



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA – IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

POSGRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

**“RESPUESTA NEUROVASCULAR AL TRATAMIENTO DE ACTIVADOR
TISULAR DEL PLASMINÓGENO Y ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA DEL
GANGLIO GENICULADO EN UN MODELO DE INFARTO CEREBRAL
ISQUÉMICO EN CONEJOS”**

Tesis que presenta:

I.B. Martín Ramírez Meza

Matrícula: 2143805441

Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias
(Ingeniería Biomédica)**

Asesores:

Dr. José Joaquín Azpiroz Leehan *J. Azp.*

Dr. Emilio Sacristán Rock *E. Sacristán*

Jurado:

Presidente: Dr. Luis Jiménez Ángeles

Secretario: Dr. José Joaquín Azpiroz Leehan

Vocal: Dra. Nohra Elsy Beltrán Vargas

Iztapalapa, Ciudad de México, marzo 2020

PARA CITAR ESTA TESIS/TO CITE THIS THESIS:

M. Ramírez-Meza, “Respuesta neurovascular al tratamiento de activador del plasminógeno tisular y estimulación magnética del ganglio geniculado en un modelo de infarto cerebral isquémico en conejos”, Tesis M.Sc., Depto. Ing. Eléctrica, Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa (UAM-I), Ciudad de México, México, 2020.

DEDICATORIA

A mis padres:

Por todo su cariño, apoyo, comprensión y enseñanzas que han apoyado a formarme como un hombre de principios y valores que sigue aprendiendo de ustedes.

A mi hermana:

Por ser siempre mi mano derecha, enseñarme a ser fuerte ante cualquier situación y ser el claro ejemplo de levantarse y siempre seguir adelante.

A mi familia:

A mis abuelos por enseñarme que los límites nos los ponemos nosotros y que somos capaces de alcanzar todo lo que nos propongamos.

A mis tías-mamás por sus consejos, apoyo incondicional y darme ánimos para seguir adelante.

A mis primos por ser motivación en mi vida y ver en ellos el futuro, esperando que ellos puedan ver en mí un buen ejemplo.

A mi familia adoptiva:

Por haberme brindado un espacio en sus vidas, por su cariño, cuidados y consejos.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores:

Dr. Joaquín Azpiroz Leehan y Dr. Emilio Sacristán Rock.

Por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo de investigación. Por sus valiosas enseñanzas, su apoyo y dirección brindados a este trabajo.

Al equipo de trabajo del CI³M:

A las M. en C. Olivia Sánchez Barrios y Andrea García Quintanar por su asesoría académica. Al Ing. Adrián González Hernández, M. en C. Montserrat Godínez, Dra. Lizbeth Cárdenas, M.V.Z Sergio Elguera Guzmán, M. en C. Yolanda Cruz, Q.B.P. Abraham E. Santamaría Peregrino, Enrique Castillo Avilés, Ing. Angélica Calderón, Nadia Carolina Edeza y Gamaliel Mendoza por el apoyo brindado durante el desarrollo experimental de este trabajo. Al Ing. Rafael G. Lara Estrada por su asesoría con el sistema de neuronavegación, a los técnicos radiólogos Blanca G. Delgado Sánchez, Luis M. Sánchez Carmona y Yaacob J. Villavicencio Flores, por su apoyo y contribuciones en la parte imagenológica. Al M.I. Andrés Morón Mendoza y C.P. Gabriela Zacarias por el apoyo administrativo brindado.

A nuestros colaboradores:

A la Dra. Chen y al Dr. Mark Borsody por su asesoría y capacitación para la elaboración del protocolo experimental.

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Emilio Sacristán Rock y del Dr. Joaquín Azpiroz Leehan en el Centro Nacional de Investigación e Imagenología e Instrumentación Médica (CI3M) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa; Se contó con el apoyo de la beca de posgrado y un PEI (222241) del CONACyT.

ÍNDICE

	Página
PARA CITAR ESTA TESIS/TO CITE THIS THESIS:	1
DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
RESUMEN	8
1 INTRODUCCIÓN	9
2 ANTECEDENTES	11
2.1 Irrigación Cerebral	11
2.2 Evento Vascular Cerebral	13
2.3 Tratamientos	15
2.4 Nervio Facial.....	17
2.5 Estimulación Magnética.....	18
2.6 Resonancia Magnética	20
2.7 Estudios previos	22
3 Justificación e Hipótesis	24
3.1 Justificación	24
3.2 Hipótesis	24
4 OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo General.....	25
4.2 Objetivos específicos	25
5 MÉTODOS	26
5.1 Sujetos.....	26
5.2 Modelo de isquemia por embolización de la AMC	26
Tratamientos utilizados	27
Estimulación Magnética.....	27
Terapia Trombolítica	27
5.3 Diseño experimental	28
Inducción y anestesia	29
Cirugía fijación de catéteres.....	29
Recuperación post-cirugía	30

Preparación de coágulos	30
Oclusión de la ACM	31
Evaluación Neurológica.....	31
Resonancia Magnética	31
Neuronavegación	32
Aplicación de tratamientos	33
Seguimiento y monitoreo.....	33
Extracción de cerebros e histopatología	34
Análisis estadístico.....	36
6 RESULTADOS.....	37
6.1 Resultados de imágenes de perfusión	38
6.2 Resultados de las evaluaciones neurológicas.....	39
6.3 Resultados del análisis histopatológico	40
6.4 Resultados del efecto del tPA sobre el IP.....	41
6.5 Resultado del efecto del tPA sobre la recuperación neurológica.....	42
6.6 Resultado del efecto del tPA sobre el análisis histopatológico.....	43
7 DISCUSIÓN	44
8 CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO	46
8.1 Conclusiones.....	46
8.2 Trabajo a futuro.....	47
9 Abreviaturas.....	48
10 BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXO A. PREPARACIÓN DE COÁGULO	53
ANEXO B. ESCALA NEUROLÓGICA	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1: Distribución de conejos	37
Tabla 2: Frecuencias observadas	43
Tabla 3: Frecuencias esperadas.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1: Irrigación Sanguínea Cerebral.....	12
Figura 2: Tipos de EVC.....	14
Figura 3: Nervio Facial.....	17
Figura 4: Campos inducidos.....	19
Figura 5: Curva de perfusión.....	21
Figura 6: Mapas de índice de perfusión.....	22
Figura 7: Cambios en el índice de perfusión.....	23
Figura 8: Cirugía y fijación de catéteres.....	30
Figura 9: Localización de marcadores fiduciales.....	32
Figura 10: Localización del ganglio geniculado.....	32
Figura 11: Aplicación de tratamientos.....	33
Figura 12: Cerebro completo.....	34
Figura 13: Cortes histológicos.....	35
Figura 14: Cambio en el IP debido a la estimulación.....	38
Figura 15: Cambio en el puntaje de la evaluación neurológica.....	39
Figura 16: Proporción de tejido infartado.....	40
Figura 17: Efecto del tPA sobre el IP.....	41
Figura 18: Efecto del tPA sobre la recuperación neurológica.....	42
Figura 19: Efecto del tPA sobre el tamaño del tejido isquémico.....	43

RESUMEN

Introducción: La estimulación magnética del ganglio geniculado del nervio facial es una tecnología que ha demostrado efectividad en modelos animales con evento cerebrovascular isquémico mediante la restauración de la perfusión a través de la circulación colateral. Sin embargo, se desconocen los efectos que pudieran darse al combinar esta técnica con un agente trombolítico como el activador tisular del plasminógeno (tPA).

Objetivo: Comparar el efecto que tiene la terapia de tPA y estimulación magnética del ganglio geniculado en un modelo de infarto cerebral isquémico en conejos.

Métodos: Se realizó un estudio apegado a los principios de las buenas prácticas de laboratorio en un modelo de infarto cerebral isquémico en conejos Nueva Zelanda. Se utilizó un diseño factorial de 2x2 para evaluar el efecto del tPA (dosis única 3.3 mg/kg) y estimulación magnética del ganglio geniculado del nervio facial (0.9T durante 2 minutos). Todos los conejos recibieron estimulación magnética y la aplicación del tPA se realizó de forma aleatoria. Aquellos que no presentaron un incremento de la perfusión de al menos el 25% sobre línea de base y no recibieron tPA fueron considerados como grupo control.

Resultado: Se observó que la estimulación magnética favorece el aumento de la perfusión sanguínea cerebral y no se encontraron cambios que sugieran efectos negativos derivado del uso de la terapia combinada. No se encontró diferencia entre los sujetos que tuvieron una respuesta a la estimulación y los que no tuvieron respuesta.

Conclusión: La estimulación magnética del ganglio geniculado ocasiona un incremento de la perfusión cerebral, combinar esta terapia con tPA no muestra un aumento en la mortalidad. No observar una diferencia entre los sujetos que respondieron y los que no a la estimulación sugiere que hay un error metodológico en la clasificación de los sujetos.

1 INTRODUCCIÓN

El Evento vascular cerebral (EVC) representa una de las principales causas de mortalidad en México y en los Estados Unidos de América así como la primera causa de discapacidad en países desarrollados[1,2]. Es un evento que se da de forma aguda y puede ser clasificado como isquémico cuando el flujo sanguíneo cerebral se ve disminuido debido a la obstrucción de una arteria, o puede ser clasificado como hemorrágico cuando ocurre la ruptura de alguna arteria[3]. Algunos de los principales factores de riesgo son la hipertensión, dislipidemia, diabetes mellitus, enfermedades cardíacas, entre otras[4]. En México la tasa de mortalidad es del 52% para eventos hemorrágicos y del 29% para eventos isquémicos[5]

El tiempo de atención es el principal factor que determina tanto los índices de mortalidad así como en las secuelas que tendrá el. Ante un EVC el cuerpo responde naturalmente mediante la circulación colateral que permite mantener el flujo sanguíneo cerebral (FSC) constante evitando así el aumento de tejido isquémico[6]. En los casos de EVC isquémicos, los tratamientos de emergencia se enfocan en restaurar el FSC mediante la disolución o remoción de los coágulo a través de procedimientos trombolíticos y/o intravasculares (embolectomía)[7,8].

En México aproximadamente el 56% de las personas presentan una discapacidad grave después del evento[4]. El pronóstico de la recuperación de los pacientes depende de la ventana de tiempo que se tiene después de la aparición de los primeros síntomas [9]. Por tanto es necesario que el paciente reciba un tratamiento dentro de las primeras 4.5 horas de haber iniciado los síntomas[10], siendo el activador tisular del plasminógeno (tPA) el tratamiento estándar para EVC isquémicos. Este fármaco desintegra los coágulos permitiendo restaurar el flujo sanguíneo. Sin embargo sólo el 4% de los pacientes con EVC isquémico pueden recibir este fármaco[11]. En modelos animales se ha demostrado que el uso de tPA en una etapa temprana (<3h) después de haber inducido un EVC

isquémico tiene, al igual que en los humanos, un beneficio en la reducción del volumen medio de tejido infartado[12,13].

La Estimulación Magnética (EM) del ganglio geniculado del nervio facial es una técnica no invasiva que ha demostrado ser efectiva para aumentar la perfusión cerebral al aumentar el FSC [14]. Dada la naturaleza de esta técnica, se puede administrar un tratamiento de estimulación en pacientes que están cursando un EVC isquémico y con esto se podría limitar la expansión de tejido isquémico [15].

2 ANTECEDENTES

2.1 Irrigación Cerebral

El tejido cerebral es irrigado a través de cuatro arterias mayores, las arterias carótidas internas (ACI) y las arterias vertebrales (AV) que permiten mantener el FSC constante brindando glucosa, oxígeno y otros nutrientes a las neuronas. La masa del tejido cerebral en el adulto es de aproximadamente 1.5Kg y recibe en promedio un flujo de 750-900 ml/min manteniendo así una perfusión de 50-65 ml/100g/min. Esto representa el 15-20% del gasto cardiaco en reposo para un órgano que representa apenas el 2% del peso total del cuerpo[16].

Las ACI (izquierda y derecha) nacen de la bifurcación de las arterias carótidas comunes (ACC) a la altura del cuello; se bifurcan en dos arterias cerebrales principales, las arterias cerebrales anteriores (ACA) y las arterias cerebrales medias (ACM) que forman parte de la circulación anterior, mientras que las AV (izquierda y derecha) nacen de las arterias subclavias y convergen en la arteria basilar a la altura del puente de Varolio en la superficie anterior del tronco cerebral. De la arteria basilar se originan las arterias cerebrales posteriores (ACP), las arterias cerebelosas (superior e inferior) y las arterias del puente, formando así la circulación posterior[17].

En la circulación anterior, las ACM son las ramas de mayor tamaño, responsables de suministrar sangre a la corteza de la ínsula y otras áreas adyacentes. Estas arterias son las vulnerables a oclusiones por aterosclerosis[18]. Las ACA, por otro lado, son las responsables de irrigar las áreas orbitofrontales de los lóbulos frontales y áreas motoras. Estas son las menos vulnerables a obstrucciones por arteroesclerosis pero es más frecuente la presencia de embolismo cardiaco comparado con infartos de la ACM[19]. En la circulación posterior, las ACP irrigan la parte inferomedial de los lóbulos occipitales y temporales, los pedúnculos cerebrales y el área posterior del cerebelo.

La circulación anterior y posterior están conectadas a través de arterias comunicantes: la arteria comunicante posterior conecta a la ACM con la arteria ACP y las ACA están conectadas entre ellas a través de la arteria comunicante anterior. Esta configuración conocida como polígono de Willis (Figura 1) permite que se iguale el FSC en los dos hemisferios cerebrales y favorece que haya una circulación colateral en caso de que el flujo sanguíneo sea obstruido en alguna de las arterias[17].

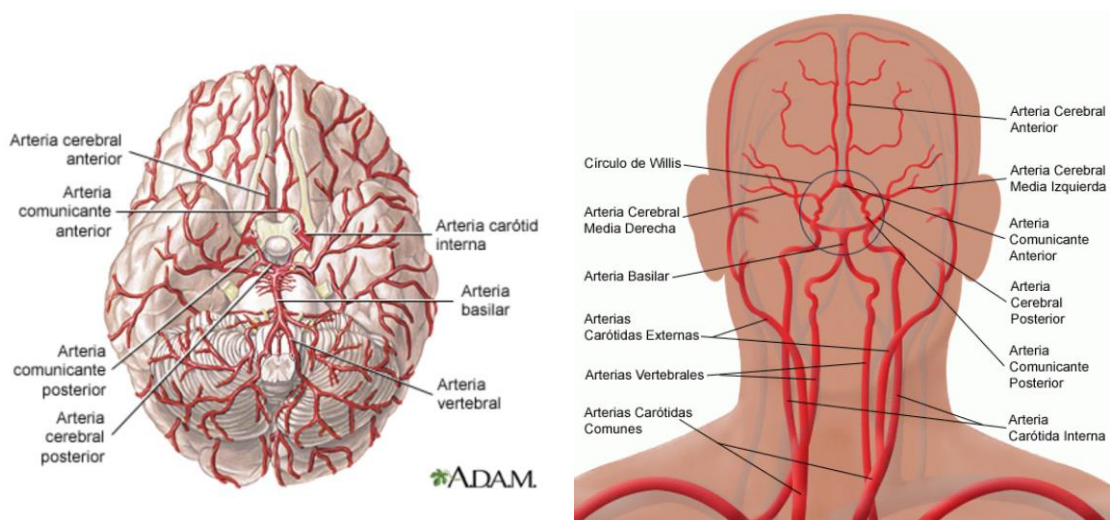


Figura 1: Irrigación Sanguínea Cerebral

2.2 Evento Vascular Cerebral

La Organización Mundial de la Salud (OMS) describe el EVC como “Un síndrome clínico que consiste en el rápido desarrollo de alteraciones focales (o globales en caso de coma) de la función cerebral que dura más de 24 horas o que conduce a una muerte sin otra causa aparente que un origen vascular”[20]. En México es la quinta causa de muerte y es considerada como la principal causa de discapacidad en adultos a nivel mundial debido a las secuelas físicas y cognitivas que ocasiona[5] y también constituye el trastorno neurológico de mayor prevalencia en términos de morbilidad y mortalidad.

Entre los síntomas más comunes de los EVC se encuentran la pérdida súbita de fuerza en brazos, piernas o cara que generalmente se da de forma unilateral, dificultad para hablar o comprender, problemas de visión, pérdida de coordinación, entre otros[21,22]. Existen dos tipos de EVC, el isquémico que representa el 85% de las incidencias y el hemorrágico que representa el 15% restante[23]. Entre los principales factores de riesgo del EVC se encuentran la hipertensión arterial, enfermedades cardíacas, la hiperlipidemia, obesidad, diabetes; el tabaquismo y alcoholismo se asocian a la ocurrencia de eventos hemorrágicos.

El EVC hemorrágico ocurre cuando una de las arterias del cerebro se rompe (Figura 2) y se produce una hemorragia que puede ser subaracnoidea, cuando el evento se da por debajo de las meninges. Este tipo de eventos es el que tiene la mayor tasa de mortalidad de los EVC[23] ya que puede provocar un tipo de isquemia derivado de un vasoespasmio de alguna de las principales arterias de la circulación anterior. Otro tipo de hemorragia que puede presentarse es la intraparenquimal o intracerebral. Esta se da cuando el evento ocurre en una de las arterias dentro del parénquima cerebral[24]. La principal causa de este tipo de eventos es la hipertensión pero también puede darse por malformaciones arteriovenosas o aneurismas.

El EVC isquémico se produce cuando un coágulo obstruye el flujo sanguíneo en una arteria del cerebro (Figura 2) suspendiendo el transporte de oxígeno y nutrientes hacia las neuronas y la eliminación de productos de desecho dando como resultado la muerte celular en la zona donde se haya dado el evento[3]. El tejido aledaño a una obstrucción se clasifica [21] en tres tipos:

- a) Tejido sano: Tejido con una perfusión normal (50-60ml/100g/min).
- b) Penumbra: Tejido que puede ser salvado (12ml/100g/min).
- c) Umbra: Tejido necrosado (<8ml/100g/min).

Durante la oclusión de la arteria, el daño en el tejido en umbra es irreversible mientras que el tejido en penumbra puede ser rescatado si se restablece el flujo sanguíneo.

La obstrucción más frecuente está dada por los materiales trombóticos desprendidos de placa ateromatosa de las carótidas: estos materiales se alojan en la ACM[18]. El cardioembolismo, obstrucción de una arteria cerebral ocasionada por un coágulo originado en el corazón (trombo mural cardíaco) es otra de las causas de isquemia, sin embargo, este evento se da más frecuente en la ACA que en la ACM[19].

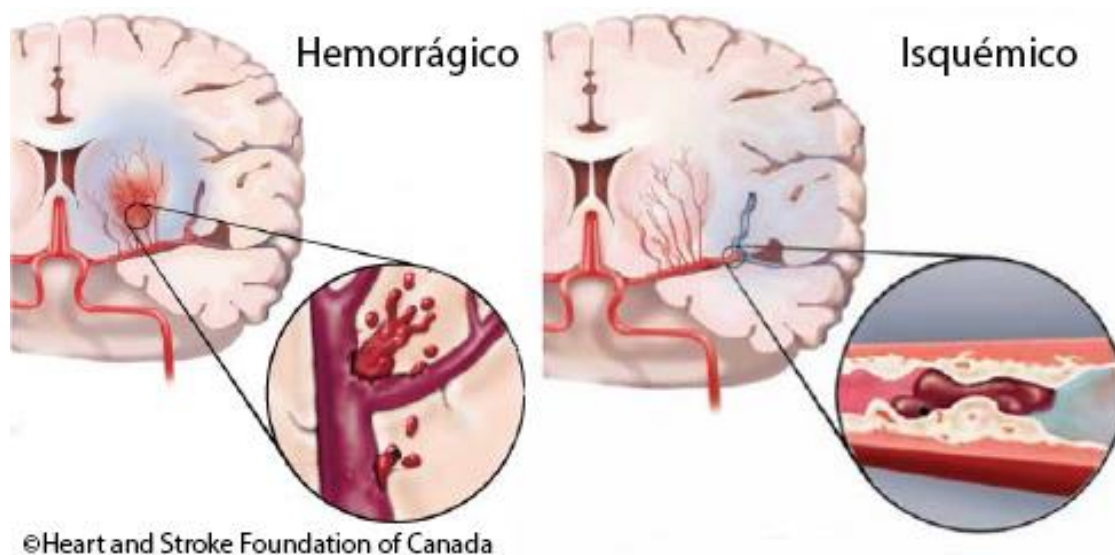


Figura 2: Tipos de EVC.

Izquierda: EVC hemorrágico, una arteria se rompe y la sangre fluye hacia el parénquima cerebral.
Derecha: EVC isquémico, un coágulo obstruye el flujo sanguíneo.

2.3 Tratamientos

Los tratamientos para los EVC isquémicos se enfocan en la restauración oportuna del FSC mediante la remoción del coágulo a través de intervenciones intra-arteriales o mediante intervenciones endovasculares administrando fármacos que propicien la disolución de los coágulos [21]. La recuperación neurológica de los pacientes que cursan un EVC depende de la ventana de tiempo terapéutico, para lograr una alta probabilidad de recuperación se debe actuar dentro de las primeras cuatro horas y media después de la aparición de los síntomas.

El Activador Tisular del Plasminógeno (tPA, por sus siglas en inglés) es el estándar de oro para tratamiento de EVC isquémico[25]. Es una enzima que cataliza la conversión de plasminógeno a plasmina, una enzima que disuelve los coágulos a través de la degradación de fibrina, proteína que contribuye a la formación de los coágulos sanguíneos. Únicamente el 4%[11] de los pacientes pueden ser candidatos a la aplicación de este fármaco, el cuál debe ser administrado dentro de las primeras 4.5 horas de evolución de los síntomas[10] y está contraindicado en pacientes que presenten:

- a) Hemorragia intracraneal
- b) Hemorragia subaracnoidea
- c) NIHSS >25
- d) Tratamiento con anticoagulantes
- e) Conteo plaquetario bajo
- f) Glicemia por debajo < 50mg/dL
- g) Glicemia por arriba > 400 mg/dL
- h) Presión arterial > 185/105 mmHg
- i) Historia de lesión en Sistema Nervioso Central
- j) Retinopatía hemorrágica
- k) Endocarditis
- l) Pericarditis
- m) Pancreatitis aguda

n) Enfermedad hepática severa

Se ha reportado que aproximadamente el 33% de los paciente que recibieron tPA dentro de la ventana de tiempo estipulada se recuperan con prácticamente ninguna secuela después de 3 meses del evento[25].

Otro método utilizado para restaurar el flujo sanguíneo es la remoción del coágulo a través de un procedimiento quirúrgico denominado trombectomía mecánica en el cuál el médico introduce a través de un acceso vascular un sistema Stent, el cual es un mallado que permite absorber el coágulo y extraerlo del cuerpo, sin embargo este método puede ser utilizado en menos del 1% de los pacientes con un EVC isquémico[26].

La estimulación eléctrica del ganglio esfenopalatino ha sido estudiada en diversos modelos y se ha reportado que hay un aumento del flujo sanguíneo sin afectar la presión sanguínea. Este tipo de tratamiento se realiza de forma invasiva colocando electrodos de forma adyacente al ganglio esfenopalatino a través del canal palatino[27].

2.4 Nervio Facial

El nervio facial (VII par craneal) es un nervio que nace del tallo cerebral emitiendo dos fibras: una recorre el lado izquierdo de la cara y la otra el lado derecho (Figura 3). Este nervio es de tipo mixto y está compuesto por fibras parasimpáticas/sensitivas (gusto), supliendo inervación preganglionar en varios ganglios; también cuenta con fibras motoras que controlan los músculos de la cara (expresiones faciales).

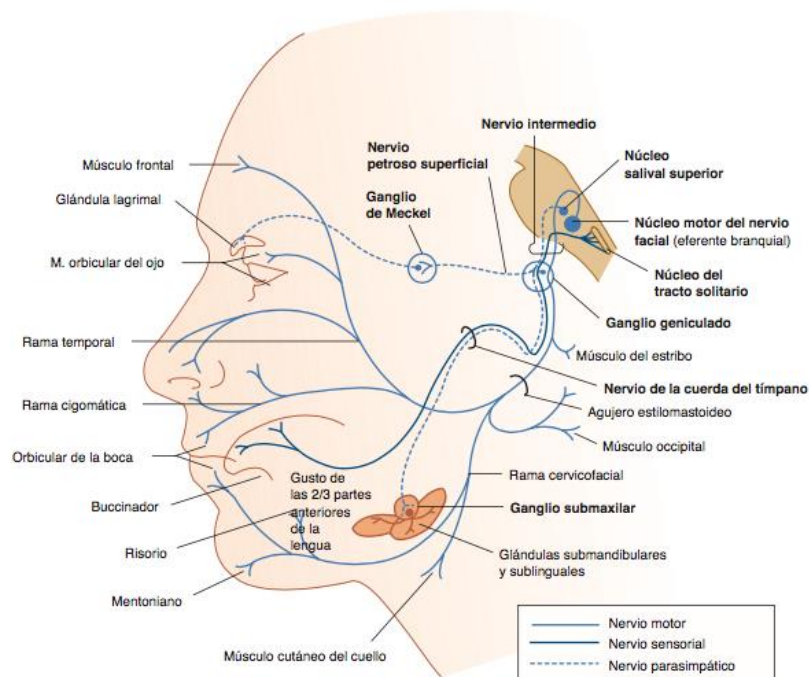


Figura 3: Nervio Facial

Se ha demostrado que el estimular de forma eléctrica el nervio facial favorece el aumento del FSC a través de un efecto de vasodilatación [28, 29], lo cual sugiere que las fibras parasimpáticas están fuertemente relacionadas al estar conectadas con fibras del tronco a través del ganglio geniculado y que después éstas forman los nervios petrosos que inervan los grandes vasos arteriales del cerebro vía el ganglio esfenopalatino.

2.5 Estimulación Magnética

La estimulación magnética (EM) es una técnica no invasiva que actualmente se utiliza de forma clínica para estimular regiones de corteza cerebral (EMT) para modular de forma controlada la actividad neuronal (excitación o inhibición) mediante la inducción de campos magnéticos focales con una magnitud suficiente para generar una corriente eléctrica y provocar la despolarización o hiperpolarización de las neuronas [30]. Se ha mostrado que esta técnica es eficaz en tratamientos de desordenes psiquiátricos (depresión, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de estrés postraumático, etc.), desordenes neurológicos y en otras patologías.

La EM funciona a través de la inducción electromagnética: una corriente eléctrica fluye a través de una bobina y se genera un campo magnético perpendicular a ella. Este efecto fue descrito por Faraday en 1831. El campo magnético generado atraviesa el tejido óseo induciendo a su vez un campo eléctrico que provoca una corriente eléctrica en el tejido cerebral estimulado.

La EMT puede aplicarse como pulsos unitarios o como trenes de pulsos con frecuencias e intensidades variables. La aplicación de espigas o pulsos unitarios provocan la despolarización de las neuronas y permite medir el efecto del estímulo, mientras que los trenes de pulsos pueden modular la excitabilidad de las neuronas dependiendo de la frecuencia de estimulación. Frecuencias bajas ($<1\text{Hz}$) causan un efecto de inhibición de la actividad neuronal, mientras que las frecuencias altas ($>10\text{Hz}$) causan un incremento temporal de la actividad neuronal.

Para lograr una estimulación exitosa, además de la frecuencia e intensidad de estimulación, la geometría de la antena debe ser indicada para la región de estimulación así como de la terapia a aplicar. También debe de considerarse la orientación y el nivel de la antena. Las antenas que actualmente se utilizan en la clínica son la circular y en

forma de 8, siendo ésta última la que presenta un campo más focal como se observa en la Figura 4.

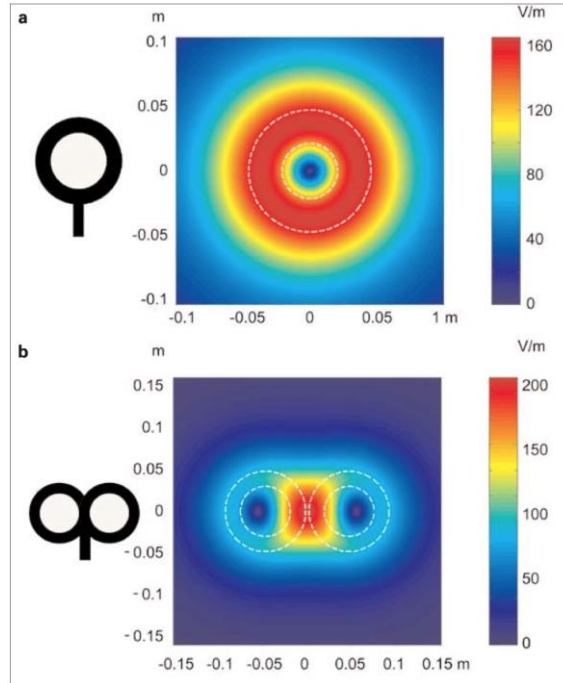


Figura 4: Campos inducidos.
a) Antena circular, b) Antena en forma de 8

Además de aplicar la EM de forma transcraneal, se ha propuesto utilizar esta técnica para estimular el nervio facial como un posible tratamiento para EVC, debido a que se ha mostrado que con esta técnica se puede aumentar el FSC a través de la circulación colateral y vasodilatación [31,32]. Para esta aplicación, se ha diseñado un tipo de antena que optimiza la estimulación del nervio facial, en específico el ganglio geniculado, y a su vez minimiza la interacción con los lóbulos temporales del cerebro.

2.6 Resonancia Magnética

La Imagenología por Resonancia Magnética (IRM) es una técnica de diagnóstico muy potente que nos permite examinar algún tejido mediante el uso de un campo magnético muy intenso y ondas de radiofrecuencia sintonizadas específicamente a la frecuencia de precesión de los spines de hidrógeno, permitiendo obtener imágenes estructurales y funcionales. Actualmente la IRM es el estándar de oro para la evaluación estructural del sistema nervioso central.

Con esta técnica se pueden obtener imágenes con diferentes contrastes llamados T1, T2 o PD que permiten diferenciar la anatomía de un tejido y determinar si es sano o patológico. Estos contrastes se determinan dependiendo del tipo de secuencias de pulsos utilizada (Spin-Echo, Inversion-Recovery, Gradient-Echo) para excitar el sistema de protones de hidrógeno. Es posible también realizar estudios de angiografía mediante RM (aRM) que permiten evaluar la estructura de los vasos sanguíneos y permite detectar oclusiones o aneurismas [33], permitiendo tener una mejor aproximación para el diagnóstico de pacientes que están teniendo un EVC. Dos de las técnicas que brindan mayor información, además de aRM, cuando un paciente está pasando por un EVC son las técnicas de difusión (dRM) y perfusión (pRM) por resonancia magnética. La dRM permite mapear el movimiento Browniano del agua y así determinar el estado del tejido escaneado [34], en este tipo de secuencias se puede ver de forma brillante los procesos de necrosis en EVC debido al edema citotóxico que se genera. pRM permiten detectar regiones en penumbra [35] que pueden ser recuperadas (isquemia reversible). Este tipo de imágenes mapean el paso de un agente de contraste (Gadolinio) generándose una curva que implica una relación hemodinámica entre la señal y el tiempo de paso del medio de contraste (Figura 5).

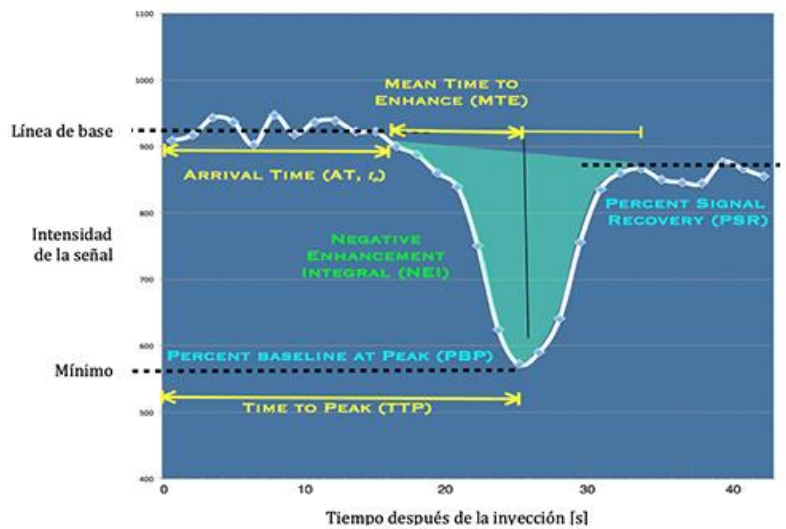


Figura 5: Curva de perfusión

Las mediciones usualmente se realizan en tejido sano y en tejido patológico para poder llevar a cabo las comparaciones de los siguientes parámetros:

- a) Arrival Time (AT, t_0): Tempo de inicio [s] del tránsito del bolo de Gadolinio.
- b) Mean Time to Enhance (MTE): Tiempo medio [s] de tránsito del bolo de Gadolinio.
- c) Time to Peak (TTP): Tiempo que pasa entre AT y el tiempo en el que se alcanza la intensidad de señal mínima generado por el bolo de Gadolinio.
- d) Negative Enhancement Integral (NEI): Integral negativa de la curva que brinda información del volumen [ml/100g] sanguíneo cerebral relativo (rCBV).
- e) Percent Signal Recovery (PSR): Porcentaje de recuperación con relación a la línea de base una vez que ha terminado de transitar el bolo de gadolinio.
- f) Perfusion Index (Pi): Índice que se calcula mediante la proporción de NEI/MTT y que brinda información sobre el rCBV [ml/100g/s].

2.7 Estudios previos

Nuestro equipo de trabajo en el Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica ha realizado diferentes estudios pre-clínicos con diferentes modelos de experimentación, tanto en sujetos sanos como patológicos para evaluar el efecto que tiene la estimulación magnética del nervio facial. Los resultados obtenidos han demostrado que existe un incremento significativo del FSC y hasta el momento no se conoce algún efecto negativo derivado de esta técnica[36].

Modelo en perros con EVC isquémico

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la perfusión en un modelo canino de EVC isquémico agudo mediante la oclusión guiada de la arteria media cerebral. Se utilizaron en total 18 sujetos que fueron divididos en un grupo control (n=6) y un grupo de estimulación (n=11), un sujeto fue excluido. Los resultados obtenidos mostraron una reducción en la zona de penumbra por aumento del FSC causando una mejoría significativa en la perfusión de la región afectada por el EVC [15].

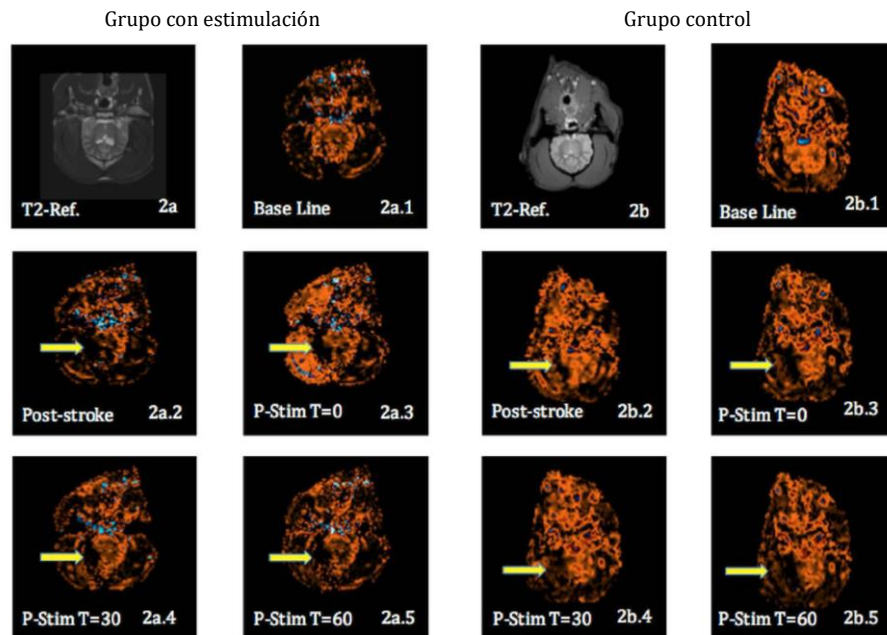


Figura 6: Mapas de índice de perfusión.

Modelo en cerdos sanos

Este fue un estudio exploratorio que tuvo como objetivo entender la relación existente entre la potencia y el tiempo de aplicación de la estimulación magnética del nervio facial para evocar un efecto de incremento en el FSC por dilatación de las arterias cerebrales y después determinar cuál es la configuración óptima que maximiza el incremento del FSC minimizando la potencia y el tiempo de aplicación de la técnica. Este trabajo se desarrolló a través de un diseño factorial 3x3 donde se probaron las combinaciones de tres potencias diferentes (65%, 80% y 95%) y tres tiempos de aplicación (2, 3.5 y 5 minutos). Los resultados obtenidos sugieren que se obtiene una respuesta muy efectiva utilizando una potencia del 65% de la potencia máxima del equipo por dos minutos[37].

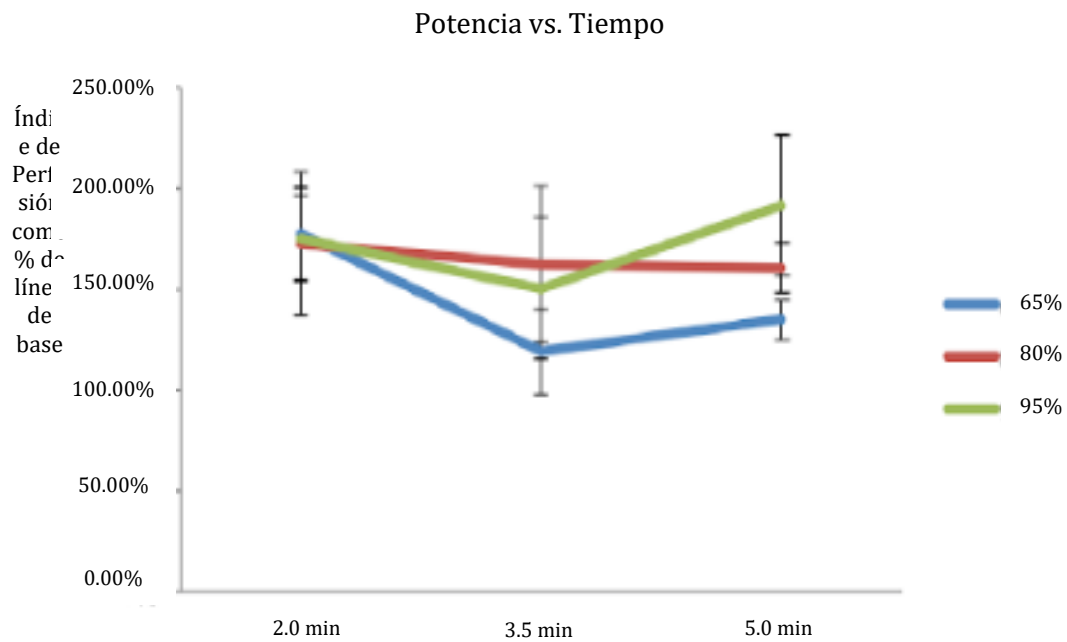


Figura 7: Cambios en el índice de perfusión

3 JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

3.1 Justificación

Actualmente el EVC isquémico representa una de las principales causas de muerte e incapacidad a nivel mundial, siendo un evento súbito en el cuál se tiene una ventana de tiempo corta para que el paciente reciba un tratamiento y las secuelas del evento sean mínimos. Dado esto, se vuelve importante aportar una técnica no invasiva que permita de cierta manera proteger, por aumento de la circulación colateral, el cerebro disminuyendo la zona de penumbra. La finalidad de este estudio es evaluar la efectividad de aplicar una terapia en conjunto de EM, la cuál es no invasiva, y, un tratamiento de tPA, que es el tratamiento estándar para EVC isquémicos. Los resultados de este trabajo servirán como parámetros clave para poder dar paso a una fase de investigación clínica.

3.2 Hipótesis

El uso de la EM favorece el incremento de la perfusión cerebral de al menos el 25% sobre línea basal mediante un efecto de vasodilatación y, aplicada en conjunto con el tPA, no causa eventos adversos que puedan repercutir en la recuperación neurológica derivado de un aumento del tejido isquémico o un aumento en la tasa de mortalidad.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Realizar una comparación del efecto que tiene la terapia de tPA y EM del Ganglio Genuculado en un modelo de infarto cerebral isquémico en conejos.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los tratamientos mediante imágenes de perfusión por RM, evaluación neurológica y análisis histopatológico.
- Comparar los resultados obtenidos contra los reportados en un modelo estandarizado con uso de tPA.
- Evaluar si el uso de ambos tratamientos tiene un beneficio adicional sobre el uso de tPA solo.

5 MÉTODOS

5.1 Sujetos

Se utilizaron 86 conejos que fueron transportados del bioterio al Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica (CI3M) 24 horas antes del experimento. A su arribo se les realizó un examen físico general y se enrolaron de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión:

- Peso entre 2.5 y 3.0 Kg.
- Raza Nueva Zelanda.
- Contar con estudios de laboratorio y certificado de salud.
- Sexo macho
- Etiqueta de identificación en la oreja derecha

Se alojaron en cajas individuales en un cuarto con temperatura entre 18°C y 26°C y humedad relativa entre 40% y 70% [38], tuvieron acceso a alimento comercial (Conejina Purina) y a agua purificada ad libitum. El estado general de los conejos fue evaluado de forma diaria por un médico veterinario zootecnista. El número de animales seleccionado para este estudio fue el menor considerado necesario debido a las características del protocolo y a las limitaciones de los recursos. El protocolo de experimentación fue aprobado por el comité de ética del CI3M y ejecutado bajo las directrices de las Buenas Prácticas de Laboratorio. Al término de la experimentación, todos los animales fueron dispuestos de acuerdo a la normativa aplicable y documentada a través de certificados de incineración.

5.2 Modelo de isquemia por embolización de la AMC

Para este trabajo se utilizó un modelo de infarto cerebral isquémico en conejos por embolización de la ACM propuesto por Zivin et al. y que actualmente es utilizado para valoración de nuevos fármacos en desarrollo [39,40,41]. Los conejos han demostrado ser sensibles al tratamiento con Alteplasa (r-tPA) presentando respuestas similares a la esperada en humanos.

Tratamientos utilizados

Estimulación Magnética

Nombre: VitalFlow Stimulator

Proveedor: Nervive

Condiciones de almacenamiento: Uso en interiores (10°C a 30°)

Vía de administración: Estimulación Magnética del Nervio Facial

Justificación de uso: Este método de estimulación se utilizará para aplicaciones clínicas

Terapia Trombolítica

Nombre: Actilyse® (Alteplasa 50mg)

Concentración: 50 mg/ 50ml

Proveedor: Fármacos Especializados S.A. de C.V.

Condiciones de almacenamiento: Mantenerse en interiores a temperatura menor a 25°C.

Una vez reconstruido, refrigerarse (2°C a 8° hasta por 24 horas)

Vía de administración: 3.3 mg/kg en 30 minutos vía intravenosa utilizando una bomba de infusión.

Justificación de uso: Este método estándar de aplicación en pacientes con EVC isquémico.

5.3 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental factorial de dos factores para observar las posibles combinaciones de las dos terapias utilizadas, obteniendo cuatro grupos:

- EM- / tPA-: Sin tPA y sin respuesta a EM.
- tPA+: Administración de tPA y sin respuesta a EM.
- EM+: Sin administración de tPA y con respuesta a EM
- EM+ / tPA+: Administración de tPA y con respuesta a EM.

Dadas las características del experimento y los conocimientos que se tenían al momento de la experimentación de este trabajo derivados de un estudio piloto donde se mostró que el 50% de los conejos parecían responder a la EM, y además de las consideraciones éticas y las limitaciones de recursos, se decidió aplicar el tratamiento de estimulación magnética a todos los conejos y tomar como grupo control aquellos que no presentaran un aumento en el índice de perfusión (IP) de al menos el 25% sobre línea de base y que no recibiera tPA.

Cada experimento se realizó de la siguiente manera:

1. Inducción y anestesia (Cirugía).
2. Cirugía y fijación de catéteres.
3. Recuperación.
4. Oclusión de la ACM.
5. Evaluación neurológica (Confirmación de lesión).
6. Inducción y anestesia (Aplicación de tratamientos).
7. Resonancia magnética (Línea de base).
8. Aplicación de tratamiento.
9. Resonancia magnética (Post-tratamiento).
10. Recuperación
11. Evaluación neurológica (24 Horas después de la inyección del coágulo).
12. Evaluación neurológica (48 Horas después de la inyección del coágulo)
13. Eutanasia
14. Análisis histopatológico.

Inducción y anestesia

Los conejos fueron anestesiados con isoflurano a través de una mascarilla, 4% en 2 L/min de Oxígeno para la inducción y 1% - 2% de isoflurano en 2L/min - 3 L/min para el mantenimiento anestésico general en estadio III. Se realizó la limpieza y rasurado de la zona ventral del cuello y después fue desinfectado con una solución yodada. Se cubrió con un campo quirúrgico dejando únicamente una ventana lo suficientemente amplia para llevar a cabo el procedimiento quirúrgico.

Cirugía fijación de catéteres

Mediante técnicas estériles y realizando un abordaje quirúrgico en la zona ventral del cuello se expuso la ACC derecha y la bifurcación de la misma (Figura 8.1). La ACE derecha fue ligada (Figura 8.2) utilizando sutura de seda, así como cualquier ramificación visible de la ACI. Se insertó en la ACI un catéter de 5fr lleno con solución salina en dirección hacia la ACM (Figura 8.3), se verificó la permeabilidad de éste y posteriormente fue asegurado con suturas de seda. El mismo procedimiento de exposición fue realizado para la Vena Yugular (VY) derecha (Figura 8.4), en ella se introdujo un catéter de 5fr lleno con solución salina en dirección al corazón (Figura 8.5) y después de haber sido validada la permeabilidad del catéter, éste fue asegurado con suturas de seda. Se verificó que no hubiera hemorragias y se realizó el cierre de la herida quirúrgica (Figura 8.6) alrededor de los catéteres de tal manera que la parte más distal pudiera ser fijada en la parte dorsal del cuello para tener un mejor acceso a ellos.

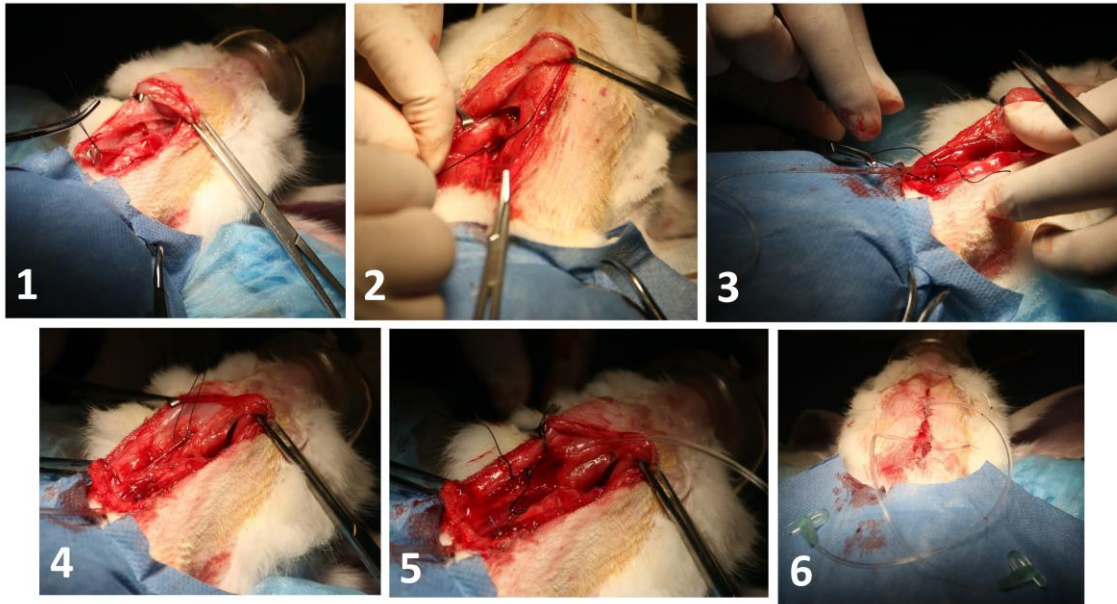


Figura 8: Cirugía y fijación de catéteres.

1.- Exposición de la ACC derecha. 2.- Ligadura de ACE derecha. 3.- Introducción de catéter en la ACI derecha. 4.- Exposición de la VY derecha. 5.- Introducción de catéter en la VY derecha. 6.- Cierre de la herida y fijación de catéteres.

Recuperación post-cirugía

Una vez terminada la cirugía se suspendió la administración de isoflurano y los conejos se dejaron en recuperación por tres horas. Se les realizó un examen general físico y neurológico para asegurar que estaban completamente fuera del efecto anestésico y no presentaban ningún efecto adverso de la cirugía.

Preparación de coágulos

Mediante procedimientos estériles, se tomó una muestra de 5ml de sangre a través de un acceso vascular de la vena auricular central de las orejas de un conejo donador. La muestra se dejó coagular a 37° por 24 horas dentro de una incubadora. Previo a la embolización de la ACM, la sangre coagulada se puso en una solución al 3% de albúmina en buffer fosfato salino (PBS) y fue cortada en pequeños cubos de 3.0 a 4.5 mg utilizando una hoja de bisturí estéril (Anexo 1, Procedimiento para la preparación de coágulos).

Oclusión de la ACM

Previo a la oclusión, los conejos se posicionaron en un sujetador para evitar que se lastimaran al momento de la inyección del coágulo. Se retiró el tapón del catéter arterial y se dejó que hubiera retorno sanguíneo para garantizar su permeabilidad y remover la solución salina. Se colocó uno de los coágulos en el catéter y se inyectó con un volumen de 3ml de solución salina en 45 segundos, teniendo siempre cuidado de que no hubiera aire en la línea arterial. Una embolización exitosa se determinó con la aparición de signos relacionadas a daño cerebral (e.g. nistagmos, lateralización del cuello, etc), estos signos aparecen de 30 a 50 segundos después de la inyección del coágulo. En caso de que el sujeto no mostrara algún signo de infarto o un cambio de comportamiento, se realizaría la inyección de un segundo coágulo. Después de determinar que hubo un cambio en comportamiento o la presencia de signos de daño cerebral, éste se confirmó utilizando una evaluación neurológica. Una vez confirmado el daño, el catéter arterial fue ligado cerca del cuello y sellado con calor utilizando un cautín, teniendo cuidado de no tocar el cuello del sujeto.

Evaluación Neurológica

Se utilizó una Evaluación Neurológica estándar aceptada para la valoración neurológica en modelos de infarto cerebral en territorio de la ACM[42]. Esta evaluación se realizó después de la inyección de coágulo para confirmar el daño y a las 24 y 48 horas después de haber confirmado el daño. (Anexo 2, Evaluación Neurológica).

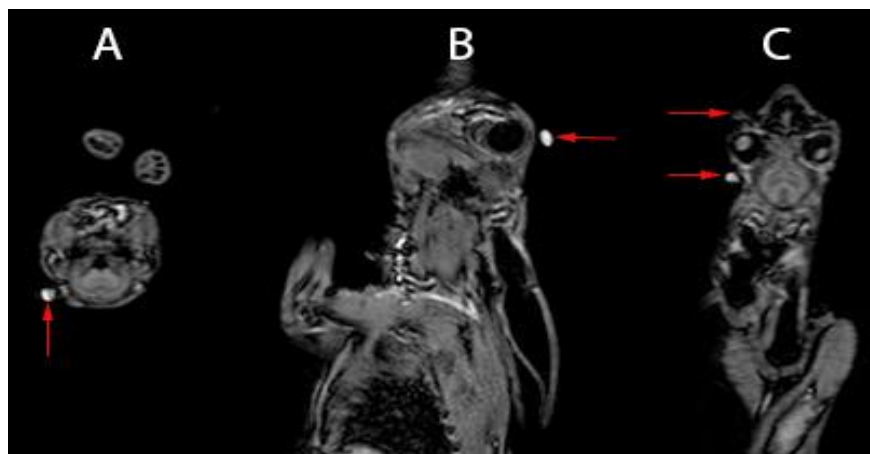
Resonancia Magnética

Los conejos fueron sometidos a una segunda anestesia para la adquisición de imágenes y aplicación de tratamiento, se siguieron los mismos criterios utilizados para la anestesia utilizada para el procedimiento quirúrgico. Se colocaron marcadores fiduciales (perlas de Benzonatato) en las comisuras del ojo derecho y en la frente para ser utilizados como referencias para neuronavegación. Utilizando un equipo de resonancia magnética de 3 Teslas (Philips® Achieva 3.0T, antena 8 Channel SENSE head coil) se adquirieron imágenes 3D ponderadas en T1 y T2 para realizar neuronavegación y localizar el

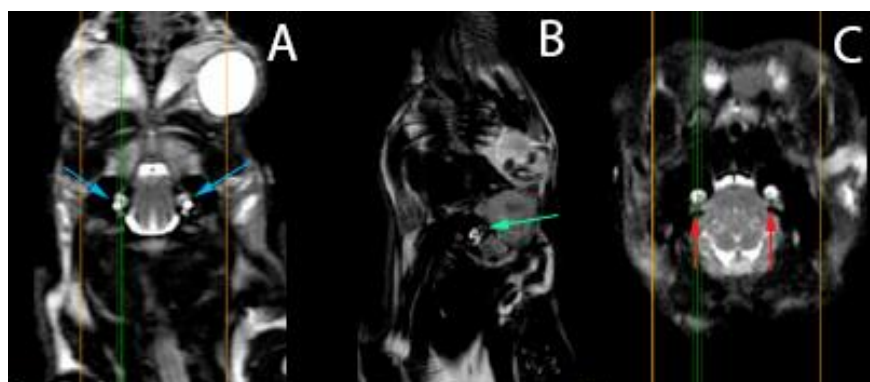
ganglio geniculado, secuencias dinámicas con medio de contraste para comparar la perfusión cerebral de línea de base (después de la confirmación de la lesión) y post-tratamiento (dentro de los primeros 5 minutos después de haberse aplicado).

Neuronavegación

Utilizando las imágenes 3D ponderadas en T1 y los marcadores fiduciales (Figura 10), se realizó un registro digital de imágenes [43] con el modelo físico para poder realizar neuronavegación y utilizando las imágenes 3D ponderadas en T2 se localizó el ganglio geniculado (Figura 9), éste se sitúa anterior a los canales semicirculares y lateral e inferior a la cóclea.



*Figura 9: Localización de marcadores fiduciales.
A) Vista coronal. B) Vista sagital. C) Vista axial.
En las tres vistas los marcadores están apuntados con las flechas rojas*



*Figura 10: Localización del ganglio geniculado.
A) Vista axial, cóclea (flechas azules). B) Vista sagital, canales semicirculares (flecha verde).
C) Vista coronal, nervios vestibulocoléares (flechas rojas).*

Aplicación de tratamientos

Todos los experimentos se realizaron de la misma forma excepto en la aplicación del tratamiento, el cual fue aplicado por un Médico Veterinario Zootecnista y por el responsable de la aplicación de la estimulación dentro de la primera hora de haberse confirmado la lesión. La administración de tPA se determinó de forma aleatoria. Para la administración de tratamientos, todos los conejos fueron colocados dentro de un soporte en posición decúbito lateral izquierdo (Figura 11). Con ayuda de la neuronavegación se posicionó la antena del estimulador apuntando hacia el ganglio geniculado. A través del catéter venoso se conectó la bomba de infusión con la cual se administró el tPA, se utilizó una dosis de 3.3 mg/Kg aplicando un bolo inicial del 20% del total de la dosis y el resto se aplicó con la bomba de infusión durante 30 minutos. Para la aplicación de la estimulación magnética se utilizó una onda bifásica cuadrada con una frecuencia de 10 Hz y una intensidad de 0.9T (45% de la potencia máxima del equipo) durante 2 minutos.

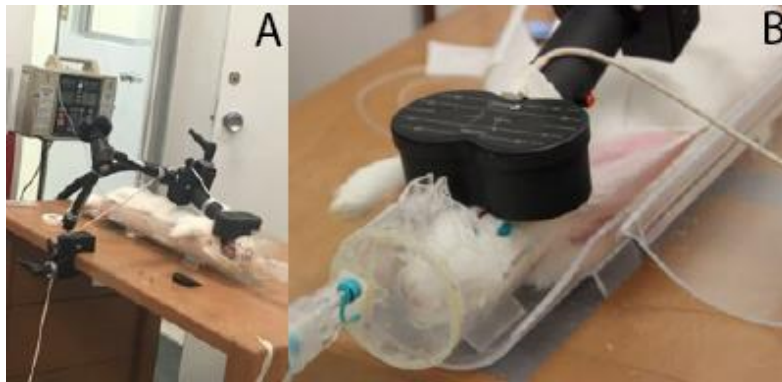


Figura 11: Aplicación de tratamientos.

A) Vista del arreglo completo, bomba de infusión y antena de estimulación.

B) Vista de la posición de la antena de estimulación.

Seguimiento y monitoreo

Después de la administración de los tratamientos, el catéter venoso se ligó cerca del cuello y fue sellado con calor utilizando un cautín, teniendo cuidado de no tocar el cuello del sujeto. Se suspendió el suministro de isoflurano y se dejó al sujeto en una caja con cama sanitaria limpia para que se recuperara de la segunda anestesia. Se tuvieron en observación durante 48 horas, se les realizó una evaluación neurológica a las 24 y 48

horas después de la confirmación del infarto, así como valoraciones físicas. A los conejos que no sobrevivieron las 48 horas se les realizó una necropsia para determinar la causa de muerte.

Extracción de cerebros e histopatología

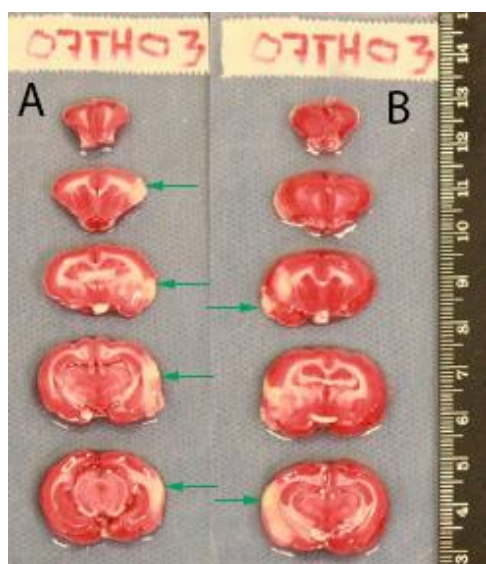
Después de las 48 horas de sobrevivencia, se realizó la eutanasia de los sujetos mediante inyección intracardiaca. El tejido cerebral fue extraído mediante decapitación y separación de los huesos craneales occipitales y parietales teniendo cuidado al realizar los cortes de las meninges, ramas nerviosas y vasculares para evitar dañar el tejido cerebral. Posteriormente fueron colocados en una caja de Petri (Figura 12) previamente acondicionada en baño de hielo y se realizó un enjuague del exceso de sangre empleando solución fisiológica.



Figura 12: Cerebro completo.

Los cerebros fueron puestos en un congelador para que tomaran una consistencia firme sin llegar a la congelación, después se colocaron en una matriz de cortes y con una navaja histológica se realizaron cortes coronales de 3mm de grosor. Cada corte fue transferido a una caja de Petri con 10ml al 2% de Trifenil Tetrazolio (2,3,5-TTC) acondicionado previamente a 37°C en una incubadora y se dejaron incubar durante 15 a 20 minutos dividiendo el tiempo en dos a fin de voltear los tejidos y homogenizar la transferencia de calor. Al término de la incubación se confirmó la coloración rojo

intenso del área del tejido sin daño. Posterior a la incubación cada corte fue colocado de manera secuencial en una placa de acrílico y orientados con la cara posterior/anterior uniformemente identificando en la parte superior de la secuencia el código del sujeto del cual correspondía cada tejido (Figura 13). Una vez colocados los tejidos se alineó una regla graduada de forma paralela a lo largo de la serie de cortes y se capturó fotográficamente la cara anterior y posterior del tejido para llevar a cabo las mediciones del área infartada utilizando el programa ImageJ.



*Figura 13: Cortes histológicos.
A) Cara posterior. B) Cara anterior.
Zona isquémica (flechas verde).*

Las células que son metabólicamente activas convierten el TTC en manchas de color rojo, mientras que las células del tejido isquémico no. Bajo este principio se cuantificó el volumen total y el volumen de la zona isquémica. Una vez fotografiado el tejido, éste fue desechado para su disposición final.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA, $p < 0.05$) con dos factores (Respuesta a EM, tPA) y las variables dependientes consideradas fueron la diferencia* de los puntajes de las evaluaciones neurológicas y la proporción de tejido isquémico reportado en el análisis histopatológico.

Se evaluó el efecto del tPA utilizando una prueba t-student ($p < 0.05$) de dos muestras tomando como variables dependientes el incremento del IP, la diferencia* de los puntajes de las evaluaciones neurológicas y la zona isquémica.

Se realizó una prueba χ^2 ($p < 0.05$) post facto para comparar los resultados reportados por Lyden et. al[40] con los obtenidos en este trabajo.

*Un resultado positivo en el aumento de la diferencia entre las evaluaciones neurológicas (post-infarto – post-48 horas) indica una mejoría neurológica.

Todas las pruebas se realizaron utilizando el Software NCSS Statistical.

6 RESULTADOS

En total se enrolaron 86 conejos: 18 (20.9%) de ellos murieron previo a la administración de tratamientos de los cuales únicamente 2 murieron por complicaciones durante el procedimiento quirúrgico y 2 más murieron por complicaciones durante la recuperación post-anestésica. De los 68 conejos que tuvieron algún tratamiento, 25 (36.8%) murieron dentro de las 48 horas de observación y 2 tuvieron que ser excluidos debido a una falla en la adquisición de las imágenes de perfusión por resonancia magnética. Únicamente 44 (51.1% de los sujetos enrolados) conejos sobrevivieron las 48 horas, lo cual corresponde a una tasa de mortalidad similar a la esperada de acuerdo a las características del modelo experimental. Los 66 conejos que pudieron ser agrupados quedaron distribuidos de la siguiente manera:

Tabla 1: Distribución de conejos

		tPA		Total
		0	1	
Respuesta a EM	0	22	15	37
	1	12	17	29
Total		34	32	66

6.1 Resultados de imágenes de perfusión

Se calculó el promedio del índice de perfusión de cinco rebanadas centrales de la adquisición de línea de base y de la adquisición post-tratamiento. Posteriormente se realizó el cálculo de la proporción de cambio de la perfusión. Este incremento del IP se consideró como variable independiente para agrupar a los conejos, aquellos que tuvieron un incremento de al menos el 25% sobre línea de base se consideraron como sujetos que presentaron una respuesta a la EM. En la Figura 14 se observa un aumento de aproximadamente el 63% en un sujeto perteneciente al grupo que tuvo respuesta a la estimulación y recibió tPA.

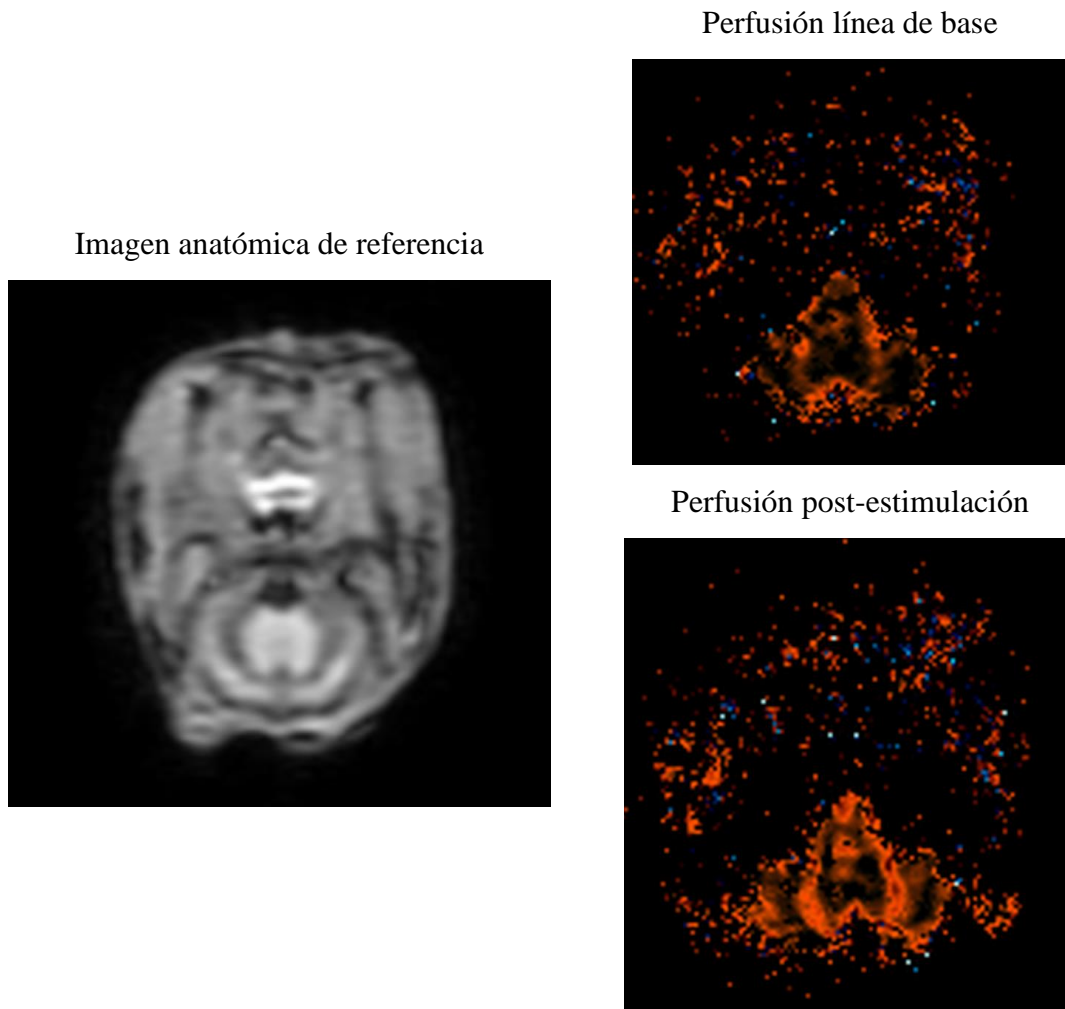


Figura 14: Cambio en el IP debido a la estimulación. Izquierda: Imagen anatómica de referencia. Derecha superior: Mapa de perfusión previo a la estimulación. Derecha inferior: Mapa de perfusión después a la estimulación

6.2 Resultados de las evaluaciones neurológicas

Para la evaluación de la mejoría neurológica, se tomó como variable dependiente la diferencia del puntaje entre la evaluación realizada para la confirmación del infarto y la evaluación realizada 48 horas después de haberse confirmado el infarto. Se realizó una prueba ANOVA de dos factores en la cual no se observa diferencia significativa entre los grupos. Sin embargo se observa una tendencia a una mejora en el puntaje de evaluación neurológica para los grupos que recibieron tPA ($p < 0.07$).

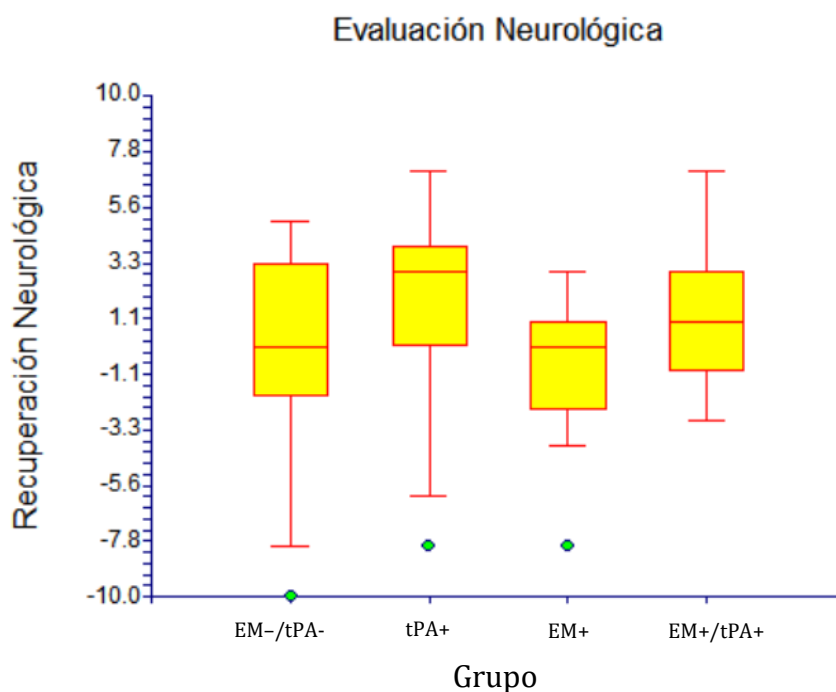


Figura 15: Cambio en el puntaje de la evaluación neurológica

6.3 Resultados del análisis histopatológico

Para la evaluación de la zona de isquemia, se tomaron en consideración los conejos que sobrevivieron 48 horas post-infarto, de los cuales únicamente 9 presentaron un daño significativo. Mediante histopatología por tinción de TTC se cuantificó el volumen total de cinco cortes coronales que se realizó a cada cerebro y también se cuantificó el volumen de la lesión para poder obtener una proporción de la zona isquémica con relación al resto del tejido. Se observó que la mayoría de los sujetos que presentan una lesión se encuentran en el grupo que no respondió a la estimulación y no se le administró tPA. Sin embargo el resultado de la prueba ANOVA no tiene la suficiente fuerza estadística para confirmar este hallazgo ($p > 0.05$).

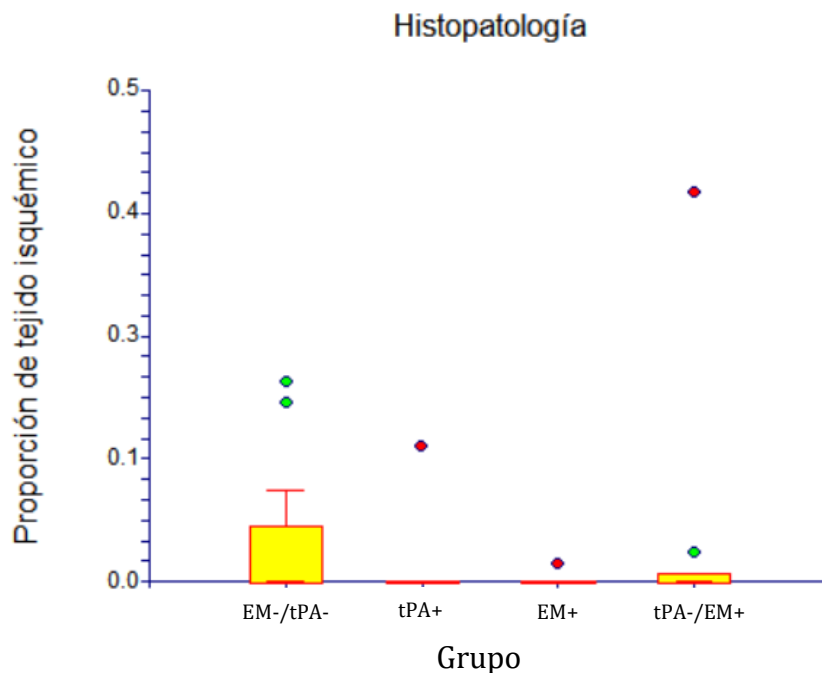


Figura 16: Proporción de tejido infartado

6.4 Resultados del efecto del tPA sobre el IP

Se realizó una prueba t de dos muestras, tomando como variable dependiente el incremento del índice de perfusión y como variable independiente la administración de tPA y se corroboró ($p > 0.05$) que el incremento del IP observado no está determinado por efecto del tPA.

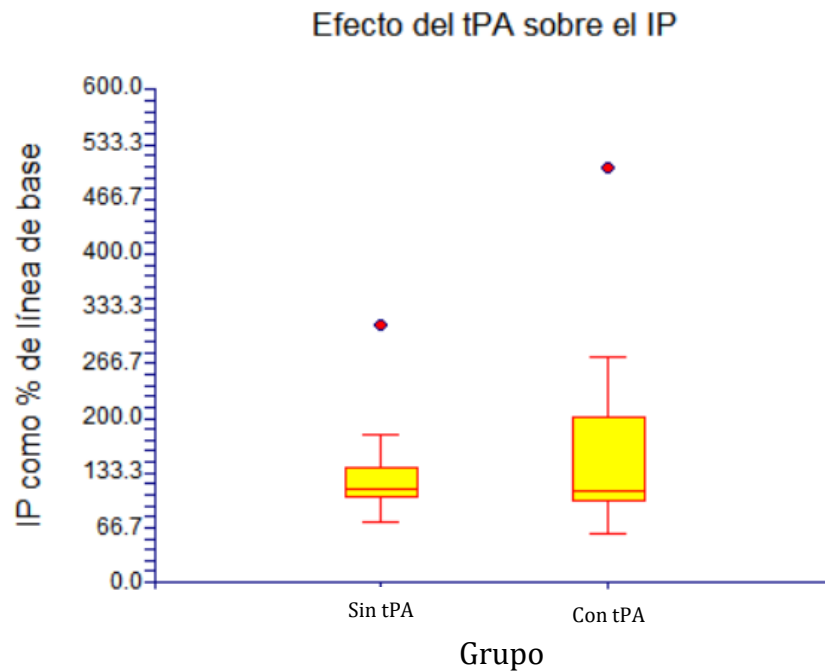


Figura 17: Efecto del tPA sobre el IP

6.5 Resultado del efecto del tPA sobre la recuperación neurológica

Se evaluó el efecto de tPA sobre la recuperación neurológica, tomando (al igual que en la sección 6.2) como variable dependiente la diferencia del puntaje entre la evaluación realizada para la confirmación del infarto y la evaluación realizada 48 horas después de haberse confirmado el infarto. Se realizó una prueba t de dos muestras, tomando como variable independiente la administración de tPA, con esta prueba se determinó ($p < 0.05$) que existe una mejoría en la recuperación neurológica en los sujetos que recibieron tPA.

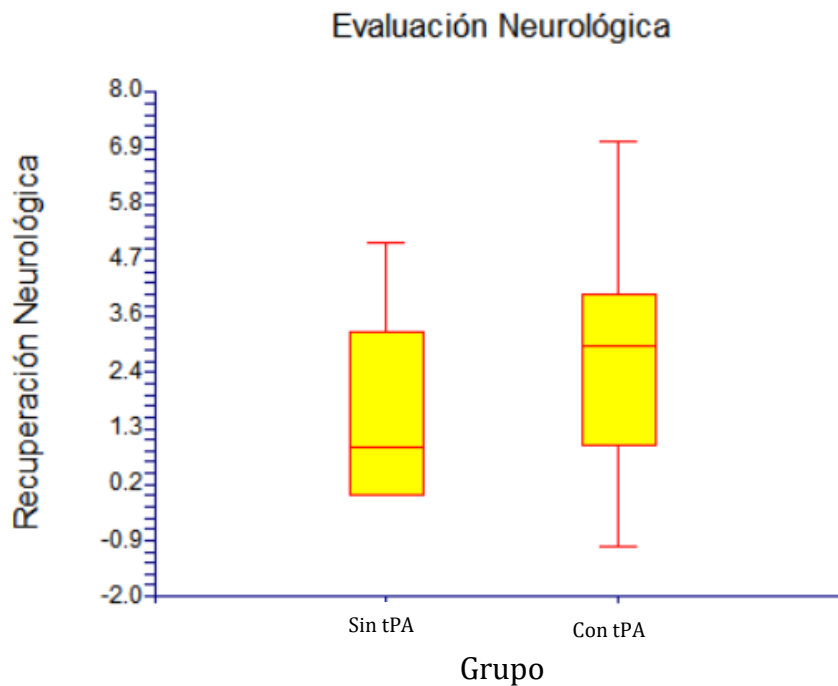


Figura 18: Efecto del tPA sobre la recuperación neurológica

6.6 Resultado del efecto del tPA sobre el análisis histopatológico

Para evaluar el efecto del tPA sobre el tamaño de la zona isquémica, se realizó una prueba t de dos muestras, no se observó cambios significativos entre los grupos.

Se realizó también una prueba χ^2 , tomando como frecuencias observadas las confirmaciones mediante tinción por TTC de tejido isquémico (Tabla 2) y se tomaron como frecuencias esperadas las proporciones reportadas por Lyden et al (Tabla 3)[40], esta prueba sugiere ($p < 0.01$) que hay una disminución en la aparición de zonas isquémicas en nuestros resultados comparados con los de Lyden et. al.

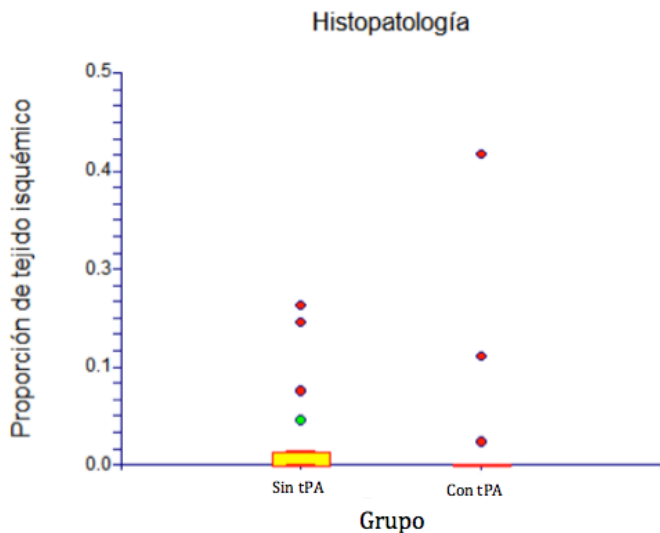


Figura 19: Efecto del tPA sobre el tamaño del tejido isquémico

Tabla 2: Frecuencias observadas

		tPA	
		0	1
Tejido Isquémico	0	72.7%	86.4%
	1	27.3%	13.6%
Total		100.0%	100.0%

Tabla 3: Frecuencias esperadas

		tPA	
		0	1
Tejido Isquémico	0	16.7%	77.8%
	1	83.3%	22.2%
Total		100.0%	100.0%

7 DISCUSIÓN

En este trabajo se propuso encontrar el efecto que tienen la aplicación de EM y tPA sobre el FSC, a nivel neurológico y en el tejido isquémico en un modelo de infarto cerebral en conejos por oclusión de la ACM.

En cuanto al efecto del aumento de la perfusión se observó que el tPA no causa dicha variación y sugiere que la estimulación magnética del ganglio geniculado produce un efecto vasodilatador en las arterias que favorece el aumento de la perfusión. Sin embargo, la administración de tPA sí presenta un efecto en la mejoría neurológica lo cual es congruente con lo reportado en la literatura.

Un análisis *post facto* tomando los datos reportados en la literatura para la evaluación del tPA en un modelo de infarto cerebral isquémico en conejos, mostró que no hay un aumento de la tasa de proporción de aparición de lesiones en los grupos que no tuvieron tPA, siendo la única variante entre los estudio la aplicación de la EM lo cuál sugiere que ambos tratamientos actuaron sinérgicamente en este trabajo.

Dadas las limitaciones en cuanto al número de sujetos que deberían utilizarse para tener un grupo control, la tasa elevada de mortalidad debido a las complejidades del modelo experimental, las consideraciones éticas y la experiencia y conocimiento que se tenía sobre los efectos de la EM del ganglio geniculado al inicio de este trabajo, donde se había reportado que cerca del 50% de los sujetos no respondían a la estimulación[35], se decidió que a todos los sujetos se les aplicaría el tratamiento de EM y se utilizaría el aumento en el índice de perfusión como variable independiente para clasificar a los conejos; aquellos que no tuvieron un incremento mayor al 25% sobre el IP de línea de base fueron considerados como grupo control. Sin embargo, un estudio realizado en sujetos con vasoespasmó [44] a los cuales se les aplicó el tratamiento de EM mostró que el efecto de la estimulación no se observa en la misma ventana de tiempo en todos los sujetos, es decir, algunos presentaron un efecto tardío, pero todos presentaron una

respuesta a la EM. Ante estos resultados nos quedamos con la incógnita: ¿Y si el tiempo de respuesta en que se adquirieron las imágenes de perfusión no fue el óptimo para detectar la respuesta a la EM?

El hecho de que la aplicación de la estimulación magnética se realiza de forma no invasiva, favorece el incremento del FSC y no interacciona de forma negativa con el tPA, sugiere que esta técnica puede ser utilizada en un futuro como un tratamiento oportuno para paciente que están cursando un cuadro de EVC isquémico.

Los resultados obtenidos pueden ser considerados como las bases para mejorar el protocolo y evaluar el efecto que tienen las terapias separadas y en conjunto, repitiendo los experimentos considerando un grupo control que no reciba ningún tipo de tratamiento y ampliando la ventana de tiempo para detectar el incremento en el IP. Estos resultados aportan evidencia para el desarrollo de una terapia a través de estimulación magnética que puede ser usada como tratamiento durante las primeras horas de inicio de un EVC.

Dados los resultados obtenidos y el conocimiento adquirido posterior a la realización de la fase experimental de este trabajo se determinó que hubo un error metodológico al decidir aplicar la EM a todos los sujetos. Esto derivó a que no se pudiera evaluar de forma correcta el efecto que tiene la EM.

Ejecutar este trabajo bajo las directrices de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) permitió obtener la acreditación correspondiente por parte de la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA).

8 CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO

8.1 Conclusiones

Se corroboró que el incremento en el IP no está dado por efecto del tPA pero éste sí favorece la recuperación neurológica. No se encontró diferencia significativa entre los grupos en cuanto al tamaño de las regiones isquémicas.

Se observó una disminución en la tasa de aparición de lesiones isquémicas reportadas en la literatura para el mismo modelo de evaluación del tPA, siendo la única variante la aplicación de EM, lo cual sugiere que el aplicar ambas técnicas en conjunto genera un efecto sinérgico.

Combinar el uso de EM del ganglio geniculado y tPA no mostró ninguna interacción negativa que pudiera repercutir en la mejoría de los sujetos. Tampoco se observó un aumento en la mortalidad. Esto sugiere que el uso de ambos tratamientos ofrece un beneficio adicional sobre el uso de tPA solo.

8.2 Trabajo a futuro

Debido a que el tiempo es un parámetro sumamente importante para observar la respuesta al tratamiento de estimulación magnética, se propone realizar un estudio exploratorio que permita determinar la ventana de tiempo óptima en donde se pueda observar el efecto de la EM sobre incremento de la perfusión en todos los sujetos que reciban el tratamiento. Esta ventana se podrá determinar al realizar mediciones de perfusión por resonancia magnética a los 5, 30 y 60 minutos post-estimulación.

Una vez establecida la ventana de tiempo adecuada para realizar las mediciones de perfusión en la cuál se pueda observar el efecto de la estimulación en todos los sujetos, será necesario realizar unos experimentos siguiendo el protocolo descrito en este trabajo pero considerando un grupo control que no reciba ningún tratamiento para tener un mejor entendimiento del efecto de la EM y poder compararlo con el efecto del tPA.

9 ABREVIATURAS

ACA - Arteria Cerebral Anterior

ACC - Arteria Carótida Común

ACI - Arteria Carótida Interna

ACM – Arteria Cerebral Media

ACP - Arteria Cerebral Posterior

ANOVA – Análisis de la Varianza

aRM - Angiografía por Resonancia Magnética

AV - Arteria Vertebral

dRM - Difusión por Resonancia Magnética

EM – Estimulación Magnética

EMT - Estimulación Magnética Transcraneal

EVC - Evento Vascular Cerebral

FSC - Flujo Sanguíneo Cerebral

IP - Índice de Perfusión

IRM - Imagenología por Resonancia Magnética

pRM - Perfusión por Resonancia Magnética

rCV – Volumen Sanguíneo Cerebral Relativo

tPA – Activador Tisular del Plasminógeno (Tissue Plasminogen Activator)

TTC - Trifenil Tetrazolio

VY – Vena Yugular

10 BIBLIOGRAFÍA

1. INEGI, Mortalidad, <http://www.beta.inegi.org.mx/proyectos/registros/vitales/mortalidad/> Revisado: Viernes 8 de junio de 2018.
2. American Heart Association. Heart disease and stroke statistics-2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014; 129(3):e28–e292.
3. Auriel E. Anatomy and pathophysiology of stroke. En: Bornstein NM, editor. *Stroke guide for clinicians*. Basel: Karger; 2009. p. 1–7.
4. Arauz A, Marquez RJ, Artigas C, Murillo BL, Barinagarrementeria F, Cantú BC. The Mexican Institute of Neurology stroke registry: vascular risk factors, subtypes and long-term prognosis in 4,491 consecutive patients. *Cerebrovasc Dis*. 2010; 29(2):197–98. European Stroke Conference.
5. Cantú BC, Majersik JJ, Sánchez BN, Ruano A, Quiñones G, Arzola J, et al. Hospitalized stroke surveillance in the community of Durango, Mexico: the brain attack surveillance in Durango study. *Stroke*. 2010; 41(5):878-84.
6. A. Shuaib, K. Butcher, A. a Mohammad, M. Saqqur, and D. S. Liebeskind, “Collateral blood vessels in acute ischaemic stroke: a potential therapeutic target,,” *Lancet Neurol.*, vol. 10, pp. 909–21, 2011.
7. Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, et al, DAWN Trial Investigators. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N Engl J Med* 2018;378:11-21. doi:10.1056/NEJMoa1706442
8. Emberson J, Lees KR, Lyden P, et al, Stroke Thrombolysis Trialists’ Collaborative Group. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 2014;384:1929-35. doi:10.1016/S0140-6736(14)60584-5
9. Cloft HJ, Tomsick TA, Kallmes DF, Goldstein JH, Connors JJ. (2002). Assessment of the interventional neuroradiology workforce in the United States: A review of existing data. *American Journal of Neuroradiology* 23: 1700-1705
10. Hacke W, Donnan G, Fieschi C, et al, ATLANTIS Trials Investigators, ECASS Trials Investigators, NINDS rt-PA Study Group Investigators. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* 2004;363:768-74. doi:10.1016/S0140-6736(04)15692-4

11. Barber P., Zhang J., Demchuck A., Hill M., Buchan A. Why are stroke patients excluded from tPA therapy? An analysis of patient eligibility. (2001), *Neurol* 56: 1015-20.
12. Orset C., Haelewyn B., Allan S. et al. Efficacy of Alteplase® in a mouse model of acute ischemic stroke: a retrospective pooled analysis. *PMC Stroke*, 2016 May; 47(5): 1312-1318
13. Lapchak P.A. Translational Stroke Research Using a Rabbit Embolic Stroke Model: A Correlative Analysis Hypothesis for Novel Therapy Development. *Transl. Stroke Re.* 2010 Jun; 11(2): 96-107.
14. Borsody, M. K., Yamada, C., Bielawski, D., Heaton, T., Lyeth, B., Garcia, A., Sacristan, E. (2013). Effect of pulsed magnetic stimulation of the facial nerve on cerebral blood flow. *Brain Res*, 1528, 58-67.
15. Garcia, A., Sacristan, E., Azpiroz, J., & Borsody, M. K. Restored brain perfusion after non-invasive stimulation of the facial nerve in a canine stroke model. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2013, 6599-6602.
16. Hall, J., Guyton, A., Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 12th ed. Saunders. 743-745
17. Waxman, S., Clinical Neuroanatomy. 26th ed. Lange. 163-165
18. Navarro-Orozco D, Sánchez-Manso JC. Neuroanatomy, Middle Cerebral Artery. [Updated 2019 Jan 16]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from:
19. Matos Casano HA, Tadi P, Ciofoaia GA. Anterior Cerebral Artery Stroke. [Updated 2019 Nov 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537333/>
20. [OMS] Hatano S. 1976. Experience from multicentre stroke register: a preliminary report. *Bulletin of the World Health Organisation* 54(5):541-553
21. Ginsberg MD. (1997). The New Language of Cerebral Ischemia. *American Journal of Neuroradiology* 18: 1435-1445.
22. National Collaborating Centre for Chronic Conditions. Stroke: national clinical guideline for diagnosis and initial management of acute stroke and transient ischaemic attack (TIA). London: Royal College of Physicians, 2008.
23. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, et al, American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee^[1] and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2019;139:e56-528. doi:10.1161/CIR.0000000000000659
24. Díez TE, Del Brutto O, Álvarez SJ, Muñoz M, Abiusi G. Classification of the cerebrovascular diseases. *Rev Neurol.* 2001; 33 (5): 455-464.
25. Marler JR, et. al. Early stroke treatment associated with better outcome: the

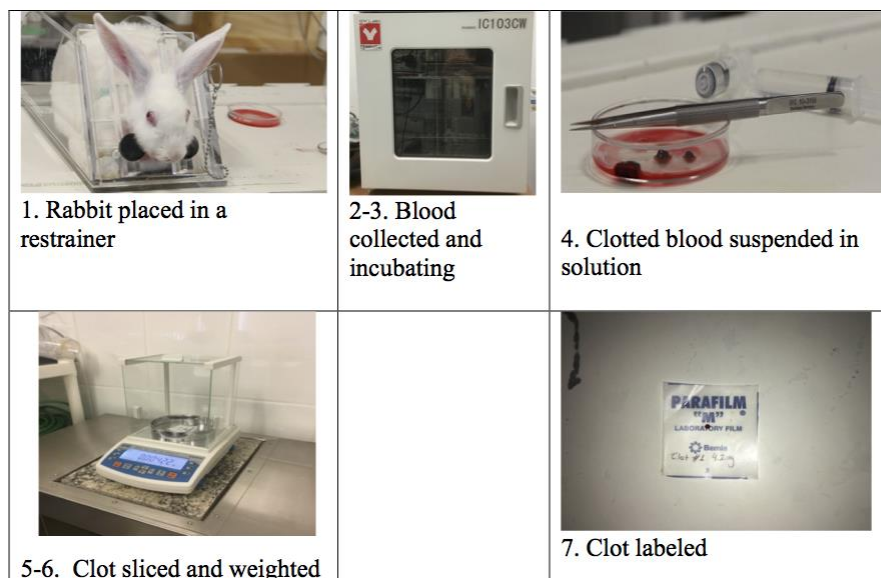
- NINDS rt-PA stroke study. (2000) *Neurology*. Dec 12;55(11):1649-55
26. Brekenfeld, C., Schroth, G., Mordasini, P., Fischer, U., Mono, M., Weck, A., Arnold, M., El-Koussy, M., Gralla, J. Impact of Retrievable Stents on Acute Ischemic Stroke Treatment. (2011) *American Journal of Neuroradiology*.
 27. Khurana D., Kaul S., Bornstein N. M. Implant for Augmentation of Cerebral Blood Flow Trial 1: A Pilot Study Evaluating the Safety and Effectiveness of Ischaemic Stroke System for Treatment of Acute Ischaemic Stroke. *International Journal of Stroke*. Vol. 4, issue 6, pp. 480-485
 28. L. G. D'Alecy and C. J. Rose, "Parasympathetic cholinergic control of cerebral blood flow in dogs," *Circ. Res.*, vol. 41, no. 3, pp. 324–331, Sep. 1977.
 29. I. Sato, Izumi, Karita, "Comparative Effects of Lingual and Facial Nerve Stimulation on Intracranial and Extracranial Vasomotor Responses in Anesthetized Cats," *Tohoku J. Experimental Med.*, vol. 182, no. 2, pp. 103–113, 1997
 30. Kobayashi M., Pascual A. Transcranial magnetic stimulation in neurology. (2003) *Lancet Neurology* 2:145-56.
 31. Salanga, V., Waltz A. Regional cerebral blood flow during stimulation of seventh cranial nerve. (1973) *Stroke* 4(2):213-7.
 32. Goadsby P. Characteristics of facial nerve-elicited cerebral vasodilatation determined using laser Doppler flowmetry. (1992) *Am J Physiol*. 260(1):255-62.
 33. Dumolin, C., Hart, H., Magnetic resonance angiography (1986). *Radiological Society of North America* 161(3).
 34. Hagmann, P., Jonasson, L., Maeder, P., Thiran, J., Wedeen, V., Mueli, R., Understanding Diffusion MR Imaging Techniques: From Scalar Diffusion-weighted Imaging to Diffusion Tensor Imaging and Beyond (2006). *Radiological Society of North America* 28(1).
 35. Essig et al. Perfusion MRI: the five most frequently asked technical questions. *AJR Am J Roentgenol*. 2013, 200:24-34.
 36. Garcia, A., Castro-Prado, F., Perez, M., Lara-Estrada, R., Sanchez, O., Ramirez, M., Godinez, M., Coco, M., Azpiroz, J., Borsody, M., Sacristan, E. (2016). Facial Nerve Stimulation in Healthy Human Subjects. *HI-POCT*, 138-141
 37. Sánchez O.C., Sacristan E., Azpiroz J., Borsody M.K. (2015) Best Parameters for Magnetic Stimulation of the Facial Nerve to Improve Cerebral Blood Flow. In: Braidot A., Hadad A. (eds) *VI Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2014*, Paraná, Argentina 29, 30 & 31 October 2014. *IFMBE Proceedings*, vol 49. Springer, Cham
 38. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
 39. Zivin J.A., Fisher M., DeGirolami U., Hemenway C., Stashak J. Tissue Plasminogen Activator Reduces Neurological Damage After Cerebral Embolism.

- (1985) *Science*, (230) 1289-1291
40. Lyden, P. D., Zivin, J. A., Clark, W. A., Madden, K., Sasse, K. C., Mazzarella, V. A., Press, G. A. (1989). Tissue plasminogen activator-mediated thrombolysis of cerebral emboli and its effect on hemorrhagic infarction in rabbits. *Neurology*, 39(5), 703-708.
 41. Lapchak, P.A., 2002a. Development of thrombolytic therapy for stroke: a perspective. *Expert Opin. Investig. Drugs* 11, 1623–1632.
 42. Brown A, Wood A, Skinner R, Hatton J, Lowery J , Robertson P, Hennings L, Culp WC. (2013) “Neurological Assessment Scores in Rabbit Embolic stroke models” *The open neurology journal* 7, 38-43.
 43. R. Lara, F. Maldonado, J. Azpiroz, et al. 2013. “Técnica de neuronavegación para ubicación exacta y precisa de estructuras cerebrales a partir de imágenes generadas por resonancia magnética”, XXXVI Congreso Nacional de Ingeniería biomédica, CNIB 2013.
 44. San-Juan D., Zenteno M.A., Trinidad D., Meza F., Borsody M., Godinez M., Martinez M., Castro F., Sacristan E. A Pilot Study of Facial Nerve Stimulation on Cerebral Artery Vasospasm in Subarachnoid Hemorrhage Patients. *IEEE Journal of Translational Engineering in Health and Medicine*. 2019 (7): 1-7.

ANEXO A.
PREPARACIÓN DE COÁGULO

Quick guide to prepare a blood clot to be use in an embolization generation model of stroke in rabbit by means of an established procedure.

1. Place a donor rabbit in a restrainer.
2. Collect 5ml of whole blood form the donor rabbit's ear vein under sterile procedure.
3. Allow blood to clot incubated at 37°C for 24 hours
4. Suspend the clotted blood in a solution of 3% bovine albumin (BSA) in phosphate buffered saline (PBS).
5. Slice the clotted blood into solid small cube clots using a sterile scalpel.
6. Weight each cube using an analytical balance.
7. Label and Suspend cube clots weighting 3.0 – 4.5mg in saline solution and store at room temperature.



References:

1. Lyden, P. D., Zivin, J. A., Clark, W. A., Madden, K., Sasse, K. C., Mazzealla, V. A., . . . Press, G. A. (1989). Tissue plasminogen activator-mediated thrombolysis of cerebral emboli and its effect on hemorrhagic infarction in rabbits. *Neurology*, 39(5), 703-708.
2. Lapchak, P.A., 2002a. Development of thrombolytic therapy for stroke: a perspective. *Expert Opin. Investig. Drugs* 11, 1623–1632.
3. Lapchak, P. A. (2010a). A new embolus injection method to evaluate intracerebral hemorrhage in New Zealand white rabbits. *Brain Res*, 1349, 129-136.

ANEXO B.
ESCALA NEUROLÓGICA

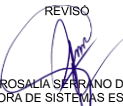
Test	Clinical Criteria	Score	Potential Score	Correlative R Values to %IV
Behavior	Neck Twist	0-normal, 1-twist of the neck	1	.396
Reflex	Righting Reflex	0-right in 1 sec, 1-right in 5 sec, 2-not right in 5 sec	2	.458
Stimuli Reflex	Extension Reflex (fore-paws) ^a	0-right in 1 sec, 1-right in 5 sec, 2-not right in 5 sec	2	.368
Stimuli Reflex	Extension Reflex (hind-paws) ^a	0- right in 1 sec, 1-right in 5 sec, 2-not right in 5 sec	2	.278
Posture	Posture	0-normal resistance to contralateral push, 1-reduced resistance to lateral push, 2-falls down on contralateral side	2	.337
	Death	Maximum Score with death	10	--
Total Cumulative Score Possible			10	

^aThe paws are gently pulled toward the body, the time to re-extend the paw is scored

**RESPUESTA NEUROVASCULAR
 A TRATAMIENTO DE
 ACTIVADOR TISULAR DEL
 PLASMINOGENÓGENO Y
 ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA
 DEL GANGLIO GENICULADO EN
 UN MODELO DE INFARTO
 CEREBRAL ISQUÉMICO EN
 CONEJOS.**




MARTIN RAMIREZ MEZA
 ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
 DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 26 del mes de marzo del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. LUIS JIMENEZ ANGELES
 DRA. NOHRA ELSY BELTRAN VARGAS
 DR. JOSE JOAQUIN AZPIROZ LEEHAN

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: MARTIN RAMIREZ MEZA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI


DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE


DR. LUIS JIMENEZ ANGELES

VOCAL


DRA. NOHRA ELSY BELTRAN VARGAS

SECRETARIO


DR. JOSE JOAQUIN AZPIROZ LEEHAN

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella