámpara Flash LED EBNeuro tiene un arreglo geométrico definido (rectangular) de LEDs que se comporta como una fuente extendida. En el intervalo de 7 cm a 15 cm de distancia lámpara-luxómetro no logra comportarse como una fuente puntual. Por esta razón, el valor máximo de la iluminancia se encuentra a 15 cm y no a 7 cm como debiera esperarse al existir menor distancia entre la lámpara y el medidor lumínico. A menor distancia de la lámpara hay una menor iluminancia ya que hay menor contribución de los 96 LEDs y viceversa a 15 cm. Si la cuantificación de iluminancia se realizara a distancias mayores de 15 cm seguramente la iluminancia aumentaría hasta lograr que la lámpara se considere una fuente puntual y así, la iluminancia sería proporcional al inverso del cuadrado de la distancia.

La latencia de los componentes tardíos (N2 y P3) de los PEV en ratas muestran una variabilidad que puede deberse a la forma de metabolizar la anestesia la cual es variable entre cada animal y ante el estímulo visual de luz blanca puede estimular el nivel de conciencia. Sin embargo, la desviación estándar observada es similar a los reportados en otros modelos experimentales en roedores previamente publicados [2]. En la Tabla 1 se muestra una comparación de valores obtenidos de latencia y amplitud con los reportados en la literatura. La forma del potencial registrado electrográficamente (Figura 4) y los valores de latencia para los diferentes picos son similares a los reportados por You *et. al.* [2]. Claramente se observan diferencias en la amplitud, las cuales pueden deberse a las diferencias del estímulo empleadas en la intensidad luminosa, ya que en éste trabajo se utilizó una intensidad luminosa promedio de 1.043 *cd* y You *et. al.* emplearon una intensidad de 3 *cd* observándose por ello, un claro incremento en la amplitud de la respuesta como es de esperarse. También pueden influir otras variables como el tipo y posicionamiento del electrodo usado, la fuente de estimulación, el tipo de anestesia o el diseño experimental.

Otro punto importante, es el medidor de luz utilizado en la presente investigación, el cual es un instrumento sencillo, de bajo costo y empleado principalmente para propósitos fotográficos, sin embargo, comprobamos que puede arrojar datos confiables. Para demostrarlo, se cuantificó la intensidad luminosa promedio a 15 *cm* con nuestro diseño experimental y se comparó con el valor reportado en la literatura [2] siendo de  $3,39 \pm 0,57$  *cd* y de 3 *cd*, respectivamente.

## **Conclusión**

Finalmente, con la metodología propuesta se logró la caracterización de las variables fotométricas como la iluminancia y la intensidad luminosa promedio de la lámpara Flash LED: EBNeuro dentro del espacio tridimensional del marco estereotáxico empleado para estudios en ratas bajo anestesia. La caracterización espacial de la intensidad luminosa promedio y la adquisición de PEVs en ratas mostraron que la lámpara puede ser usada como fuente de estimulación visual en un modelo murino para estudios de investigación.

## Agradecimientos

Se agradece a la SIEA-UAEMex por el apoyo recibido mediante el proyecto 4348/2017/CI. Así como al CONACYT a través del proyecto CB-2011-01-169558 y a la beca de doctorado otorgada a la alumna con número de CVU: 473019.

## Referencias

- [1] J. Charng, C.T. Nquyen, Z. He, T.M. Dang, A.J. Vingrys y R.L. Fish, **“Conscious wireless electroretinogram and visual evoked potentials in rats,”** Public Library of Science, vol. 8, pp. e74172, 2013. [DOI:10.1371/journal.pone.0074172](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074172). eCollection 2013.
- [2] Y. You, A. Klistorner, J. Thie y S.L. Graham, **“Improving reproducibility of VEP recording in rats: electrodes, stimulus source and peak analysis,”** Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology, vol. 123, pp. 109-119, 2011. [DOI: 10.1007/s10633-011-9288-8](https://doi.org/10.1007/s10633-011-9288-8). Epub 2011 Sep 10.
- [3] O. Creutzfeldt, K. Maekawa y L. Hosli, **“Forms of spontaneous and evoked postsynaptic potential of cortical nerve cells,”** Progress in brain research, vol. 31, pp.X 265-273, 1969. [DOI: 10.1016/S0079-6123\(08\)63245-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)63245-8)
- [4] Y. You, J. Thie, A. Klistorner A, V.K. Gupta y S.L. Graham, **“Normalization of visual evoked potentials using underlying electroencephalogram levels improves amplitude reproducibility in rats,”** Investigative ophthalmology & visual science, vol. 53, pp. 1473-1478, 2012. [DOI: 10.1167/iovs.11-8797](https://doi.org/10.1167/iovs.11-8797).
- [5] C.T. Nguyen, T.I. Tsai, Z. He, A.J. Vingrys, P. Lee y B.V. Bui, **“Simultaneous recordings of electroretinography and visual evoked potentials in anesthetized rats,”** Journal of visualized experiments: JoVE, pp. e54158, 2016. [DOI: 10.3791/54158](https://doi.org/10.3791/54158).
- [6] A. Sarkadi y Z. Inczefly, **“Simultaneous quantitative evaluation of visual evoked responses and background EEG activity in rat: normative data,”** Journal of pharmacological and toxicological methods, vol. 35, pp. 145-151, 1996.

- [7] A.Y. Göçmen, A. Celikbilek, G. Hacıoğlu, N. Tanık, A. Ağar y P. Yargıçoğlu, **“The relationship between oxidative stress markerkers and visual evoked potentials in different hypertension models,”** Anadolu kardiyoloji dergisi, vol. 14, pp. 498-504, 2014. DOI: [10.5152/akd.2014.4923](https://doi.org/10.5152/akd.2014.4923).
- [8] H.Q. Yan, M.L. Mazow y N. Dafny, **“Monocular visual deprivation at the critical period modulates photic evoked responses,”** Brain research bulletin, vol. 36, pp. 545-548, 1995.
- [9] Y. Iwamura, Y. Fujii y C. Kamei, **“The effects of certain H1-antagonists on visual evoked potential in rats,”** Brain research bulletin, vol. 61, pp. 393-398, 2003.
- [10] J.R. Haynes, **“Radiaton resulting from the recombination of holes and electrons in silicon,”** Physical review, vol. 101, pp. 1676-1678, 1956.
- [11] Descripción del medidor digital de luminosidad (luxómetro) HER-410. Disponible en: <http://www.steren.com.mx/medidor-digital-de-luminosidad-luxometro.html>
- [12] Descripción de la lámpara Flash EBNeuro. Disponible en: [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf10/K101691.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf10/K101691.pdf)

## 7.2. Artículo enviado

**Zareth Ortiz Arzate, Paola Ballesteros Zebadúa, Javier Franco Pérez, Joaquín Manjarrez Marmolejo, Francisco Láez Rincón, Miguel Camacho López “Effects of the whole brain irradiation the visual evoked potentials and brain activity in a rat model” **Neurological Sciences.****

### 7.2.1 Título del artículo enviado

Effects of the whole brain irradiation the visual evoked potentials and brain activity in a rat model.

### 7.2.2 Carta de envío del artículo

From: **Neurological Sciences (NEUS)** <[em@editorialmanager.com](mailto:em@editorialmanager.com)>  
Date: 2018-03-21 0:11 GMT-06:00  
Subject: NEUS-D-18-00278 - Submission Confirmation  
To: PAOLA BALLESTEROS-ZEBADUA <[paolabaze@gmail.com](mailto:paolabaze@gmail.com)>

Dear Mrs. BALLESTEROS-ZEBADUA,

Thank you for submitting your manuscript, Effects of whole brain irradiation on the visual evoked potentials and brain activity in a rat model, to Neurological Sciences.

The submission id is: NEUS-D-18-00278

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal web site:

Your username is: paolabz

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://neus.editorialmanager.com/>

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

With kind regards,  
Springer Journal's Editorial Office

Neurological Sciences

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on [www.springer.com/openchoice](http://www.springer.com/openchoice)). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to [www.springer.com/oafunding](http://www.springer.com/oafunding).

Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

### 7.2.3 Resumen

La radiación holocraneal (Whole Brain Irradiation, WBI por sus siglas en inglés) ha sido asociada con el síndrome de somnolencia por radiación, desmielinización, neuroinflamación y efectos cognitivos a largo plazo. Registros de Potenciales Evocados Visuales (VEP) y Electroencefalográficos (EEG) son indicadores neurofisiológicos de la integridad visual y de la actividad cerebral, respectivamente. En el presente estudio, nosotros empleamos un modelo en rata para evaluar efectos a largo plazo de la WBI sobre parámetros neurofisiológicos tales como VEP y EEG. Ratas Wistar recibieron WBI con una dosis de 20 Gy al isocentro. Después de cuatro semanas, los animales fueron anestesiados, implantando electrodos en la corteza visual y fueron adquiridos registros VEP y EEG. Analizamos los VEO y encontramos que las latencias de los componentes tardíos (P2, N2 y P3) incrementaron tras radiación; sin embargo, las amplitudes no mostraron diferencias significativas. Por otra parte, el poder de los ritmos alfa, teta y gama fueron reducidos tras WBI. Considerando que ambas oscilaciones VEP y EEG juegan un rol esencial en múltiples funciones cognitivas, proponemos que el déficit de cada parámetro neurofisiológico puede estar relacionado a la descripción de los efectos tardíos cognitivos inducidos por la radiación ionizante.

#### **Abstract**

Whole-brain irradiation (WBI) has been associated with radiation somnolence syndrome, demyelination, neuroinflammation and long-term cognitive effects. Visual evoked potentials (VEP) and Electroencephalographic (EEG) recordings are neurophysiological indicators of visual function and brain activity, respectively. In the present study, we employed a rat model to evaluate the long-term effects of WBI on neurophysiological parameters such as VEP and EEG. Wistar rats received WBI with a dose of 20 Gy at isocenter. After four weeks, animals were anesthetized, implanted with electrodes in the right visual cortex and VEP and EEG recordings were acquired. We analyzed the VEP and found that the latencies of the late components (P2, N2, and P3) increased after irradiation; however, the amplitudes showed no significant differences. On the other hand, the power of alpha, theta and gamma rhythms was reduced after WBI. Considering that both VEP and EEG oscillations play an essential role in multiple cognitive functions, we propose that deficits in such neurophysiological parameters could be related to the described long-term cognitive effects induced by ionizing radiation.

## 7.2.4 Apartados del artículo

### Introduction

Whole-brain irradiation (WBI) is widely used as a prophylactic and curative treatment of brain neoplastic and metastatic diseases [1-2]. The use of ionizing radiation has been limited due to the secondary effects that it may trigger. Cell death is the most described effect. However, WBI can also cause radiation somnolence syndrome, demyelination, neuroinflammation and long term cognitive effects [1-2]. Studies have reported long-term alterations in infants with lymphoblastic leukemia (LLA) treated with 18 and 24 Gy of prophylactic WBI. The psychological tests showed deficits suggesting a lowered speed of cognitive processing, impaired memory as well as reduced attention [1-2].

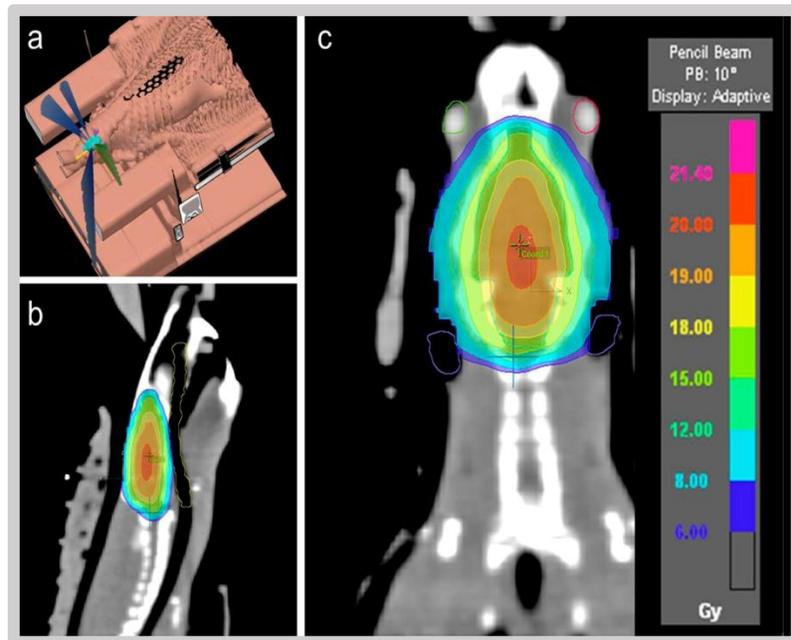
VEP are generated at the visual cortex and are used to analyse the function and integrity of the visual pathway [3]. Early components of VEP (P1-N1) reflect the integrity of the optic nerve, whereas the latter components reflect processing by higher cortical centres (P2 onwards) [3-4]. EEG is a complex signal often employed as brain state indicator. For this reason, VEP and EEG have been used in both human and animals as instruments to evaluate the brain state in sleep studies [5], anesthesia, coma [4,6], learning, memory, attention [7-8] and other processes. Therefore, in the present research, we employed a rat model to evaluate the long-term effects of WBI on neurophysiological parameters such as VEP and EEG.

### Methods

We used seventeen male Wistar rats with a body weight 240-260 g, housed at  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  with a 12 hours light/dark cycle. The handling of all rats was according to institutional guidelines to comply with national regulations and international guiding principles (CIOMS). Methods have been approved by a research ethics committee. Rats were allowed to move freely in transparent cages with *ad libitum* access to food and water.

WBI was performed using a micro-multileaf collimator coupled to a linear accelerator for head treatments (True Beam STx, 6 MV) with a dose of 20 Gy at isocenter. Dynamic arcs

technique was employed, and surrounding structures such as eyes, auditory canal, and oropharyngeal mucosa were protected. For the conformal treatment planning, we used tomographic images and the software iPlan (BrinLab, Germany) (Fig. 1a-c). The animals were evaluated four weeks after WBI. At the recording day, the rats were anesthetized with ketamine/xilazine, and electrodes were implanted in the right visual cortex. VEP were recorded under anesthesia. The applied luminous intensity was previously measured and reported [9].



**Figure 1.** a) 3D reconstruction of the computed tomography scan of the rat and planning simulation showing the position of the radiation beams. b,c) Sagittal and coronal sections of the tomography of the rat showing the coverage of the isodoses curves.

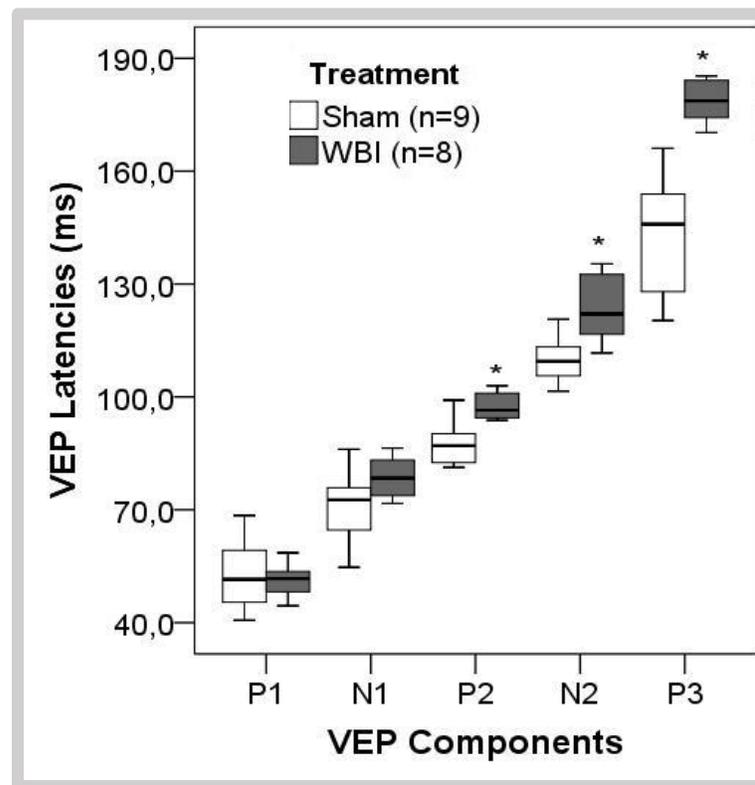
VEP latencies (ms) of P1, N1, P2, N2, and P3, as well as the amplitude ( $\mu\text{V}$ ), were measured and analyzed. After the acquisition of VEP, we acquired 3 min of EEG recordings conserving the position of the electrodes. EEG was recorded by an electrographic system (Galileo NT, EBNeuro S.P.S, Italy) and amplified (EEG/ECG Amplifier BE light, EBNeuro S.P.S, Italy). Afterwards, we selected epochs (2 seconds) prioritizing those with the lowest possible noise to

measure the power spectra of the frequency bands using Fast Fourier Transform. Power spectral values were normalized with respect to the control sham group.

The latencies of VEP components as well as the power spectra of the frequency bands after WBI were compared with the sham group using a non-parametric Mann-Whitney U test for independent samples (SPSS statistics v.21 software). P –values less than or equal to 0.05 were considered statistically significant.

## Results

The effect of WBI on the VEP latencies compared to controls (sham group) are summarized in Fig. 2. The latency of all components was increased after irradiation. Although, there were significant differences only for the P2, N2, and P3 (late components). However, there were not significant differences between the amplitudes (data not shown).



**Figure 2.** VEP latencies represented in milliseconds (ms). \* Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between sham and post-irradiated animals.

Table 1 shows the classification of the frequency bands and the comparison between the control group and the WBI group. Overall, we notice that power of the EEG is smaller after WBI. Also, we found that delta rhythm due to anesthesia is predominant in both sham and WBI groups. However, theta, alpha, and gamma bands decreased significantly with respect to the control group.

<b>Table 1</b> EEG power %. Results are expressed in power % of control (mean $\pm$ SE)		
<b>Brain rhythm</b>	<b>Sham</b>	<b>WBI 20 Gy</b>
<b>Delta</b> (3-4 Hz)	100.0 $\pm$ 17.07	66.16 $\pm$ 6.28
<b>Tetha</b> (4-8 Hz)	100.0 $\pm$ 22.37	43.39 $\pm$ 5.81*
<b>Alpha</b> (8-12 Hz)	100.0 $\pm$ 17.89	43.40 $\pm$ 2.93*
<b>Beta</b> (12-19 Hz)	100.0 $\pm$ 22.48	47.79 $\pm$ 6.61
<b>Low Gamma</b> (19-50 Hz)	100.0 $\pm$ 19.27	36.72 $\pm$ 5.46*

\* Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between sham and post-irradiated animals. ES is the standard error.

## Discussion

Our results are consistent with previous reports where children that received WBI with different doses exhibited increased VEP latencies [1-2]. Here we report that WBI increased the latency from the late components of the VEP; interestingly, these effects could be associated with deleterious cognitive effects induced by ionizing radiation since it has been proposed that the late VEP components (P2, N2, and P3) may be related to cognitive visual processing. Likewise, our data demonstrated for the first time that ionizing radiation modifies neural activity in the visual cortex observed in a decrease in the power of some frequency bands. This effect is remarkable because the EEG is an indicator of the brain condition and could give us an idea about the state of the synaptic plasticity and neuronal cortical interconnections.

Although all the frequency bands displayed a decreasing tendency, the delta band showed no substantial change probably because is the rhythm predominant under effects of anaesthesia. It has been described that alpha oscillation is significant in visual areas. For example, in primates after analyzing the regional substrates, it was found that alpha generation was located in layers 3, 4, and 5 of the macaque visual cortex [8]. Evidence from biological data and computational

models indicates that alpha band could have a critical role in the regulation of gamma oscillations [7-8,10]. Data presented here show that WBI significantly decreased the power of alpha and gamma bands. Considering that both oscillations play an essential role in multiple cognitive functions [7-8,10], we propose that deficits in alpha and gamma power could be related to the well described long-term cognitive effects induced by ionizing radiation.

We should remark that visual pathway was not damaged by radiation since no statistically significant changes were observed in the early VEP components (P1 and N1). Our irradiation plan used a 20 Gy dose at isocenter, but the left eye only received a maximum dose of 3.42 Gy and right eye 3.55 Gy. Consequently, we confirmed that eyes protection was optimal during the irradiation procedure.

## **Conclusions**

Finally, since the presented data are consistent with previous reports in humans, we propose that our model is suitable to explore and elucidate the underlying mechanisms of the long-term effects produced by ionizing radiation.

## **Acknowledgements**

The present work was funded by the National Council of Science and Technology (CONACYT) through the grant CB- 2014-258296 and the doctorate scholarship to the student with CVU number: 473019.

## **References**

[1] Meshref M, ElShazly N, Nasr M, Abdelhai R (2013) Effect of different doses of prophylactic cranial irradiation in childhood lymphoblastic leukemia on CNS relapse, late cognitive decline and learning disabilities. *J Cancer Ther Res* 2:10. <http://dx.doi.org/10.7243/2049-7962-2-10>

- [2] Halberg FE, Kramer JH, Moore IM, Wara WM, Matthay KK, Ablin AR (1992) Prophylactic cranial irradiation dose effects on late cognitive function in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22:13-16. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(92\)90976-O](https://doi.org/10.1016/0360-3016(92)90976-O)
- [3] You Y, Klistorner A, Thie J, Graham SL (2011) Improving reproducibility of VEP recording in rats: electrodes, stimulus source, and peak analysis. *Doc Ophthalmol* 123:109-119. <https://doi.org/10.1007/s10633-011-9288-8>
- [4] Charng J, Nguyen CT, He Z, Dang TM, Vingrys AJ, Fish RL, Gurrell R, Brain P, Bui BV (2013) Conscious wireless electroretinogram and visual evoked potentials in rats. *PLoS ONE*. 8:e74172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074172>
- [5] Achermann P (2009) EEG analysis applied to sleep. *Epileptologie*. 26:28-33. <https://doi.org/10.5167/uzh-19935>
- [6] Brown EN, Lydic R, Schiff ND (2010) General anesthesia, sleep, and coma. *N Engl J Med* 363:2638-2650. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0808281>
- [7] Klimesch W (1997) EEG-alpha rhythms and memory process. *Int J Psychophysiol* 26:319-340. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8760\(97\)00773-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8760(97)00773-3)
- [8] Sigala R, Haufe S, Roy D, Dinse HR, Ritter P (2014) The role of alpha-rhythm states in perceptual learning: insights from experiments and computational models. *Front Comput Neurosci* 8:36. <https://doi.org/10.3389/fncom.2014.00036>
- [9] Ortiz-Arzate Z, Camacho-Lopez MA, Ballesteros-Zebadúa P, Franco-Pérez J, Treviño-Palacios C, Oros-Pantoja R (2018) Characterization of the flash led lamp: EBNeuro used to acquire visual evoked potentials in rats. *RMIB* 39:21-28. <https://doi.org/10.17488/RMIB.39.1.2>
- [10] Markand ON (1990) Alpha rhythms. *J Clin Neurophysiol* 7:163-189.

## 8. RESULTADOS ADICIONALES

---

Capítulo enviado para su publicación en el libro “Temas selectos de biomedicina en Ciencias de la Salud: Volumen II”.

### **Evaluación de la reproducibilidad de un método para la administración de indometacina en un modelo murino: Un caso práctico**

Zareth Ortiz-Arzate<sup>1</sup>, Paola Ballesteros-Zebadúa<sup>2</sup>, Javier Franco-Pérez<sup>2</sup>, Rigoberto Oros-Pantoja<sup>4</sup> y Miguel Ángel Camacho-López<sup>5</sup>

- 1 Egresada del Doctorado en Ciencias de la Salud. Maestra en Ciencias con especialidad en Física Médica. Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de México. iD-ORCID: 0000-0001-5432-5327.
- 2 Doctora en Ciencias Biomédicas. Departamento de Física Médica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Ciudad de México, México. ID-ORCID: 0000-0003-1263-2163
- 3 Doctor en Ciencias Biológicas. Departamento de Formación Reticular, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Ciudad de México, México. ID-ORCID 0000-0001-9670-8502.
- 4 Doctor en Investigaciones de Medicina. Departamento de neuroinmunoloendocrinología, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México. ID-ORCID: 0000-0001-5441-0863.
- 5 Doctor en Ciencias. Laboratorio de Fotomedicina, Biofotónica y Espectroscopia Láser de Pulsos Ultracortos, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México. ID-ORCID: 0000-0002-3093-3560.

## RESÚMEN

El objetivo de este estudio fue establecer un método para la administración de un tratamiento anti-inflamatorio no esteroideo con indometacina en ratas para investigación relacionada con sus efectos en el sistema nervioso central. Analizamos la literatura científica reportada del año 2003 al 2016 sobre el uso de la indometacina en modelos cerebrales en roedores y consideramos variables como el vehículo, la vía de administración, así como la dosis y tiempo de administración con fines terapéuticos. Once métodos fueron examinados de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas de la indometacina y se seleccionaron dos como referencia para la formulación de nuestro propio método de administración. Así, realizamos una evaluación *in vivo* usando ratas machos Wistar (n= 9) de 220 a 260 g y se valoró la apariencia, comportamiento y mortalidad de los animales. El esquema terapéutico con el anti-inflamatorio consistió en realizar una solución stock de 10 mg de indometacina en 1 ml de alcohol absoluto, para posteriormente llevar a cabo una dilución de 1:30 con leche entera. El esquema de administración fue por vía oral aplicando 1.25 mg de indometacina por kilogramo de peso cada 12 horas durante 3 días. En conclusión, establecimos un método alternativo a los reportados en el cual la administración de indometacina en ratas es segura y reproducible y que podría ayudar a lograr un beneficio terapéutico de este anti-inflamatorio en modelos experimentales.

**Key Words:** Indometacina, ratas, reproducibilidad

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

La indometacina (INDO) es un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (NSAID, por sus siglas en inglés) que ha sido ampliamente utilizado como tratamiento coadyuvante en osteoartritis, artritis reumatoide y espondilitis alquilosante<sup>1</sup>. Experimentalmente también se ha descrito su uso en la neuroinflamación debido a que la INDO es un compuesto capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BH). Además, en presencia de inflamación aguda se vuelve altamente permeable e incluso la INDO tiene la capacidad de revertir el incremento en la permeabilidad de la BH inducida por lipopolisacáridos (LPS)<sup>2-3</sup>, esta característica la hace apta para su uso a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC). La INDO tiene la habilidad de inhibir la biosíntesis de las prostaglandinas (PG) a través de la metabolización del ácido araquidónico vía cicloxigenasa (COX)<sup>4-6</sup>. La supresión de la síntesis de PG en sitios de inflamación es una de las propiedades benéficas que ofrecen los NSAIDs. La COX es una enzima considerada como limitante para la producción de PG y se encuentra en dos isoformas, la constitutiva o COX-1 es expresada en muchos tejidos incluso en el cerebro bajo condiciones normales y la isoforma inductiva o COX-2 la cual no se encuentra expresada en condiciones normales pero su expresión se incrementa en la presencia de algún estímulo inflamatorio incluyendo LPS, especies reactivas de oxígeno, así como algunas citocinas y factores de crecimiento. Experimentalmente, en modelos murinos la neuroinflamación puede ser ocasionada por ejemplo a través de LPS<sup>7</sup> o por radiación ionizante<sup>8-13</sup>. Adicionalmente, ciertas condiciones patofisiológicas cerebrales incluyendo la isquemia<sup>14</sup>, hipoxia, epilepsia<sup>15</sup>, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer<sup>16</sup> y Parkinson<sup>17</sup>, así como en infecciones cerebrales y traumatismos<sup>18</sup> están asociadas con la sobreexpresión de COX-2 en diferentes regiones del cerebro. Se ha observado que en el cerebro de los animales adultos solo una subpoblación de neuronas normalmente expresa COX-2; por el contrario, otras células como la microglia, astrocitos y células vasculares no expresan niveles significativos de COX-2 en condiciones normales. La inflamación cerebral se caracteriza por la activación de células gliales (microglia y astrocitos), acompañada con la expresión de citocinas como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ )<sup>12</sup>.

La radiación ionizante es comúnmente empleada para el tratamiento de distintos tipos de cáncer de cabeza y cuello además de otros desórdenes del SNC. No obstante, la exposición del cerebro a la radiación ionizante desencadena procesos de neuroinflamación aguda y tardía (persistente), la cual puede deberse a la sobreproducción de PG. Asimismo, se ha propuesto que COX-2 puede tener un papel determinante en el daño inducido por radiación ionizante, sin embargo, es un tema que busca explorarse a profundidad en nuestro grupo de investigación.

La INDO es una alternativa como anti-inflamatorio en la investigación del SNC pero también es altamente tóxica ya que tiende a causar daños gastrointestinales (GI) como ulceraciones gástricas, sangrados gástricos, lesiones agudas y crónicas de la mucosa intestinal<sup>4</sup>, ésta es la principal limitante para su uso en tratamientos largos.

En la presente investigación se realizó una búsqueda exhaustiva de las formas de administración de la INDO. La bibliografía fue usada como referencia para proponer un método de administración seguro y reproducible considerando la capacidad de solubilidad del vehículo, la vía de administración y la dosis. Al tratarse de un compuesto químico potente para inhibir la producción de PG, pero tóxico para el sistema GI, es de vital importancia lograr establecer el método apropiado para evitar la mayor mortalidad y el menor sufrimiento de los animales.

## **METODOLOGÍA**

Se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva para recabar la mayor cantidad de literatura enfocada en la administración de INDO y sus efectos en procesos cerebrales de distintos modelos experimentales murinos. La literatura colectada fue de 2003-2016 de la cual se seleccionaron los métodos empleados para administrar INDO a tiempos largos<sup>8, 19</sup>. Se realizaron pruebas de solubilidad *in vitro* de acuerdo a la información plasmada en los diferentes artículos científicos (Tabla I, métodos 1 al 12). Los métodos 2 (n=3) y 5 (n=3) (Tabla II) se realizaron *in vivo*, la INDO (Sigma Aldrich, USA) se administró en ratas machos de la cepa Wistar de 220 a 260 g de peso. Para el método 2 se administraron 2.5 mg/Kg de INDO cada 12 horas por 4 días usando como vehículo leche y vía de administración oral; el método 5 por vía intraperitoneal 10 mg/kg de INDO por 3 días usando como vehículo 0.3 M

Tris-HCl y pH = 8.2. Con base a la información recabada nuestro grupo de trabajo propuso un método alternativo para solubilizar la INDO y un esquema de administración para evaluarlo *in vivo* (método 12, n=3), partiendo de una solución stock de 1 mL de etanol absoluto y 10 mg de INDO llevándola a una dilución de 1:30 con leche entera (Santa Clara, Coca-Cola México) y una dosis de administración de 1.25 mg/ Kg de peso cada 12 horas durante 3 días por vía oral (Método 3, Tabla II). El método propuesto se creó con base en los vehículos reportados por algunos autores<sup>7, 8, 15,19-25</sup> (Tabla I). La administración oral se realizó con la ayuda de una cánula de metal. Los animales con tratamiento de INDO se mantuvieron bajo observación cada doce horas y se valoró cualitativamente su movimiento, comportamiento, ingesta de alimento y agua, apariencia física y mortalidad. Los animales del método 12 fueron sacrificadas mediante un exceso de pentobarbital y para todos los animales en estudio se recurrió a una disección y valoración visual del sistema GI (esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y colon).

Los animales se mantuvieron en cajas esterilizadas con camas de aserrín a  $22 \pm 2$  °C de temperatura, 60% de humedad y ruido constante con periodos de luz/oscuridad de 12/12 h. La manipulación de los animales se realizó bajo las regulaciones especificadas por el Comité de Uso y Cuidado Animal del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y también de acuerdo con las reglas y regulaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

## **RESULTADOS**

En la literatura encontramos 11 métodos para la administración de INDO. De esos métodos, 8 no llegaron a ser administrados en rata debido a que las pruebas iniciales de solubilidad mostraron poca o nula solubilidad de la INDO en los vehículos propuestos. En los 3 métodos restantes la INDO mostró una solubilidad óptima que permitió ser administrada con confiabilidad.

En la Tabla I se muestran los métodos empleados para la preparación y administración de la INDO así como su solubilidad, los modelos experimentales de aplicación *in vivo* se reportan

en la Tabla II. Los vehículos reportados por los métodos 2 y 5<sup>8,19</sup> originaron daños en el sistema gástrico causando ulceraciones y sangrados a nivel del estómago, duodeno, intestinos (grueso y delgado) y colon (Figuras 1 y 2) provocando cambios en su ingesta de agua y alimento, problemas para caminar, lordosis y pérdida de peso, con estos métodos el índice de mortalidad fue 3/3. El método propuesto (método 12) resultó ser una técnica reproducible y segura debido a que no se encontró daño alguno en el sistema GI (Figura 3) ni se presentó algún caso de mortalidad. La apariencia del sistema GI con tratamiento de INDO es similar al que presenta un animal control (Figura 4) y no se encontraron cambios contundentes en la apariencia, comportamiento o pérdida peso.

## DISCUSIÓN

Las ratas son la especie más utilizada en laboratorio para estudios experimentales, evaluación de patologías y estudios farmacológicos, debido a que son de fácil acceso y poseen un ciclo de crecimiento corto<sup>26</sup>, sin embargo, su uso requiere de la implementación de métodos farmacológicos seguros cuyos efectos no interfieran con el desarrollo y objetivos del experimento.

Nuestro análisis demostró que una de las principales limitantes es la solubilidad de la INDO en los diferentes vehículos. Al realizar las pruebas de solubilidad de acuerdo a las indicaciones reportadas en dichos métodos, obtuvimos suspensiones heterogéneas con sobrenadantes visibles. Estas suspensiones no pueden considerarse viables para administrarse por vía intraperitoneal ya que la jeringa puede taparse con los precipitados de la suspensión, además se incrementa el riesgo de lastimar al animal. Adicionalmente la falta de homogeneidad en la preparación de las soluciones disminuye la precisión en la dosis real administrada por cualquier vía.

El método 2 (Tabla I) pese a mostrar baja solubilidad de la INDO fue probado *in vivo* (Tabla II) ya que se ha reportado en el uso de INDO a tiempos largos para el tratamiento de los efectos en el SNC debido a la radiación ionizante, lo cual resultaba *ad hoc* a nuestros propósitos futuros. El vehículo empleado en el método 2 fue bicarbonato de sodio al 5% y

leche saborizada de fresa. Sin embargo, este método tiene desventajas ya que la INDO forma una suspensión imposible de administrar sistémicamente y, asimismo la leche saborizada contiene colorantes y edulcorantes como la sucralosa la cual se ha reportado que tiene efectos metabólicos en los modelos murinos<sup>27</sup>.

Como se ha mencionado la INDO es un fármaco NSAID que inhibe la biosíntesis de PG mediante la inhibición de las isoformas COX-1 y COX-2. Sin embargo, la INDO es un fármaco anti-inflamatorio difícil de administrarse en tratamientos largos por su toxicidad ya que provoca daños en el sistema GI. En algunos trabajos incluso se ha observado que la INDO provoca inflamación aguda o crónica, ulceraciones, perforaciones, sangrados y estenosis diafragmática<sup>18</sup> debido a que la secreción de la mucosa gástrica, la permeabilidad y la microcirculación es dependiente de la producción de PG y directamente de la enzima COX-1. La dosis de administración de 2.5 mg/kg cada 12 horas durante 2 meses (método 2) no pudo ser reproducida en nuestro modelo ya que se observó un 100 % de mortalidad, similares resultados se obtuvieron al tratar de reproducir el método 5 (Tabla II). Siguiendo las indicaciones del método 8 (Tabla I) obtuvimos una mezcla homogénea, sin embargo, la limitante fue el pH ácido de la solución. Por esta razón no la analizamos *in vivo* porque probablemente ocasionaría mayores daños gástricos. La solución obtenida empleando el método 9 (Tabla I) parecería ideal para administrarse a tiempos largos ya que la INDO fue completamente soluble. No obstante, nosotros no lo aplicamos a nuestro modelo por que el fármaco se administra vía oral *ad libitum* y como consecuencia no se tiene un control preciso de la dosis ingerida y posiblemente la estabilidad de la INDO se vea comprometida.

De acuerdo con nuestro análisis, proponemos que es imperante considerar la naturaleza del vehículo, así como la dosis de administración ya que como se muestra en las Figuras 1 y 2, la INDO produce evidentes daños al sistema GI. Estudios experimentales con ratas Sprague-Dawley reportaron que una sola administración de 7.5 mg de INDO/kg/día produce una lesión e inflamación aguda que prevalece por un máximo de tres días y se resuelve en una semana. De igual forma, la administración de 7.5 mg de INDO cada 12 horas produce una inflamación crónica que puede durar dos semanas y que puede revertirse solo con el uso de antiácidos como sulfasalazina, metronidazol, lanzoprazol (100 mg/kg/día)<sup>18, 28-29</sup>.

La investigación de *Yamada* fue una referencia clave para proponer nuestro propio método, ya que partimos de evitar la dosis subletal de INDO (los modelos de enteropatía usan una dosis subletal de 7.5 mg/kg) y del tiempo de vida media biológica de la INDO (3 a 10 horas<sup>30</sup>) y así establecimos la dosis de 1.25 mg/kg/12 horas/3 días. El vehículo de la solución madre se neutralizó con leche entera (marca Santa Clara, Coca-Cola México) a una dilución de 1:30 consiguiendo un pH de 6.8.

La problemática observada en la administración obedece a que la INDO es insoluble en solventes típicos como el agua destilada, solución salina, agua desionizada y muy soluble en solventes orgánicos como el dimetilsulfóxido (DMSO). Sin embargo, el uso de DMSO en modelos cerebrales es muy cuestionable ya que puede modificar el ciclo circadiano de las ratas<sup>31</sup>.

## **CONCLUSION**

La INDO es capaz de actuar en el sistema nervioso central como un potente anti-inflamatorio desafortunadamente es bastante agresivo con el sistema GI. Por consiguiente, es de vital importancia analizar y considerar las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas de la INDO para poder elegir el método más reproducible y seguro al que se someterán los animales de experimentación. Para fines de investigaciones futuras, el esquema propuesto de administración de INDO será de gran ayuda para elucidar hallazgos importantes relacionados con la neuro-inflamación asociada a la irradiación cerebral.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen al CONACyT por el financiamiento a través del proyecto CB-2014-258296 y a la beca de doctorado otorgada a la alumna con número de CVU:473019. Agradezco al MVZ Daniel Enrique Hernández Saucedo y al M. en C. César Augusto Rodríguez Balderas por su apoyo en el suministro y la disección de animales.

## REFERENCIAS

1. Polat B, Suleyman H, Alp HH. Adaptation of rat gastric tissue against indomethacin toxicity. *Chem Biol Interact* 2010;186:82-9.
2. de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD, Kuiper J. Effect of endotoxin on permeability of bovine cerebral endothelial cell layers in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277:1418-23.
3. Minami T, Okazaki J, Kawabata A, Kawaki H, Okazaki Y, Tohno Y. Roles of nitric oxide and prostaglandins in the increased permeability of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide. *Environ Toxicol Pharmacol* 1998;5:35-41.
4. Ajmone-Cat MA, Bernardo A, Greco A, Minghetti L. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Brain Inflammation: Effects on Microglial Functions. *Pharmaceuticals (Basel)* 2010;3:1949-1965.
5. Brian JE Jr, Moore SA, Faraci FM. Expression and vascular effects of cyclooxygenase-2 in brain. *Stroke* 1999;29:2600-6.
6. Banks WA, Gray AM, Erickson MA, Salameh TS, Damodarasamy M, Sheibani N, *et al.* Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *J Neuroinflammation* 2015;25;12:223.
7. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 2003;302:1760-5.
8. Kyrkanides S, Moore AH, Olschowka JA, Daeschner JC, Williams JP, Hansen JT, *et al.* Cyclooxygenase-2 modulates brain inflammation-related gene expression in central nervous system radiation injury. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;104:159-69.
9. Hwang SY, Jung JS, Kim TH, Lim SJ, Oh ES, Kim JY, *et al.* Ionizing radiation induces astrocyte gliosis through microglia activation. *Neurobiol Dis* 2006;21:457-67.
10. Ballesteros-Zebadúa P, Chavarria A, Celis MA, Paz C, Franco-Pérez J. Radiation-induced neuroinflammation and radiation somnolence syndrome. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2012;11:937-49.

11. Moore AH, Olschowka JA, Williams JP, Okunieff P, O'Banion MK. Regulation of prostaglandin E2 synthesis after brain irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:267-72.
12. Moravan MJ, Olschowka JA, Williams JP, O'Banion MK. Cranial irradiation leads to acute and persistent neuroinflammation with delayed increases in T-cell infiltration and CD11c expression in C57BL/6 mouse brain. *Radiat Res* 2011;176:459-73.
13. Greene-Schloesser D, Robbins ME, Peiffer AM, Shaw EG, Wheeler KT, Chan MD. Radiation-induced brain injury: A review. *Front Oncol* 2012;2:73.
14. Hoehn BD, Palmer TD, Steinberg GK. Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. *Stroke* 2005;36:2718-24.
15. Soffietti R, Rudà R, Trevisan E. Brain metastases: current management and new developments. *Curr Opin Oncol* 2008;20:676-84.
16. Su J, Wen S, Zhu J, Liu R, Yang J. Meta-analysis of cyclooxygenase-2 (COX-2) 765G>C polymorphism and Alzheimer's disease. *J Clin Neurosci* 2016;31:4-9.
17. Ozsoy O, Tanriover G, Derin N, Uysal N, Demir N, Gemici B, et al. The effect of docosahexaenoic Acid on visual evoked potentials in a mouse model of Parkinson's disease: the role of cyclooxygenase-2 and nuclear factor kappa-B. *Neurotox Res* 2011;20:250-62.
18. Yamada T, Deitch E, Specian RD, Perry MA, Sartor RB, Grisham MB. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation* 1993;17:641-62.
19. Gonçalves J, Baptista S, Martins T, Milhazes N, Borges F, Ribeiro CF, et al. Methamphetamine-induced neuroinflammation and neuronal dysfunction in the mice hippocampus: preventive effect of indomethacin. *Eur J Neurosci*. 2010;31:315-26.
20. Sathyanesan M, Girgenti MJ, Warner-Schmidt J, Newton SS. Indomethacin induced gene regulation in the rat hippocampus. *Mol Brain* 2015;8:59.
21. Lopes RS, Cardoso MM, Sampaio AO, Barbosa MS Jr, Souza CC, DA Silva MC, et al. Indomethacin treatment reduces microglia activation and increases numbers of neuroblasts in the subventricular zone and ischaemic striatum after focal ischaemia. *J Biosci* 2016;41:381-94.

22. Chao PK, Lu KT, Jhu JY, Wo YY, Huang TC, Ro LS, Yang YL. Indomethacin protects rats from neuronal damage induced by traumatic brain injury and suppresses hippocampal IL-1 $\beta$  release through the inhibition of Nogo-A expression. *J Neuroinflammation* 2012;9:121.
23. Boehme M, Guenther M, Stahr A, Liebmann M, Jaenisch N, Witte OW, *et al.* Impact of indomethacin on neuroinflammation and hippocampal neurogenesis in aged mice. *Neurosci Lett.* 2014;572:7-12.
24. Prechel MM, Ding C, Washington RL, Kolodziej MS, Young MR. In vivo indomethacin treatment causes microglial activation in adult mice. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1997; 29:305-11.
25. Rubio C, Paz C. Indomethacin reverts sleep disorders produced by ozone exposure in rats. *Toxicology* 2003;191:89-96.
26. Y. You, J. Thie, A. Klistorner A, V.K. Gupta y S.L. Graham. Normalization of visual evoked potentials using underlying elec-troencephalogram levels improves amplitude reproducibility in rats. *Investigative ophthalmology & visual science* 2012;53:1473-1478.
27. Brown RJ, Rother KI. Non-nutritive sweeteners and their role in the gastrointestinal tract. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2597–2605.
28. Satoh H, Guth PH, Grossman MI. Role of bacteria in gastric ulceration produced by indomethacin in the rat: cytoprotective action of antibiotics. *Gastroenterology* 1983;84:483-9.
29. Vaananen PM, Meddings JB, Wallace JL. Role of oxygen-derived free radicals in indomethacin-induced gastric injury. *Am J Physiol* 1991;261:G470-5.
30. Summ O, Evers S. Mechanism of action of indomethacin in indomethacin-responsive headaches. *Curr Pain Headache Rep* 2013;17:327.
31. Cavas M, Beltrán D, Navarro JF. Behavioural effects of dimethyl sulfoxide (DMSO): changes in sleep architecture in rats. *Toxicol Lett* 2005;157:221-32.

**Tabla I.** Modelos para la administración y solubilidad *in vitro* de la INDO

Número de método	Método empleado	Solubilidad	Autor
1	Modelo: Disrupción de la Barrera hematoencefálica debido a LPS en ratones CD1 Dosis: 5 mg/kg Vehículo: 7% de NaHCO <sub>3</sub> V.A: intraperitoneal Duración: 1 vez 30 min antes de la administración del LPS Sacrificio: 24 horas después de LPS	Poco soluble con presencia de precipitados	Banks, <i>et al</i> , 2015 <sup>7</sup>
2	Modelo: Evaluar neurogénesis en ratas Fisher 344 tras 2 meses de IR Dosis: 2.5 mg/kg c/12horas comenzando un día antes de IR Vehículo: leche de fresa-bebedero V.A. Oral Duración 2 meses Sacrificio: 2 meses tras IR	Insoluble	Monje, <i>et al</i> , 2003 <sup>8</sup>
3	Modelo: Inducción de inflamación con LPS para evaluar neurogénesis en ratas Fisher 344 Dosis: 2.5 mg/kg /12 horas, un día antes de LPS Vehículo: 5% NaHCO <sub>3</sub> V.A: intraperitoneal Duración: 1 semana Sacrificio: Día 8	Poca solubilidad con precipitados	Monje, <i>et al</i> , 2003 <sup>8</sup>
4	Modelo: Isquemia cerebral y evaluación de neurogénesis en ratas Sprague-Dawley Dosis: 2.5 mg/kg/día Vehículo: comida de rata (pelets) Duración: 3 días antes de la isquemia V.A: oral Sacrificio: 10, 17 y 31 días post administración de INDO	Insoluble	Hoehn, <i>et al</i> , 2005 <sup>15</sup>
5	Modelo: Neuroinflamación inducida por metanfetamina en ratones macho C57BL/J6 Dosis: 10 mg/kg Vehículo: 0.2 M Tris-HCl, pH = 8.2	Soluble	Gonçalves. <i>et al</i> , 2010 <sup>19</sup>

	<p>V.A: intraperitoneal  Duración: 1 vez administrada antes de la administración de la metanfetamina.  Sacrificio: 1, 24 horas y 7 días</p>		
6	<p>Modelo: Regulación génica por la INDO en el hipocampo de rata Sprague-Dawley  Dosis: 10 mg/kg  Vehículo: 10% DMSO/PBS  V.A: intraperitoneal  Duración: 1 vez por 3 días  Sacrificio: 7 horas tras la última inyección</p>	Poca solubilidad con precipitados	Sathyanesan, <i>et al</i> , 2015 <sup>20</sup>
7	<p>Modelo: Isquemia focal ET-1 en ratas Wistar  Dosis: 2.5 mg/kg 2 veces/día primera dosis 24 hrs después de ET-1  Vehículo: Solución salina  V.A: intraperitoneal  Duración: 1 semana  Sacrificio: Día 8 y día 14</p>	Insoluble	Lopes, <i>et al</i> , 2016 <sup>21</sup>
8	<p>Modelo: Inducción de daño neuronal en ratas Wistar por medio de un traumatismo cerebral.  Dosis: 2.5 mg/kg  Vehículo: Etanol al 75%  V.A: intraperitoneal  Duración: 1 vez durante la cirugía (anestesia)  Sacrificio: 8 hrs después del traumatismo cerebral</p>	Soluble	Chao, <i>et al</i> , 2012 <sup>22</sup>
9	<p>Modelo: Neuroinflamación y neurogénesis en ratones C57BL/6  Dosis: 10 µg/mL  Vehículo: Alcohol absoluto (10 mg/ml, solución stock), diluida en agua del bebedero a una concentración final de 10 µg/ml.  V.A: vía oral- bebedero  Duración: 11 semanas  Sacrificio: 2 meses</p>	Soluble	Boehme, <i>et al</i> , 2014 <sup>23</sup>
10	<p>Modelo: Tratamiento con INDO causa activación de microglia en ratones C57/B16  Dosis: 2 µg/ml  Vehículo: agua potable  V.A: oral  Duración: 4 días  Sacrificio: día 4</p>	Insoluble	Prechel, <i>et al</i> , 2000 <sup>24</sup>

11	<p>Modelo: Desordenes del sueño producidos por ozono en ratas Wistar</p> <p>Dosis: 10 mg/kg</p> <p>Vehículo: 20% etanol y 4% de NaHCO<sub>3</sub> disuelto en solución salina</p> <p>V.A. Intramuscular</p> <p>Duración: q hora antes de la realización de registros electroencefalográficos.</p> <p>Sacrificio: Estudios <i>in vivo</i></p>	<p>Poco soluble con presencia de precipitados</p>	<p>Rubio, <i>et al</i>, 2003<sup>25</sup></p>
12	<p>Modelo: Efecto de la INDO en Potenciales Evocados Visuales de la rata y actividad cerebral tras irradiación</p> <p>Dosis: 1.25 mg/kg/12horas</p> <p>Vehículo: se parte de una solución stock de 10 mg/1mL de alcohol absoluto posteriormente se diluye a 1:30 con leche entera Santa Clara</p> <p>V.A. Oral con ayuda de cánula de metal</p> <p>Duración: 3 días</p> <p>Sacrificio: 1 mes después de la administración de la INDO e IR.</p>	<p>Soluble</p>	<p>Método propuesto</p>

V.A Vía de administración, IR irradiación, DMSO Dimetil-sulfóxido, PBS Buffer de Fosfatos, NaHCO<sub>3</sub> Bicarbonato de sodio, ET-1 péptido vasoconstrictor, LPS lipopolisacárido.

**Tabla II.** Modelos para la administración de INDO realizadas *in vivo*

<b>Número de método</b>	<b>Apariencia física de las ratas</b>	<b>Apariencia del sistema GI</b>	<b>Mortalidad</b>	<b>Autor</b>
2	Ratas flacas y pelo erizado, con lordosis, agresivas y con dificultad de movimiento prominente	Ulceración gástrica, en intestino grueso y presencia de hemorragias intestinales (Figura 1)	3/3	Monje, <i>et al</i> , 2003 <sup>8</sup>
5	Ratas flacas y pelo erizado, con lordosis y con dificultad de movimiento prominente	Sangrados intestinales (Figura 2)	3/3	Gonçalves. <i>et al</i> , 2010 <sup>19</sup>
3	Sin cambios contundentes en la apariencia, comportamiento y alimentación de las ratas	Sin daños en el sistema GI (Figura 3).	0/3	<i>Método propuesto</i>



Figura 1 Daños de la INDO al sistema GI usando la leche como vehículo y dosis de 2.5 mg/kg de INDO/12horas en un lapso de 4 días. Se aprecia la presencia de úlcera gástrica y sangrado en estómago, intestino delgado y grueso y colon.



Figura 2. Daños de la INDO al sistema GI usando el 0.2 M Tris-HCl como vehículo y una dosis de 2.5 mg/kg de INDO/12horas en un lapso de 3 días, puede verse la presencia de sangrado en el duodeno e intestino delgado.



Figura 3. Método propuesto: La INDO no muestra daños al sistema GI usando 0.033% etanol absoluto-leche entera Santa Clara y una dosis de 1.5 mg/kg de INDO/12horas durante 3días.

*“Según vamos adquiriendo conocimiento, las cosas no se hacen más comprensibles, sino más misteriosas”*

*Albert Schweitzer*

---

---

# Discusión

---

---

## 9. DISCUSIÓN GENERAL

---

En esta investigación se logró estandarizar la técnica neurofisiológica de PEV, con el fin, de obtener homogeneidad de los estudios neurofisiológicos por medio de la caracterización de la lámpara FlashLED con 96 LEDs, que es un dispositivo luminoso usado para la realización de estudios PEV en seres humanos la cual fue empleada en estudios de ratas de la cepa Wistar. Las variables que se fijaron fueron las coordenadas de estereotáxia, la distancia entre lámpara- ojo de la rata. Con la definición de estas variables fueron determinadas variables fotométricas como la intensidad luminosa promedio y la iluminancia las cuales juegan un rol importante para iniciar la cascada sináptica que comienza en la retina y finaliza en la corteza visual, además de que conocer la magnitud aplicada permite garantizar la reproducibilidad de los registros PEV realizados en ratas. Con dicha caracterización se determinó que la lámpara es apta para la obtención registros PEV pese a que la distribución de intensidad luminosa promedio a través del marco estereotáxico muestre un fenómeno óptico que aparentemente no obedece a la ley del inverso al cuadrado de la distancia debido a la distribución geométrica definida (rectangular) de LEDs.

La adquisición de PEV en ratas cuatro semanas tras irradiación holocraneal usando una dosis de 20 Gy al isocentro elucidó que la radiación ionizante modifica la señal eléctrica que se genera en la corteza occipital mostrando un incremento estadísticamente significativo de la latencia en los componentes PEV tardíos (P2, N2 y P3). Este hallazgo es similar al reportado en la literatura en estudios con infantes tratados con radiación a cerebro completo como tratamiento profiláctico de LLA (Meshref, 2013). Aunado a los cambios de latencia PEV, también se encontró un decremento significativo del % del poder modificando la actividad neural de la corteza visual reflejado en la frecuencia de las bandas theta, alfa y gamma estas bandas están relacionadas fuertemente con funciones cognitivas como el aprendizaje, la memoria y la atención. En estudios se determinó la relación que existe entre el ritmo alfa con relación a la memoria (Klimesh, 1990; Klimesh, 1997), también se ha evidenciado que en enfermedades cerebrales se observan bajas frecuencias alfa (Kõpruner, 1984) y estas bajas frecuencias de alfa pueden ser relacionadas con un decremento de memoria y una anomalía de

las funciones cognitivas (Klimesh, 1997). De la misma manera el ritmo alfa está relacionado con el aprendizaje perceptual (Sigala, 2014). Las oscilaciones alfa se encuentran en significancia en el área visual por lo cual los cambios observados en los PEV pueden deberse directamente a anomalías resultantes en la memoria, el aprendizaje perceptual y entre otras funciones cognitivas. Asimismo, la banda gamma está regulada por alfa y en esta investigación esa tendencia es posible observarse. Por lo que ambos decrementos de frecuencia en estas bandas muestran los efectos a largo plazo que la radiación ionizante induce sobre las funciones cognitivas. La abundancia de la frecuencia del ritmo delta en el grupo antes de radiación y después de radiación es un efecto mostrado debido a la anestesia (Gibbs, 1934; Kiersey, 1951; Brown, 2010).

Las variantes encontradas en las frecuencias de los ritmos cerebrales son directamente atribuibles a las lesiones cerebrales debido a la radiación ionizante ya que la actividad neuronal es dependiente de la integridad del tejido en donde la vía visual no fue afectada por la radiación debido a que no se encontraron cambios significativos en los componentes PEV tempranos P1 y P2 como lo ocurrido con los componentes tardíos, además de que se verificó que la dosis en ojos fuera menor a la dosis de tolerancia siendo para el ojo izquierdo de 3.42 Gy y para el derecho de 3.55 Gy, con esto quedó confirmado que en el plan de tratamiento desarrollado usando 20 Gy al isocentro los ojos están completamente protegidos. Con este hallazgo se confirma que la técnica de arcos dinámicos empleada para la irradiación holocraneal usando un acelerador lineal fue óptima.

Los datos desarrollados en la presente investigación se realizaron bajo condiciones que son aplicables a un modelo murino con fines de investigación sin intención de ser extrapolados a seres humanos, debido a las incógnitas que es necesario considerar comenzando con la administración 20 Gy al isocentro y dosis de prescripción de 15 Gy a cerebro completo en una dosis, la cual no es usada en pacientes pero si es casi equivalente a 30 Gy en dosis fraccionada en 10 sesiones durante dos semanas (Murray, 1997). Otros autores han usado dosis similares de radiación en animales (Monje, 2003). Por lo que es recomendable realizarse estudios usando dosis fraccionadas en modelos experimentales. Otra de las variables a considerar es el uso de anestesia, ya que en tratamientos de radioterapia en paciente comúnmente no es usada

por lo cual este estudio no puede extrapolarse a seres humanos. Se requeriría de un estudio a profundidad para valorar el efecto de distintos anestésicos a nivel de receptores como N-metil d-aspartato (NMDA),  $\alpha_2$ , gama-aminobutírico (GABA) y glicina presentes tanto en la retina como en el cerebro (Kress, 1997; Mittlelman, 1998; Holimann, 2001; Jones, 1992; Zhang, 2003) bajo los efectos de la radiación ionizante ya que en diversos estudios han demostrado que el pre-acondicionamiento del cerebro (disminución de excitación neuronal) funciona como un mecanismo neuroprotector (Rodrigues, 2013).

Para finalizar, es sabido que la radiación produce sustancias reactivas de oxígeno por medio de radicales libres (acción indirecta) y que a su vez intervienen sustancias pro-inflamatorias tras el uso de radiación ionizante (Ballesteros, 2014; Monje, 2003; Kyrkanides, 2002) por lo que el uso de sustancias anti-inflamatorias y/o neuroprotectores como la indometacina INDO requieren de más estudios en modelos in vivo para poder elucidar un posible mecanismo de acción sobre el tejido cerebral incluyendo la corteza visual para poder explicar el rol que juega la inflamación y los cambios hallados en esta investigación de los componentes PEV tardíos. En el capítulo 8 (resultados adicionales) se logró establecer un método para la administración de la INDO sin tener efectos adversos en el sistema GI en un modelo en rata el cual puede ser utilizado para estudios futuros de neuro-inflamación.

*“La conclusión es que sabemos muy poco y sin embargo es asombroso lo mucho que conocemos. Y más asombroso todavía que un conocimiento tan pequeño pueda dar tanto poder”*

*Bertrand Russell*

---

---

# Conclusión

---

---

## 10. CONCLUSIONES GENERALES

---

De los resultados de esta investigación se puede concluir que la radiación ionizante es capaz de producir daños en las funciones visuales cognitivas en ratas cuando se aplica a tejido normal. También podemos concluir que la lámpara Flash LED usada en seres humanos es útil para realizar registros PEV en ratas considerando los parámetros descritos en el presente estudio con los cuales es posible trasladar la tendencia de la latencia PEV reportada en infantes con radioterapia profiláctica en un modelo en rata, con el cual es de gran importancia para estudios futuros de neuro-inflamación y su etiología correspondiente.

# 11. BIBLIOHEMEROGRAFÍA

## UTILIZADA

---

- Achermann P. (2009). "EGG analysis applied to sleep". *Epileptologie*. 26:28-33. <https://doi.org/10.5167/uzh-19935>
- Aminoff MJ, Goodin DS. (1994). "Visual evoked potentials". *J Clin Neurophysiol* 11: 493-499. Doi:10.1097/00004691-199409000-00004
- Ballesteros P, Chavarria A, *et al.* (2012). "Radiation-induced neuroinflammation and radiation somnolence syndrome." *CNS Neural Disord Drug Targets* 11(7): 937-949.
- Ballesteros P, Custodio V, *et al.* (2014). "Whole-brain irradiation increases NREM sleep and hypothalamic expression of IL-1 $\beta$  in rats". *Int J Radiat Biol* 90:142-148. DOI: 10.109/09553002.2014.859767.
- Banks WA, Gray AM, Erickson MA, Salameh TS, Damodarasamy M, Sheibani N, *et al.* (2015). "Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit". *J Neuroinflammation* 25; 212:223.
- Barrett TF, Gill CM, *et al.* (2018). "Brain metastasis from squamous cell carcinoma of the head and neck: a review of the literature in the genomic era". *Neurosurg Focus* 44(6): E11. Doi: 10.3171/2018.2.FOCUS17761
- Basar-Eroglu C, Basar E. (1991). "A compound P300 40 Hz response of the cat hippocampus". *Int. J. Neurosci*, 60:227-237.
- Basar-Eroglu C, Basar E, Demiralp T, Schurmann M. (1992). "P300-response: possible psychophysiological correlates in delta and theta frequency channels". A review. *Int. J. Psychophysiol* 13:161-179.
- Basar E. (1998). *Brain Function and Oscillations. I. Brain Oscillations: Principles and Approaches*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Basar E, Basar EC, *et al.* (2001). "Gamma, alpha, delta and theta oscillations govern cognitive process". *International Journal of Psychophysiology* 39: 241-248.
- Bear M, Connors B, Paradiso M. (2008). *Neurociencia La exploración del cerebro*. USA, Lippincott Williams & Wilkins.
- Boehme M, Guenther M, Stahr A, Liebmann M, Jaenisch N, Witte OW, *et al.* (2014). "Impact of indomethacin on neuroinflammation and hippocampal neurogenesis in aged mice". *Neurosci Lett* 572:7-12.
- Brown EN, Ralf D, *et al.* (2010). "General anesthesia, sleep and coma". *E Engled J Med*, 363:2638-2650.

- Charng J, Nguyen CT, He Z, *et al.* (2013). "Conscious wireless electroretinogram and visual evoked potentials in rats". *PLoS One* 8: e74172.
- Cooley JW, Lewis PA, *et al.* (1969). "The fast Fourier Transform and its application". *IEEE Transactions on education* 12(1): 27-34.
- Creutzfeldt O, Maekawa K, Hosli L. (1969). "Forms of spontaneous and evoked postsynaptic potentials of cortical nerve cells". *Prog Brain Res* 31:265–273.
- de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, de Boer AG, *et al.* (1996). "Effect of endotoxin on permeability of bovine cerebral endothelial cell layers in vitro". *J Pharmacol Exp Ther* 277:1418-23.
- Eckhorn R, Bauer R, Jordan W, *et al.* (1988). "Coherent oscillations: a mechanism of feature linking in the visual cortex?" *Biol. Cybern*, 60:121-130.
- Ferlay JS, Ervik M, *et al.* (2013). "'GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11.'" from <http://globocan.iarc.fr>.
- Franco J, Ballesteros P, Custodio V, Paz C. (2012). "Major neurotransmitters involved in the regulation of sleep-wake cycle". *Rev Invest Clin*, 64(2): 182-191.
- Gibbs FA, Gibbs LE, Lennox WG. (1937). "Effects on the electroencephalogram of certain drugs which influence nervous activity". *Arch Intern Med*, 60:154-66.
- Gray CM, Singer W. (1989). "Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1698-1702.
- Greene D, Robbins ME, Peiffer AM, *et al.* (2012). "Radiation-induced brain injury: a review". *Frontiers in Oncology*. DOI: 10.3389/fonc.2012.00073
- Hall EJ. (2012). *Radiobiology for the Radiologist Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins.*
- Halberg FE, Kramer JH, Moore IM, Wara WM, Matthay KK, Ablin AR. (1992) "Prophylactic cranial irradiation dose effects on late cognitive function in children treated for acute lymphoblastic leukemia". *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22:13-16. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(92\)90976-O](https://doi.org/10.1016/0360-3016(92)90976-O)
- Herman MA, Tremont-Lukats L, Meyers CA, *et al.* (2003). "Neurocognitive and functional assessment of patients with brain metastases: a pilot study". *Am J. Clin. Oncol* 26: 273-279.
- Hoehn BD, Palmer TD, Steinberg GK. (2005). "Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin". *Stroke*, 36:2718-24.
- Holder GE. (2004). "Electrophysiological assessment of optic nerve disease". *Eye (Lond)* 18: 1133-1143. doi:10.1038/sj.eye.6701573.
- Hollmann MW, Liu HT, Hoenemann CW, Liu WH, Durieux ME. (2001). "Modulation of NMDA receptor function by ketamine and magnesium. Part II: interactions with volatile anesthetics". *Anesth Analg*, 92:1182-1191.
- Hu WH, Yu MZ, Long SX, *et al.* (2003). "Impairment of optic path due to radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma" *Doc Ophthalmol* 107(2):101-110.

- Hwang SY, Jung JS, Kim TH, *et al.* (2006). "Ionizing radiation induces astrocyte gliosis through microglia activation". *Neurobiol Dis* 21:457-67.
- Jones MV, Brooks PA, Harrison NL. (1992). "Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated Cl-currents in cultured rat hippocampal neurons by three volatile anaesthetics. *J Physiol*, 449:279-293.
- Khan FM. (1994). *The Physics of Radiation Therapy*. Baltimore, Maryland, Williams and Wilkins.
- Kiersey DK, Bickford RG, Faulconer A Jr. (1951). "Electro-encephalographic patterns produced by thiopental sodium during surgical operations; description and classification". *Br J Anaesth*, 23:141-52.
- Klimesch W, Schimke H, Ladurner G, and Pfurtscheller G. (1990). "Alpha frequency and memory performance". *J. Psychophysiol*, 4:381-390.
- Klimesch W, Schimke H, Schwaiger J. (1994). "Episodic and semantic memory: an analysis in the EEG theta and alpha band". *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol* 91:428-441.
- Klimesch W. (1997). "EEG-alpha rhythms and memory process". *Int J Psychophysiol*, 26:319-340. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8760\(97\)00773-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8760(97)00773-3)
- Kondziolka D, Niranjan A, Flickinger, *et al.* (2005). "Radiosurgery with or without whole-brain radiotherapy for brain metastases: the patients perspective regarding complication". *Am. J. Clin. Oncol.* 28:173-179.
- Köpruner V, Pfurtscheller G and Auer LM. (1984). "Quantitative EEG in normals and in patients with cerebral ischemia". *Prog Brain Res*, 62:29-50.
- Kress HG. (1997). "[Mechanisms of action of ketamine]". *Anaesthesist*, 1:S8-19. doi:10.1007/PL00002469. PubMed: 9163283.
- Kyrkanides S, Moore AH, Olschowka JA, *et al.* (2002). "Cyclooxygenase-2 modulates brain inflammation-related gene expression in central nervous system radiation injury". *Brain Res Mol Brain Res* 104:159-69.
- Lamproglou QM, Chen G, Boisserie JJ, *et al.* (1995) "Radiation-induced cognitive dysfunction: an experimental model in the old rat", *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31: 65-70.
- Lopes RS, Cardoso MM, Sampaio AO, Barbosa MS Jr, Souza CC, DA Silva MC, *et al.* (2016). "Indomethacin treatment reduces microglia activation and increases numbers of neuroblasts in the subventricular zone and ischaemic striatum after focal ischemia". *J Biosci* 41:381-94.
- Maggio FM, Minafra L, Forte GI, *et al.* (2015). "Portrait of inflammation response to ionizing radiation treatment" *J Inflamm* 12:14. DOI 10.1186/s12950-015-0058-3
- Manual de Encargado de Seguridad Radiológica. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, México.
- Meshref M, ElShazly N, Nasr M, AbdElhai R. (2013). "Effect of different doses of prophylactic cranial irradiation in childhood lymphoblastic leukemia on CNS relapses,

- late cognitive decline and learning disabilities". *J Cancer Ther Res* 2:10. <http://dx.doi.org/10.7243/2049-7962-2-10>
- Mittleman RE, Hearn WL, Hime GW. (1998). "Xilazina toxicity literature review and report of two cases". *J Forensic Sci* 43: 400-402.
- Moore AH, Olschowka JA, Williams JP, *et al.* (2005). "Regulation of prostaglandin E2 synthesis after brain irradiation". *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62:267-72.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD. (2003). "Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis". *Science* 302: 1760-1765.
- Muñoz E. y Álvarez L. (2008). *Anatomía, fisiología e higiene*. Toluca, México, Librería Imagen.
- Murray KJ, Scott C, *et al.* (1997). "A randomized phase III study of accelerated hyperfractionation versus standard in patients with unresected brain metastases: a report of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 9104." *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 39(3): 571-574.
- Neuper C, Pfurtscheller G. (2001). "Event-related dynamics of cortical rhythms: frequency-specific features and functional correlates". *Int J Psychophysiol*, 43(1): 41:58.
- Ortiz Z, Camacho MA, Ballesteros P, Franco-Pérez J, *et al.* (2018). "Characterization of the flash led lamp: EBNeuro used to acquire visual evoked potentials in rats". *RMIB* 39:21-28. <https://doi.org/10.17488/RMIB.39.1.2>
- Pfurtscheller G, Kalaudek K, Neuper C. (1998). "Event-related beta synchronization after wrist, finger and thumb movement". *Electroenceph. and Clin. Neurophysiol*, 109:154-160.
- Rades D, Kueter JD, *et al* (2008). "Comparison of stereotactic radiosurgery (SRS) alone and whole brain radiotherapy (WBRT) plus a stereotactic boost (WBRT+SRS) for one to three brain metastases." *Strahlenther Onkol* 184(12): 655-662.
- Rodrigues R, Fernandes G, *et al.* (2013). "Anesthetics, cerebral protection and preconditioning". *Rev Bras Anestesiol*, 63(1):119-138.
- Russo A, Schiliro G. (1987). "Some aspects of neurotoxicity associated with central nervous system prophylaxis in childhood leukemia". *Acta Haematol* 78:139-141.
- Schurmann M, Bassar-Eroglu C, Kolev V, *et al.* (1995). "A new metric for analyzing single-trial event-related potentials ERPs. Application to human visual P300 delta response". *Neurosci. Lett.* 197:167-170.
- Seteriade M. (2006). "Grouping of brain rhythms in catechthalamal systems" *Neuroscience*, 137: 1087-1106.
- Sigala R, Haufe S, Roy D, Dinse HR, Ritter P. (2014). "The role of alpha-rhythm states in perceptual learning: insights from experiments and computational models". *Front Comput Neurosci* 8:36. <https://doi.org/10.3389/fncom.2014.00036>
- Soffiatti R, Rudà R, Trevisan E. (2008) "Brain metastases: current management and new developments". *Curr Opin Oncol*, 20:676-84.

- Spinelli EM. (2000). Interfaces para control cerebral, capítulo 2. Tesis de Magíster, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata.
- Swenson R. (2006). Review of Clinical and Functional Neuroscience. Dartmouth Medical School. [https://www.dartmouth.edu/~rswenson/NeuroSci/chapter\\_11.html](https://www.dartmouth.edu/~rswenson/NeuroSci/chapter_11.html)
- Teismann P, Vila M, Choi DK, Wu DC, et al. (2006). "Cox-2 and neurodegeneration in Parkinson's Disease". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991:272-277.
- Tobimatsu S, Celesia GG. (2006). "Studies of human visual pathophysiology with visual evoked potentials". *Clin Neurophysiol* 117: 1414-1433.  
doi: 10.1016/j.clinph.2006.01.004. PubMed: 16516551.
- Tofilon PJ. And Fike JR (2000). "The radioresponse of the central nervous system: a dynamic process". *Radiat Res* 153: 357-370.
- Ueberall MA, Skirl G, Strassburg HM, *et al* (1997). "Neurophysiological findings in long-term survivors of acute lymphoblastic leukemia in childhood treated with the BFM protocol". *Eur J Pediatr* 156:727-733.
- van der Kogel AJ. (1986). "Radiation-induced damage in the central nervous system: an interpretation of target cell responses." *Br J Cancer Suppl* 7: 207-217.
- Welch PD. (1967) "The use of fast Fourier transforms for the estimation of power spectra: a method based on time averaging over short, modified periodograms". *IEEE Trans Audio Electroacoustics*,15: 70-73.
- Yan HQ, Mazow ML, Dafny N. (1995). "Monocular visual deprivation at the critical period modulates photic evoked responses". *Brain Res Bull* 36:545-548.
- Yoneoka Y, Satoh M, Akiyama K, *et al.* (1999). "An experimental study of radiation-induced cognitive dysfunction in an adult rat model", *Br J Radiol*, 72: 1196-1201.
- You Y, Klistorner A, Thie J, Graham SL. (2011). "Improving reproducibility of VEP recording in rats: electrodes, stimulus source and peakanalysis". *Doc Ophthalmol* 123: 109-119.
- Zhang Y, Laster MJ, Hara K, Harris RA, Eger EI, *et al.* (2003). "Glycine receptors mediate part of the immobility produced by inhaled Anesthetics". *Anesth Analg*, 96:97-101.  
doi:10.1097/00000539-200301000-00021.

# 12. ANEXOS

---

**Evaluación del tratamiento de indometacina en los potenciales evocados visuales y actividad cerebral en un modelo en ratas tras cuatro semanas de irradiación holocraneal con 20 Gy.**

## INTRODUCCIÓN

La indometacina (INDO) es un anti-inflamatorio no esteroideo que actúa bloqueando la actividad de la cicloxigenasa (COX) dando como resultado la reducción de la producción de la prostaglandina (Banks, 2015) también es considerado un fármaco no selectivo de prostanoideos (Boehme, 2014). La enzima COX se encuentra en dos isoformas COX-1 y COX-2. La COX-1 está principalmente involucrada en la producción de prostanoideos relevantes en los procesos fisiológicos, mientras que COX-2 es principalmente responsable de la producción de prostanoideos ligados a eventos patológicos, COX convierte al ácido araquidónico a hidroxiendoperóxido (Teismann, 2003).

Se ha reportado que la inflamación en el cerebro está involucrada en la patogenia de varios desórdenes neurológicos como el accidente cerebrovascular (Hohen, 2005) y la epilepsia (Soffietti, 2008). Experimentalmente, la inflamación cerebral ha sido generada mediante la administración de lipopolisacáridos (LPS) o irradiación (Boehme, 2014; Monje, 2003). Durante la inflamación se liberan células inmunes para autoprotección, a diferencia del resto del cuerpo que produce de una amplia gama de células inmunes (macrófagos, células natural killer, linfocitos T y linfocitos B) el cerebro es considerado un órgano privilegiado y exclusivamente activa la microglía sustancia neuroinmune que funge como macrófagos (Muñoz, 2008). El tratamiento con INDO ha demostrado que es capaz de reducir la activación de la microglía (López, 2016; Hohen, 2005), a su vez mejora la cantidad de neuroblastos en el estriado tras una isquemia (López, 2016; Boehme, 2014), también ha mostrado que incrementa la sobrevivencia de células progenitoras permitiendo una alta fracción de diferenciación entre

oligodendrocitos y neuronas (Hohen, 2005). La INDO decrece los niveles cerebrales de citosinas como IL-1 $\beta$  (interleucina 1 beta), IL-9 y de GFAP (proteína gliofibrilar ácida, que indica la activación de astrocitos) (Banks, 2015) El uso de radiación ionizante produce el aumento de citosinas inflamatorias como la IL-1 $\beta$ , TNF-a, IL-6, IL-1 $\alpha$ , PG (prostaglandinas) y GFAP tras radiación holocraneal en un modelo murino (Ballesteros, 2014; Morovan, 2011; Moore, 2005). Para contrarrestar la activación de marcadores inflamatorios se ha recurrido a la terapia del uso de fármacos corticoesteroides o inhibidores de COX-2, simultáneamente con la radioterapia; mostrando que la neuroinflamación juega un rol muy importante y determinante para las funciones cerebrales postirradiación. Experimentalmente, como inhibidores de COX-2 se han utilizado INDO y NS398, los cuales cumplen con el mismo objetivo (inhibir a COX-2) y sólo difieren en su selectividad, siendo NS398 más selectivo a COX-2 que la INDO. Debido a la respuesta compleja de la neuroinflamación ante la radiación craneal ya que involucra a múltiples tipos de células y por ende, distintas vías de señalización, este estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos de la INDO en ratas administrándose antes y después del tratamiento de radiación holocraneal a 20 Gy y evaluar los PEV y actividad cerebral de las ratas cuatro semanas tras radiación.

## **METODOLOGÍA**

Se utilizaron ratas Wistar de 240 a 260 g (n=17) y se dividieron en dos grupos: ratas sham o control (n=3), ratas con WBRT a 20 Gy (n=3), ratas con WBRT-vehículo (n=3) y ratas con administración de INDO (n=8). Las ratas sham y con WBRT se realizaron con el protocolo antes mencionado (Ortiz, 2018). La preparación del vehículo partió de una solución stock de 1 mL de etanol de grado absoluto en 30 mL de leche Santa Clara, las ratas fueron pesadas y se calcularon las correspondientes unidades a administrar tomando como dosis 1.25 mg/kg cada 12 horas durante 3 días hasta completar 7.5 mg/kg, el tratamiento comenzó 1 hora antes de realizar la irradiación holocraneal. La preparación de la solución stock para INDO se realizó en las mismas condiciones en excepción de la adición de 10 mg de INDO (ver capítulo 8. Resultados anexos). Las ratas se mantuvieron en cajas de acrílico con cama de aserrín por separado a condiciones de humedad del 85%, ciclos de luz:oscuridad de 12:12, con comida y bebida de libre acceso. Se obtuvieron registros EEG y PEV cuatro semanas después de la

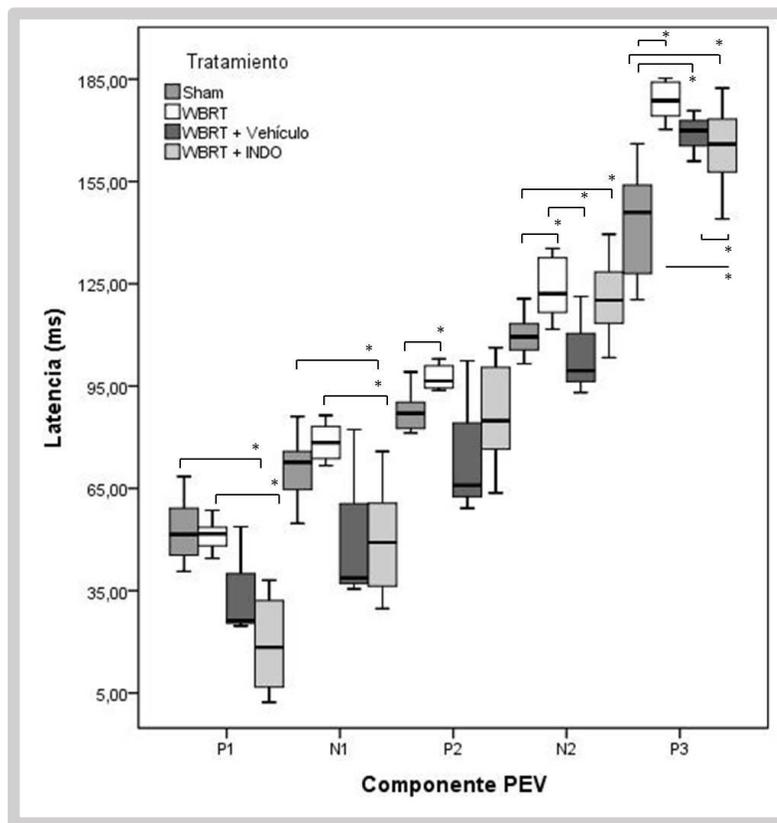
irradiación holocraneal (ver Ortiz, 2018). Mediante la técnica de congelación y la decapitación de las ratas se extrajo tejido cerebral de la corteza visual primaria, región principal relacionada a los PEV también de estructuras como el hipocampo que ha sido relacionado con la neuroinflamación y del hipotálamo. Con el tejido extraído se realizó la prueba ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para evaluar la proteína IL-1 $\beta$ . Los tejidos se homogenizaron en un amortiguador de lisis de 8.2 M guanidina-HCl, 82 mM Tris-HCl/ph = 8.0, 4x PBS complementado con un inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, USA).

La técnica ELISA se realizó de acuerdo con las especificaciones y condiciones recomendadas por el fabricante. El kit utilizado para la evaluación de la proteína de IL-1 $\beta$  fue Rat IL-1beta/IL-1F2 Quantikine ELISA kit (R&G Systems, USA). Durante la primera incubación se colocó 50  $\mu$ l de la muestra homogenizada con 50  $\mu$ l de diluyente RD1-21 en cada pozo de la placa sensibilizadas con el anticuerpo de captura, cumplida la incubación mediante lavados se eliminó la sustancia no ligada y se procedió a una segunda incubación con 100  $\mu$ l del conjugado específico de IL-1 $\beta$ , tras la eliminación de anticuerpoenzima no unida al reactivo se adicionó un sustrato tras esa unión del marcador al sustrato se utilizó una solución de detección para generar el cambio de color. La intensidad del color medido es proporcional a la cantidad de IL-1 $\beta$  encontrada en el espécimen. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Chromate a 450 nm. A partir de las absorbancias obtenidas se empleó una función de ajuste a partir de las concentraciones conocidas se determinó la concentración en pg/ml de IL-1 $\beta$ . Tras la corrección del peso de cada estructura se determinaron los pg/mL de IL-1 $\beta$  por cada mg de tejido cerebral.

Se utilizaron gráficas de caja y bigotes para representar el comportamiento de la latencia de cada uno de los componentes VEP de los cuatro grupos de ratas. Para la comparación independiente de los grupos PEV, ritmos cerebrales y la cantidad proteína IL-1b en el tejido cerebral se realizó mediante un ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS PRELIMINARES

La **Figura 9** muestra que la radiación holocraneal incrementa la latencia de todos los componentes PEV significativamente de las componentes P2, N2 y P3. El uso del vehículo disminuyó la latencia, es decir, la velocidad de la transmisión sináptica en la vía visual mejoró con la ingesta de leche y alcohol durante el proceso de irradiación a 20 Gy esta tendencia se muestra para todos los componentes especialmente en los componentes N2 y P3.



**Figura 9.** Latencia de los componentes PEV para los grupos: sham, tras irradiación holocraneal a 20 Gy, tras irradiación holocraneal + vehículo (dosis 1.25 mg/kg/12h/3d leche/etanol absoluto) y tras irradiación holocraneal + INDO (dosis 1.25 mg/kg/12h/3d INDO/vehículo). \* representa una diferencia estadísticamente significativa evaluada mediante un ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis con nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

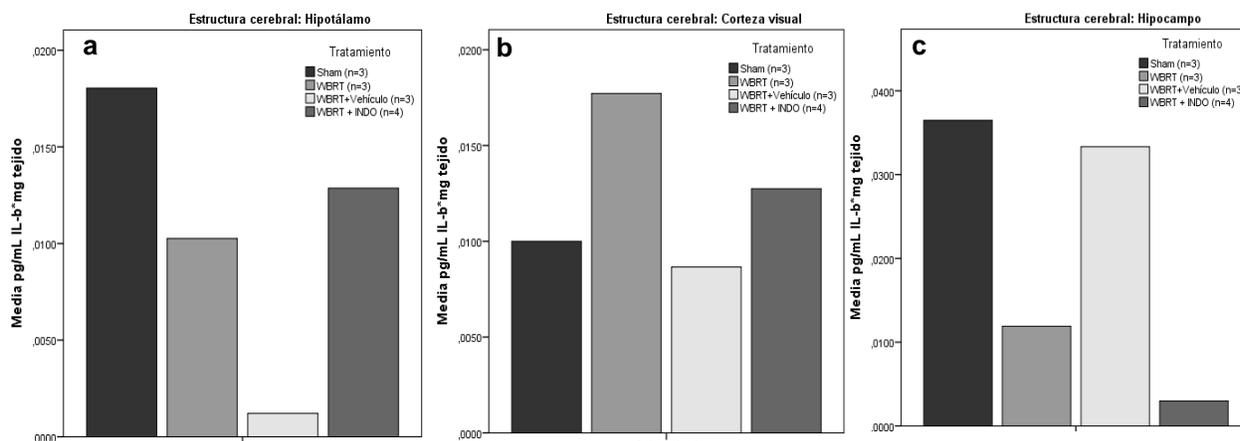
El uso del fármaco INDO disminuyó la latencia significativamente en los componentes P1 y N1 en comparación con el grupo irradiado e incluso el grupo sham o control, P2 y N2 no tuvo una mejora significativa de la latencia y P3 mostró una mejora de la latencia con respecto al grupo de irradiación, pero no a valores comparables al grupo control. La amplitud no mostró cambios estadísticamente significativos.

En la **Tabla 1** muestra la clasificación de las bandas de frecuencia entre los grupos sham, WBRT, WBRT mas el vehículo y WBRT más INDO. Se observa que el % de poder EEG se reduce significativamente tras el tratamiento de irradiación, mismo que tiene un pequeño aumento, pero no estadísticamente significativo con la administración del vehículo. Sin embargo, la INDO provoca un aumento de tendencia de la frecuencia de las bandas teta, alfa, beta y gamma bajo, significativamente para los ritmos teta y gamma; donde teta es muy cercano al valor del grupo control y gamma se ve significativamente mejorado con respecto al grupo sham y tras irradiación. El ritmo delta relacionado con la anestesia se mantiene en mayor proporción en el grupo WBRT y se ve aminorado con la administración del vehículo y la indometacina.

<b>Tabla 1.</b> % de potencia EEG. Los resultados se expresan en % de potencia del grupo control (media ± ES)				
<b>Ritmos cerebrales</b>	<b>Sham (n=6)</b>	<b>WBRT (n=7)</b>	<b>WBRT+Vehículo (n=2)</b>	<b>WBRT+INDO (n=5)</b>
Delta (0-4 Hz)	100 ± 17.07	66.16 ± 6.28	77.28 ± 11.18	57.56 ± 7.52
Tetha (4-8 Hz)	100 ± 22.37	42.94 ± 5.81*	90.52 ± 28.91	88.35 ± 19.29*
Alfa (8-12 Hz)	100 ± 17.89	24.25 ± 2.93*	42.54 ± 16.89	70.75 ± 16.93
Beta (12-19 Hz)	100 ± 22.48	59.55 ± 6.61	66.20 ± 2.45	83.59 ± 24.15
Gamma (19-50 Hz)	100 ± 19.27	50.45 ± 5.46*	70.87 ± 8.41	177.40 ± 28.13*#

Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los grupos \*SHAM-WBRT, + WBRT – WBRT+INDO y # SHAM – WBRT+INDO.  
ES representa el error estándar.

La cantidad de la proteína IL-1 $\beta$  usada como marcador inflamatorio incrementa su activación a nivel de la corteza visual primaria (**Figura 10b**), tendencia que no ocurre en el hipotálamo e hipocampo (**Figura 10a y c**). Con la administración del vehículo la cantidad de proteína se modifica a concentraciones similares al grupo control o sham, a diferencia del grupo tratado con INDO que muestra un decremento de IL-1 $\beta$  con respecto al grupo irradiado a 20 Gy.



**Figura 10.** Cuantificación de la proteína IL-1 $\beta$  en estructuras cerebrales en los diversos grupos: Sham, WBRT, WBRT+Vehículo y WBRT+INDO mediante un inmunoensayo ELISA. a) en el hipotálamo, b) en la corteza visual primaria y c) hipocampo.

## DISCUSIÓN

La radiación ionizante a nivel del cerebro provoca alteraciones de los componentes PEV, de las bandas de frecuencia de los ritmos cerebrales, así como de la expresión anormal de marcadores inflamatorios como la IL-1 $\beta$  sobre la corteza visual primaria en un modelo en rata. Como se muestra en las **Figuras 9 y 10** el uso de INDO como neuroprotector y tratamiento para la regulación de la expresión de IL-1 $\beta$  a través de cadena de COX tras irradiación es un fármaco proeza que puede ser utilizado para inhibir o se aminorar la expresión de proteínas inflamatorias que se relacionan con el síndrome de radiación y la presencia transitoria de inflamación después de haber recibido irradiación holocraneal. De los resultados mostrados, se observa que el vehículo utilizado tiene un comportamiento favorable ya que incrementa la actividad neuronal en la vía visual y disminuye la expresión de IL-1 $\beta$ . Por lo que se cree que la presencia de vitamina A o la proteína adicionada a la leche entera pudieran ser causantes de

esos beneficios, o bien, de la administración de pequeñas dosificaciones de etanol durante 3 días ( $0.149 \pm 0.012$ g etanol/Kg peso), estudios han mostrado que la ingesta de pequeñas cantidades de etanol es benéfica en comparación de grandes cantidades en tiempos cortos.

## **PERSPECTIVA**

Los resultados mostrados son preliminares. Debido a que el grupo de ratas usados para estudiar el comportamiento del vehículo fue muy pequeño por lo cual se recomienda ampliarlo y considerar la adición de un grupo exclusivo para valorar el efecto del vehículo sin irradiación holocraneal, de esta manera se tendría un panorama sobre el efecto causante en los registros neurofisiológicos.

La cantidad medida de IL-1 $\beta$  en el inmunoensayo ELISA muestra una tendencia de dicha expresión, sin embargo, no se halló una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, también se encontraron expresiones erróneas al cuantificar IL.1 $\beta$  en el hipocampo el cual ha sido ampliamente reportado en la literatura utilizando un modelo de irradiación cerebral (capítulo 8. Resultados anexos) de la misma manera ocurrió con el hipotálamo, por lo que se recomienda repetir el inmunoensayo.