



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
CURSO DE ESPECIALIZACION EN NEUROLOGIA  
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIRUGIA  
"MANUEL VELASCO SUAREZ"

*Callosotomia Anterior Mediante Radiocirugia Estereotáctica En El  
Modelo De Epilepsia Kindling En Ratas: Efectos Electro-  
Conductuales E Histológicos A Diferentes Dosis*

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TITULO DE:

**NEUROCIRUJANO**

**PRESENTA:**

**DR. RICARDO FERNANDO V.  
DÍAZ ROMERO PAZ**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA  
“MANUEL VELASCO SUÁREZ”**

---

**Dra Teresa Corona  
Directora de Enseñanza  
INN “MVS”**

---

**Dr. Sergio Gómes-Llata Andrade  
Subdirector de Neurocirugía  
INN “MVS”**

---

**Dr. Carlos Paz Tres  
Jefe Depto. De Neurofisiología  
Tutor de la tesis**

## **TESIS DE NEUROCIRUGÍA**

**TITULO:**

***Callosotomía Anterior Mediante Radiocirugía Estereotáctica En El Modelo  
De Epilepsia Kindling En Ratas: Efectos Electro-Conductuales E  
Histológicos A Diferentes Dosis***

**AUTOR:**

**Dr. Ricardo Díaz Romero Paz**

**INSTITUCION:**

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

**TUTOR:**

Dr. Carlos Paz Tres

**COAUTORES:**

Dr. Miguel Ángel Celis  
Jefe de la Unidad de Radioneurocirugía INNN "MVS"

Dr. Daniel Rembao Bojorquez  
Jefe del Departamento de Neuropatología, INNN "MVS"

*A mi wawa querida, mi vida, pronto estarás con nosotros*  
*A mi esposa por su infinita ternura*  
*A mi madre por ser el ejemplo que ilumina mi camino*  
*A mi padre por todo su apoyo y amor*  
*A toda mi familia por su inmensa esperanza*  
*A esta gran institución que me brindo esta oportunidad inigualable*  
*A todos mis maestros de Neurocirugía*  
*A mis compañeros residentes*  
*A mi añorada Bolivia*

## INDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>7</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>15</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b>	<b>17</b>
<b>6. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>18</b>
<b>7. METODOLOGÍA</b>	<b>19</b>
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>25</b>
<b>9. DISCUSION</b>	<b>35</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>40</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>41</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>46</b>

## 1. RESUMEN

La callosotomía anterior es un procedimiento quirúrgico efectivo, que en pacientes bien seleccionados disminuye la frecuencia de crisis epilépticas en un 70 a 80%. Pendl et al., utilizaron radiocirugía estereotáctica para la ablación del tercio anterior de cuerpo calloso en tres pacientes, con resultados similares a los observados en la callosotomía “abierta”. Sin embargo, esto no ha sido sustentado por estudios experimentales que definan la dosis efectiva para interrumpir la actividad epiléptica sin causar lesiones adyacentes. El modelo de epilepsia kindling se caracteriza por la propagación de la actividad focal epiléptica al hemisferio contralateral, lo que resulta ideal para demostrar los efectos de la interrupción del cuerpo calloso en la epilepsia. El objetivo de este estudio fue determinar los cambios conductuales, eléctricos e histológicos de la callosotomía anterior mediante radiocirugía estereotáctica en el modelo Kindling para epilepsia en ratas. Se realizó un estudio experimental en ratas, aleatorizado y controlado, con 3 grupos (n=21); 1) Control sin tratamiento, 2) Callosotomía por radiocirugía con dosis de 40 Gy y 3) con dosis de 80 Gy. Procedimiento. 1º Desarrollo de Modelo Kindling en ratas. 2º Radiocirugía estereotáctica. 3º Seguimiento de 4 meses. Resultados En el grupo de 40 Gy fue evidente una disminución de intensidad de las convulsiones, y una reducción del Tiempo de Posdescarga, asociado a mínimos cambios histológicos, mientras que con la dosis de 80 Gy los cambios conductuales, electrocorticográficos, e histológicos fueron más evidentes. Conclusión. Ambas dosis fueron efectivas para disminuir intensidad de las convulsiones, aunque con latencias y hallazgos histológicos diferentes.

## 2. MARCO TEÓRICO.

**El modelo de Kindling.** Es el modelo más utilizado para estudiar la epileptogénesis en la actualidad, y nos permite estudiar las crisis parciales, (límbicas), así como las generalizadas<sup>1, 2, 3, 4</sup>. Se puede inducir con estímulos subconvulsivos a través de un electrodo bipolar implantado en una estructura límbica, generalmente la amígdala, y mediante la estimulación diaria, con lo que se provoca cambios conductuales y electrocorticográficos durante el estímulo<sup>5</sup>. Los cambios conductuales se dividen en 5 estados de acuerdo a la escala descrita por Racine<sup>6</sup> y son; Estado 1) Mioclonías faciales, parpadeo y movimientos masticatorios; 2) Movimientos oscilatorios de la cabeza; 3) Movimientos mioclónicos de extremidades anteriores, 4) Movimientos mioclónicos de extremidades posteriores; 5) Pérdida del control de la postura, y crisis tónico-clónicas generalizadas. Con este modelo se producen cambios estructurales y funcionales en el sistema nervioso central en especial a nivel hipocampal, caracterizados por pérdida neuronal, gliosis, neurogénesis, y proliferación de ramificaciones de fibras musgosas, etc<sup>3</sup>.

Se han descrito cambios electroconductuales en animales con el modelo Kindling de epilepsia, sometidos a sección parcial o completa del cuerpo calloso, Los resultados obtenidos describen una modificación de las crisis generalizadas establecidas, al modo lateralizado y asimétrico, con hemiconvulsiones contralaterales, y con una disminución del Tiempo de Posdescarga (TPD), estos estudios sugieren que el cuerpo calloso juego un rol fundamental en la propagación interhemisférica del impulso epileptogénico<sup>7, 8, 9, 10, 11, 12</sup>.

La **callosotomía anterior** por medios quirúrgicos convencionales, ha sido estudiada experimentalmente, y en la actualidad es un procedimiento plenamente aceptado en la práctica clínica, demostrando una disminución de la frecuencia y severidad de las crisis en un 70 a 80%, particularmente en los casos de caídas recurrentes y traumas frecuentes en pacientes con epilepsia refractaria<sup>13, 14, 15, 16, 17</sup>. A pesar de tener una morbi-mortalidad baja, se han reportado complicaciones en relación con el abordaje microquirúrgico (sangrado, infección, lesión vascular, hematomas posoperatorios, etc)<sup>17</sup>.

La **radiocirugía estereotáctica** se define como la administración precisa y terapéuticamente efectiva de una dosis única de radiación, a un blanco determinado por estudio imagen, la utilización del término radiocirugía enfatiza el principio quirúrgico del procedimiento<sup>18</sup>.

La creciente aplicación de procedimientos de radiocirugía en epilepsia han hecho que se realice investigación respecto a su aplicación en cuanto a su capacidad para suprimir el foco epiléptico, como es el caso de epilepsia del lóbulo temporal, de los cuales existen estudios experimentales en animales<sup>19, 20, 21</sup> y su aplicación clínica en pacientes con epilepsia de lóbulo temporal<sup>22, 23</sup>, sin embargo esto contrasta con la escasez de investigación en lo que respecta a su potencial uso en la interrupción de las vías de propagación de la actividad epiléptica, como es el fundamento de la callosotomía anterior.

**Radiobiología.** Los cambios histológicos en el tejido nervioso secundarios a la radioterapia han sido bien caracterizados y dependen de la dosis y el volumen radiado.

La respuesta a la radiación tiende a ser mayor en la sustancia blanca, y existe una latencia en su efecto relacionado con la dosis. Los cambios histológicos posterior a la radiocirugía estereotáctica han sido descritos en diferentes especies animales y en humanos. Existe una variabilidad importante en los hallazgos histológicos, esto probablemente justificado por los diferentes blancos utilizados, diferentes especies de animales, y finalmente de las distintas modalidades de radiación empleadas (Acelerador Lineal LINAC, Gamma knife, etc.)<sup>24,18</sup>. Se considera que el tiempo de latencia de aparición de cambios histológicos en ratas tras la administración de una dosis determinada de radiación es considerablemente menor que en humanos, siendo estos evidentes en este último generalmente a partir del 6º mes, a diferencia de las ratas cuyos efectos son visibles a partir del segundo mes, dependiendo de la dosis <sup>24, 18</sup>. El tiempo de aparición de los cambios histológicos es variable, se han descrito cambios hiperagudos posradiocirugía (horas) en ratas utilizando como blanco el núcleo caudado y el putamen, encontrando dilatación capilar y positividad aumentada de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) con dosis de 100 Gy a las 3 horas de la administración de la misma y desarrollo de lesión necrótica circunscrita posterior a los 90 días <sup>25</sup>. En otro estudio se encontró el marcador ácido desoxirribonucleico fraccionado (*DNAf*) en el hipocampo de la rata a las 5 horas de la irradiación estereotáctica con una dosis de 2Gy, sugiriendo que incluso dosis tan bajas pueden tener un efecto neurotóxico hiperagudo <sup>21</sup>. Se ha evidenciado muerte celular no necrótica (apoptosis) en la zona subependimaria, cuerpo calloso, la zona proliferativa subgranular y giro dentado de cerebro de la rata adulta, esto a las pocas horas de una dosis tan baja como 0.5 Gy <sup>26</sup>.

Se han descrito cambios agudos (menos de una semana) bioquímicos e histológicos en los cerebros de ratas sometidas a radiación con Gamma Knife <sup>25</sup> y con acelerador lineal (LINAC) <sup>27</sup>.

También se han estudiado los efectos con un mayor tiempo de seguimiento, como en la investigación en la cual se aplicó radiocirugía al ventrículo lateral en gatos, con dosis de 35Gy, observando que a los 7 meses la mayoría de los animales desarrollaban inflamación y astrocitosis reactiva en el blanco, mientras que en un caso se encontró proliferación vascular <sup>28</sup>.

En otro estudio experimental en animales, se encontró que con dosis de 60Gy a no existían cambios histológicos a los 90 días, mientras que con 80Gy se halló engrosamiento arteriolar moderado, con 100Gy se reportó en un caso necrosis, y hemorragias, y finalmente con dosis de 150Gy presencia de cavitación en el blanco <sup>29</sup>.

Otras investigaciones señalan que la irradiación de la sustancia blanca frontal en gatos a diferentes dosis, con dosis de 50Gy no provocó lesiones microscópicamente visibles a los 6 meses, mientras que con dosis de 75 Gy fue evidente la proliferación vascular y reacción glial, con cambios en la membrana basal observados mediante microscopia electrónica, finalmente con dosis de más de 100Gy se desarrolló necrosis de coagulación bien demarcada <sup>30</sup>.

En general las dosis altas (más de 150Gy) producen desmielinización, microhemorragias, astrocitosis y necrosis <sup>31</sup>. Las principales investigaciones en radiocirugía se resumen en el siguiente cuadro:

## HALLAZGOS HISTOLÓGICOS EN RADIOCIRUGÍA

AUTORES	DOSIS Gy	BLANCO	TÉCNICA	MODELO ANIMAL	FINALIDAD	RESULTADOS Dosis aproximadas a la tesis
<i>Heschat-Leavitt 1987 (28)</i>	35	Ventrículo lateral derecho	LINAC 6Mev, portal cuadrado de 1.5 x 1.5 cm	Gato No 6	RM hasta los 8 meses a intervalos de 4 a 6 semanas y su correlación histológica(H-E, lugol fast blue y PAS	2 especímenes desarrollaron cambios imagen e histológicos. <b>1ro : a los 7 meses hiperintensidad en T2 correspondió con inflamación, desmielinización y astrocitosis reactiva.</b> <b>2do: a 8 meses T2 señal sust subcortical, y reforzamiento con gadolinio. HP CC necrosis, proliferación vascular* radionecrosis</b>
<i>Lunsford et al., 1990 (31)</i>	150	n. caudado, tálamo y puente. TC y IRM	Gamma Knife, 201 colimador de 8 mm, duración de tto 31.5 a 42 min.	Mono No : 3	Cambios de RM, histológicos. Seguimiento 24 semanas(2) y 6 sem, en un caso	1..Caudado 6s, áreas focales de desmielinización, microhemorragias astrocitosis. 2 Tálamo, 3 puente, 24s necrosis, astrocitosis, edema
<i>Lo 1991 (32)</i>	15-30 GyE	Cerebro no se especifica.	Bragg peak Helium 20 x 10 mm	Conejo No 16	Cambios de RM e histológicos de 8 a 20 meses	15 Gy sin cambios en RM, PET. <b>30 Gy : cambios a los 9-11 meses, en T2 aumento de señal sust. Blanca, T1 con gadolinio reforzamiento local, PET ruptura e BHE, se correlaciono con; edema desmielinización, astrocitosis reactiva, vasos sanguíneos dilatados</b>

RM Resonancia magnética

PET Tomografía por emisión de positrones

BHE Barrera Hemotoencefálica

### HALLAZGOS HISTOLÓGICOS EN RADIOCIRUGÍA

AUTORES	DOSIS Gy	BLANCO	TÉCNICA	MODELO ANIMAL	FINALIDAD	RESULTADOS Dosis aproximadas a la tesis
<i>Kondziolka</i> 1992 (29)	30-200	Lóbulo frontal, isocentro putamen de 5.4 x 5 mm, isodosis 50%	GK 201 .colimador de 4mm. Blanco. Objeto de metal para localización Stx del blanco	Ratas. No : 30 total 275 a 300g S-D 18 2 ratas por dosis. 12 : estudio de latencia con dosis de 200Gy de 1 a 60 dias	Cambios histopatológicos a los 90 días. Latencia de cambios HP a dosis fija de 200 Gy	<b>60 Gy; Sin cambios patológicos (H-E) con dosis menor</b> <b>70; 2rat encogimiento neuronal.</b> <b>80; engrosamiento arteriolar moder.</b> 100; 1 rat=Degeneración endotelial, astrocitosis. Extravasación proteica 1rat; necrosis 4 mm. Mayor de 150 Necrosis, cavitación y astrocitosis, edema, microhemorragias perilesional(2mm). 200Gy 1 a 7 dias normal, 14 dias edema, 21 dias necrosis , 30 a 60 mayor volumen de necrosis
<i>Blatt, 1994</i> (33)	125	Brazo anterior de cápsula interna derecha, coordenadas del atlas STx	LINAC 8Mev Colimador de 10 mm, 84% linea isodosis	Gatos No19 2.4 a 5.2 Kg	Características temporales de lesiones por radiocirugía RM de 6 a 69 semanas. HP cambios temporales, H-E y luxol fase blur para mielina	Dosis 125Gy en semanas: 3.5 s necrosis temprana, hemorragias puntiformes, trombosis 6 s edema, necrosis, pequeña cavitación. 12s Cavitación , hipervascularidad, edema. 18 s + hemorragias. 23s cavitacion demarcada menos edema, hemorragias. 29 s Hemorragias, hemosiderina. 63s astrocitosis leve, sin hemor.
<i>Spiegelmann</i> 1993 (30)		Frontal sustancia blanca	LINAC colimador de 1 cm(der) y de 0.5 cm (izq.) linea de isodosis 84%	Gatos : No15. peso 2 a 4 Kg	Cambios HP (H-E luxol fase blue) y de RM a los 6 meses a diferentes dosis de 50 a 150 Gy	<b>50Gy(2) macros no era apreciable lesión</b> <b>75. Realce con tinción con azul de Evans demarcada( proliferación vascular, reacción glial ), centro descoloración rojiza( HP hemorragia aguda o crónica)</b> 100 + macro pequeña area blaquicina ( necrosis de coagulación) bien demarcada

H-E Tinción Hematoxilina-Eosina    LINAC Acelerador Lineal

## HALLAZGOS HISTOLÓGICOS EN RADIOCIRUGÍA

AUTORES	DOSIS Gy	BLANCO	TÉCNICA	MODELO ANIMAL	FINALIDAD	RESULTADOS Dosis aproximadas a la tesis
<i>Yang 2000</i> (44)	100	Caudado y putamen volumen de 0.034 cc	GK, colimador de 4 mm marco de diseño propio, RM localización de target, duración de tratamiento 30 min	Ratas No 71 peso 180 a 200 g. 45 divididas en 9 grupos experimentales y 26 controles	Definir efectos hiperagudos de la radiación y la reacción astrocítica temporalmente	<b>3 horas</b> dilatación capilar. GFAP en CC. <b>6h</b> ;cel. Reactivas a GFAP aumentan en el blanco. <b>12 a 24hrs</b> hiperplasia endotelial, astrocitos hipertróficos especialmente en CC. <b>3 a 7 días</b> , astrocitos hipertróficos en blanco y areas corticales, primer pico de GFAP. <b>14 a 30 días</b> 2do pico de GFAP, astrocitos polimorfos y puntos de hemorragias en el blanco. <b>90 días; lesión necrótica circunscrita de 4 mm, tejido periférico células inmuno reactivas</b>
<i>Kamiryo 2001</i> (15)	75	Corteza Parietal	GK colimador de 4 mm	Rata	Microscopía electrónica a las 3.5 meses, foco vascular	Disminución de la vascularidad, incremento en el diámetro capilar, cambios en la membrana basal preceden al vascular
<i>Karger 2002</i> (16)	26-50	Corteza parietal	LINAC colimador de 3 mm	Rata	RM a los 15, 17 y 20 meses	Reforzamiento con gadolinio 15 semanas a partir de 50 Gy y 19 semanas luego de 40 Gy

GK Gamma Knife

GFAP Proteína ácida glial fibrilar

CC Cuerpo Caloso

**Callosotomía mediante radiocirugía.** Dentro de las pocas investigaciones al respecto se encuentra el estudio experimental de Gaffey et al., quien evaluó la capacidad de seccionar las vías comisurales en gatos “split brain”, probando la eficiencia de la bomba de Helio para interrumpir la transmisión interhemisférica a nivel del cuerpo calloso, por lo que evaluaron el tiempo-dosis para abolir el potencial de acción transcalloso, iniciado eléctricamente, y concluyeron que la radiación necesaria para suprimir la conducción interhemisférica es de 10 krads (100Gy) con bomba Helio 910 MeV., mientras que con dosis mayores de 20 krads se producía indefectiblemente daño vascular importante<sup>37</sup>. El único estudio publicado en pacientes, fue realizado por Pendl et al., quienes radiaron estereotácticamente el tercio anterior del cuerpo calloso de tres pacientes con dosis máximas de 150Gy, con lo cual lograron una disminución de la frecuencia de crisis en un 70 a 80% (equiparables a la callosotomía “abierta”). Este estudio sugirió que la callosotomía anterior mediante radiocirugía estereotáctica podría ser una alternativa promisoría en casos seleccionados, aunque se plantearon muchas interrogantes aún no resueltas<sup>38</sup>.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen pocos trabajos publicados sobre radiocirugía en epilepsia en modelos animales, sin embargo hay un resurgimiento en este campo, resultado del desarrollo de estudios de imagen de mayor resolución, que a su vez permiten una localización de un blanco específico. En el INNN" MVS" actualmente se cuenta con la tecnología necesaria para poder realizar trabajos de investigación de esta índole.

Algunos aspectos, que permanecen poco claros para la radiocirugía en el tratamiento de la epilepsia, es la determinación de la dosis a administrar (necrotizante vs no-necrotizante). Los métodos de localización para la epilepsia no asociada a lesiones, así como el volumen necesario del blanco para la radiación y la evolución esperada a corto y largo plazo han sido poco estudiadas. Se desconoce el tipo de efecto a nivel tisular, necesario para interrumpir la propagación de las crisis. Algunos grupos han usados dosis bajas (10 a 20 Gy), con lo cual se esperarían cambios tisulares mínimos o incluso ninguno. Otros grupos han propuesto el uso de dosis tan altas como 100 Gy, que eventualmente producen necrosis en el blanco y por lo tanto una interrupción estructural del impulso epileptogénico.

Para tratar de responder a algunas interrogantes consideramos determinar la dosis ideal y los efectos morfológicos de la radiocirugía en un modelo animal de epilepsia y valorar la posibilidad de de extrapolar estos resultados a una aplicación clínica.

## **4. OBJETIVOS.**

### **GENERAL.**

- Determinar los efectos conductuales, electrocorticográficos e histológicos de la callosotomía anterior mediante radiocirugía estereotáctica a diferentes dosis, (40 y 80 Gy), utilizando el modelo de epilepsia Kindling en ratas Wistar.

### **ESPECIFICOS.**

- Determinar el efecto de la callosotomía anterior mediante radiocirugía estereotáctica en:
  1. Los estados conductuales de Racine, en el número de caídas y en la simetría de las crisis, tras la estimulación eléctrica en el modelo Kindling.
  2. En la electrocorticografía a través del Tiempo de Posdescarga (TPD).
  3. Los cambios histológicos (desmielinización, astrocitosis, edema o necrosis) producidos a diferentes dosis
  4. Determinar si estos cambios son dosis dependiente.

## 5. HIPÓTESIS

**H1** La callosotomía anterior mediante radiocirugía estereotáctica produce cambios en el modelo de epilepsia Kindling en ratas:

- Conductuales: modificando al patrón de las crisis generalizadas con patrón simétrico, a patrón asimétrico, y/o evitando la generalización de la crisis y disminuyendo su severidad (menor número de caídas durante la crisis).
- Eléctricos; disminución del Tiempo de Posdescarga en el hemisferio contralateral
- Los cambios electroconductuales e histológicos son dosis dependiente.

**H0** La callosotomía anterior mediante radiocirugía estereotáctica no produce cambios electroconductuales ni histológicos en el modelo Kindling de epilepsia en ratas, ni tampoco existen diferencias dosis dependiente.

## 6. JUSTIFICACIÓN

Esta investigación pretendió ser pionera en el análisis de los resultados del tratamiento mediante callosotomía anterior utilizando radiocirugía en modelos animales de epilepsia generalizada ya que existe únicamente el reporte de tres casos publicados con resultados interesantes, pero sin un sustento científico en modelos animales experimentales. Existen datos que sugieren que se puede interrumpir la transmisión y propagación de la descarga epileptogénica a dosis “subnecróticas”, igualmente no existen investigación cuyos hallazgos histopatológicos se correlacionen con los efectos electro-conductuales en este ámbito.

Existe un vacío de información en cuanto a las dosis que se debieran utilizarse especialmente en lo que respecta callosotomía anterior mediante radiocirugía, que es lo que se pretende aportar también con este estudio.

Consideramos necesario tener datos propios del tipo de sistema que se cuenta en el INNN para radiocirugía, es decir con acelerador lineal (LINAC), ya que la gran mayoría de series publicadas utilizan al Gamma Knife tanto para trabajos experimentales como tratamiento de pacientes con epilepsia focal.

Con los datos generados, se proveerá de un sustento científico para su potencial uso en el campo de la radiocirugía aplicada al tratamiento de la epilepsia, siendo esta una técnica de mínima invasión y con probables menores complicaciones en pacientes bien seleccionados, y de esta manera esperamos tener un impacto en la calidad de vida de este amplio grupo de pacientes.

## 7. METODOLOGÍA

### DISEÑO.

Estudio experimental en animales, aleatorizado y controlado.

### Animales

Se utilizaron Ratas macho cepa Wistar (n=21) con peso de 270 a 310 g, criadas y mantenidas en condiciones ambientales controladas (temperatura 20 a 23°C ciclos de luz oscuridad de 12/12 horas). Los procedimientos fueron aprobados y realizados de acuerdo a normas del Comité de Bioética institucional.

### Tamaño de muestra.

Se utilizó el cálculo de tamaño de muestra para comparación de dos muestras apareadas. Variable de respuesta principal Tiempo Posdescarga (TPD) en el hemisferio contralateral al estímulo.

- Diferencia considerada significativa  $\mu_1 - \mu_0 = 30s$
- Desviación estándar de TPD  $\sigma = 15$
- Valor z de una cola con un  $\alpha$  de 0.01 = 2.326
- Valor z cola inferior  $\beta$  de 0.10 = 1.28

$$n = 2 \frac{[(Z_{\alpha} + Z_{\beta})\sigma]^2}{[\mu_1 - \mu_0]} \quad n = 2 \frac{[(2.326 + 1.28)15]^2}{30} = 6.5 = 7 \text{ ratas}$$

## **MEDICIONES.**

### **VARIABLE INDEPENDIENTE**

#### **Callosotomía anterior mediante radiocirugía estereotáctica**

Medición Nominal Dicotómica

Definición conceptual. Lesión de cuerpo caloso mediante la administración de una dosis de radiación por medio de técnica estereotáctica (*Paxinos*)<sup>39</sup>

Definición operacional. Radiación dirigida a los 2/3 anteriores del cuerpo caloso en las coordenadas estereotácticas de 9.7 mm rostral a línea interaural, 3.8 mm de profundidad ( bregma) y sobre la línea media, con un colimador de 6 mm.

Instrumento. Acelerador Lineal LINAC

### **VARIABLES DEPENDIENTES O DE RESPUESTA**

**Estadios de Racine.** Medición ordinal

Definición conceptual. Cambios conductuales en respuesta a un estímulo eléctrico subconvulsivo ubicado en la amígdala.

Definición operacional Estado conductual según los 5 estados de Racine.

**Tiempo de Posdescarga** Medición numérica continua

Definición conceptual. Duración de la descarga epiléptica secundaria a la estimulación eléctrica de la amígdala, registrada mediante un polígrafo

Definición operacional. Tiempo en segundos desde el inicio de la descarga en espigas hasta el cese de la misma en el registro EEG del hemisferio contralateral al estímulo convulsivo. Instrumento. Registro del polígrafo Grass

**Cambios Histológicos.** Medición ordinal.

Definición conceptual. Cambios microscópicos en la estructura celular y extracelular secundarios a la radiación, evidenciado mediante técnicas especiales de tinción y de inmunohistoquímica

Definición operacional Cuantificación de las alteraciones histológicas mediante 4 grados: ausentes, leve, moderado o severo. Instrumento técnicas de tinción, microscopía óptica.

## **PROCEDIMIENTO.**

**Desarrollo de Modelo Kindling en ratas.** Se seleccionaron a los animales de acuerdo a los criterios de la muestra, los cuales fueron sometidos a cuidados previos (7 días) en el bioterio del laboratorio del departamento de neurofisiología del INNN"MV". Se anestesiaron con ketamina intraperitoneal a dosis de 100 mg/Kg, y posteriormente se colocaron en el marco estereotáctico David Kopf, exponiendo el vértex del cráneo para la implantación de los electrodos bipolares en el núcleo amigdalino basolateral izquierdo para la estimulación y el registro de las descargas locales de acuerdo a las siguientes coordenadas; Anterior 6.2, Lateral 5.0, Altura 1.5. Otro segundo electrodo fue colocado en la corteza sensitivo-motora derecha para el registro de crisis generalizadas. Los electrodos fueron colocados utilizando el Atlas estereotáctico de Paxinos y Watson siguiendo la línea interaural como puntos de referencia. Se manufacturaron los electrodos entrelazando dos alambres de acero inoxidable cubiertos con teflón, con excepción de las puntas. Los electrodos fueron asegurados al cráneo con un miniconector hecho de acrílico dental.

Una vez finalizado el procedimiento, las ratas pasaron a jaulas individuales con una estrecha vigilancia de su recuperación.

Posterior a la cirugía y tras un periodo de recuperación de 7 días, se inició la estimulación diaria de la amígdala basolateral izquierda, colocando a los animales en una cámara a prueba de sonido y donde se unió un miniconector al polígrafo Grass mediante cables flexibles.

Los parámetros de estimulación fueron dados inicialmente con un pulso rectangular de 60Hz por un segundo (1ms y 20  $\mu$ A) con una intensidad de 5V, con incrementos diarios de 1 V hasta obtener una posdescarga del núcleo amigdalino, y posteriormente hasta obtener crisis generalizadas (Estado V).

**Asignación de Grupo.** Una vez que las ratas alcanzaron el Estado V de Racine, fueron asignadas de forma aleatoria en 3 grupos; 1) Grupo control, no se aplicó ninguna maniobra (n = 7), 2) Grupo callosotomía por radiocirugía con dosis de 40 Gy (n = 7) 3) Grupo callosotomía por radiocirugía con dosis de 80 Gy, (n= 7).

**Callosotomía anterior mediante Radiocirugía estereotáctica.** Para este procedimiento, se anestesió a los animales con Ketamina intraperitoneal con dosis de 100mg/kg y se fijaron mediante barras a nivel del conducto auditivo externo a un dispositivo especial para ratas mismo que se adaptó a su vez al marco estereotático o caja de localización BrainLAB. Se procede a la obtención de imagen mediante Tomografía helicoidal Computarizada (General Electric Systems) con cortes coronal, sagital y axial, de 1mm de espesor, para localización del blanco.

Posteriormente se pasa a la unidad de radiocirugía para la aplicación de las dosis seleccionadas bajo la supervisión del físico médico de la unidad de la radiocirugía, mediante el software comercial (BrainScan 5.31) adaptado al acelerador lineal NOVALIS 6 MeV.

El blanco fue seleccionado de forma de abarcar los 2/3 anteriores del cuerpo calloso según las siguientes coordenadas; Anterior 9.7 mm (rostral a línea interaural), 3.8 mm de altura (bregma) y 0 en el lateral, según el atlas estereotáctico de cerebro de la rata, incluyendo la dosis (de 40 o 80 Gy según el grupo) en el 90% de la línea de isodosis, mediante 9 de arcos circulares con un colimador de 6 mm. Luego de la radiocirugía se vigiló la recuperación anestésica de las ratas en sus jaulas individuales.

**Seguimiento.** Después de una semana de recuperación de la radiocirugía, se continuo el Kindling con la estimulación de la amígdala con los parámetros previamente mencionados de forma semanal hasta cumplir 16 semanas en promedio, en cada estimulación semanal se evaluaron los siguientes parámetros; 1) Conductuales basados en los criterios de Racine y poniendo especial atención en lateralización o asimetría de las crisis convulsivas o número de caídas del animal (pérdidas de postura), y 2) Las diferencias Electrofisiológicas mediante registro electroencefalográfico (corteza sensitivomotora), en donde se analizó el Tiempo de Posdescarga (TPD) en ambos hemisferios y la asimetría.

**Análisis Histológico.** Finalizado el tiempo de seguimiento, se sacrificaron a los animales mediante perfusión intracardiaca con solución salina, seguida de infusión de paraformaldehído al 4%, posteriormente se extrajo cerebro almacenándolo en paraformaldehído al 4%, y se realizaron cortes coronales de 1 $\mu$  de espesor para el

análisis histológico, tanto para la confirmación de la posición del electrodo de estimulación, como para evaluar las características de las lesiones en el blanco radioquirúrgico. Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina-Eosína y Kluver-Barrera, esta última para identificar las lesiones de las fibras comisurales blancas de la porción anterior del cuerpo calloso, se incluyó Análisis inmunohistoquímico con Proteína ácida glial fibrilar (GFAP), y Proteína básica de Mielina (MBP), P53 descritos en el Anexo Histopatología. La valoración histológica fue llevada a cabo por un Neuropatólogo, con cegamiento respecto al grupo al que pertenecían las ratas.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se realizará estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión para variables numéricas, en caso de que las variables tenga homogeneidad de varianzas y una distribución normal (pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov), se aplicarán pruebas paramétricas, de lo contrario pruebas no paramétricas, considerando una  $P$  significativa  $<0.05$  con intervalos de confianza de 95%. Los datos se analizarán con el paquete estadístico SPSS versión 11. Para los Estados de Racine con nivel de medición ordinal, se aplicó Prueba de Friedman para muestras relacionadas.

Para la comparación de medias de más de los tres grupos se utilizó prueba de análisis de varianza de una vía, con prueba Pos Hoc de Tukey.

Para la variable TPD posradiocirugía, para la comparación de muestras relacionadas con más de dos mediciones y con variables dependientes con medición de tipo escalar; análisis de varianza para medidas repetidas, y para la variación intrasujetos e intersujetos, mediante análisis Post Hoc de LSD, Bonferroni.

## 8. RESULTADOS

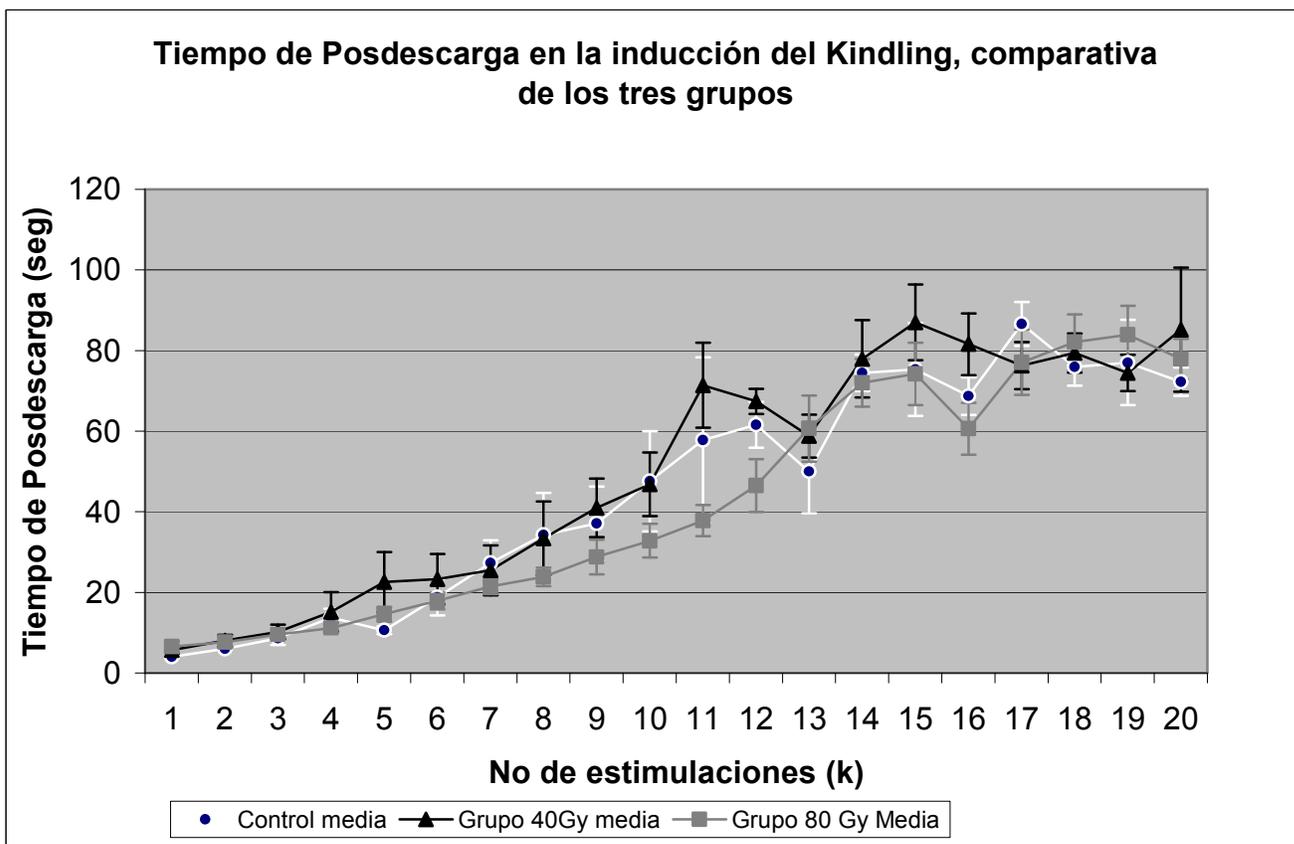
**Desarrollo del modelo de epilepsia Kindling en ratas.** En la fase del desarrollo del Kindling, los 3 grupos presentaron cambios conductuales de acuerdo a lo referido por Racine, así como un aumento progresivo en el TPD hasta alcanzar crisis generalizadas (Estado V) caracterizadas por múltiples caídas y relajación de esfínteres. **Ver Gráfica No 1.**

**Cambios conductuales en los Estados de Racine.** Si bien los 3 grupos presentaron los estados conductuales de Racine y se mantuvieron sin modificaciones (en Estado V) hasta el 3° mes, a partir de 13° semana de estimulación, se evidenció en tres ratas del Grupo que recibieron una dosis 80 Gy, una regresión al Estado IV o III de Racine hasta el final de seguimiento. De la misma forma en el grupo que recibieron una dosis de 40Gy, dos ratas regresionaron a un estado conductual de IV y III de Racine a partir de la 15° semana de estimulación, mientras que las ratas del grupo control se mantuvieron en el Estado V de Racine hasta el final del seguimiento. **Ver Gráfica No 2.**

En cuanto a las caídas, los primeros meses de seguimiento no existieron diferencias evidentes entre el control y los grupos de callosotomía anterior mediante radiocirugía estereotáctica a diferentes dosis, sin embargo los últimos dos meses y particularmente en el último mes de estimulación Kindling se constató una disminución significativa en el número de caídas (pérdida de postura) tanto en el grupo con dosis de 40 Gy como en el que recibió 80 Gy en comparación al grupo control. **Ver Gráfico No 3**

## RESULTADOS

### GRÁFICOS



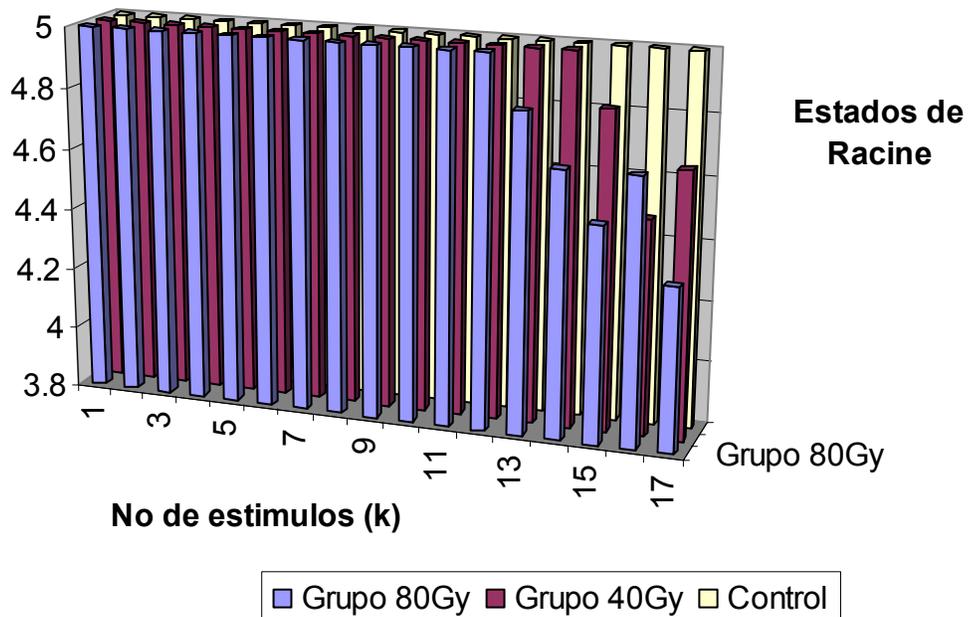
**Gráfica No1.** Desarrollo del Kindling semanal con el promedio de Tiempo de Posdescarga (TPD), desde la primera estimulación (k1) hasta el desarrollo de 10 estados V de Racine consecutivos. Comparación de los tres grupos en la fase de desarrollo de Kindling, con error estándar correspondiente. No existieron diferencias durante la fase del desarrollo del modelo de kindling entre los tres grupos ( $F = 1.895$ ,  $P = 0.193$ )

**Cambios en el Tiempo de Posdescarga (TPD).** Se demostró diferencias en el TPD mismas que se acentuaron el último mes de estimulación (k) con una tendencia a la disminución en los grupos que recibieron radiocirugía

En cuanto al grupo control el tiempo de posdescarga se mantuvo si tendencia ni al descenso ni ascenso, sin embargo el que recibió dosis de 40 Gy presentó un aumento transitorio del TPD hasta la novena semana con una posterior tendencia discreta a la disminución hasta el final de seguimiento, por el contrario en el grupo de 80 Gy, a partir de la 12<sup>o</sup> semana se evidenció un disminución del TPD significativa y constante hasta la última semana. **Ver Gráfica No 4 y 5**

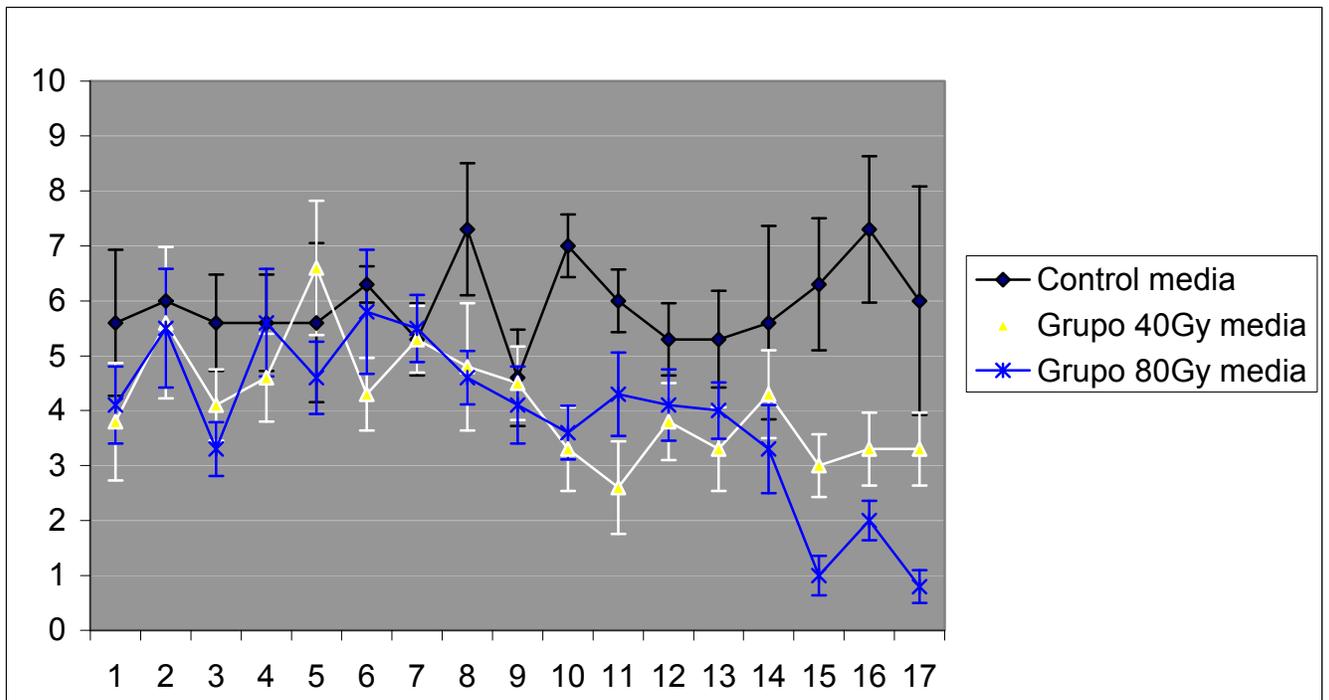
**Hallazgos histológicos** La histología se realizó en la mayoría de los especímenes, en cuanto al grupo control no existieron cambios, y se comprobó la posición adecuada de la punta de electrodo bipolar a nivel de núcleo amigdalino basolateral izquierdo. En el grupo de 40 Gy se observaron cambios mínimos a nivel vascular con engrosamiento arteriolar y dilatación de algunos vasos capilares, en algunos una reacción astrocítica leve, y áreas desmielinización leve a nivel de cuerpo caloso. En cuanto al grupo de 80 Gy los hallazgos fueron más evidentes, con dilatación vascular, engrosamiento arterial, áreas de desmielinización, y de reacción astrocítica importante a nivel del blanco y en zonas aledañas, así como alteraciones de la morfología de estructuras cerebrales como dilatación importante de tercer ventrículo, interrupción anatómica del cuerpo caloso y necrosis coagulativa, **Ver cuadro de Hallazgos histológicos**

## Estados de Racine en la estimulación Kindling posterior a callosotomía mediante radiocirugía

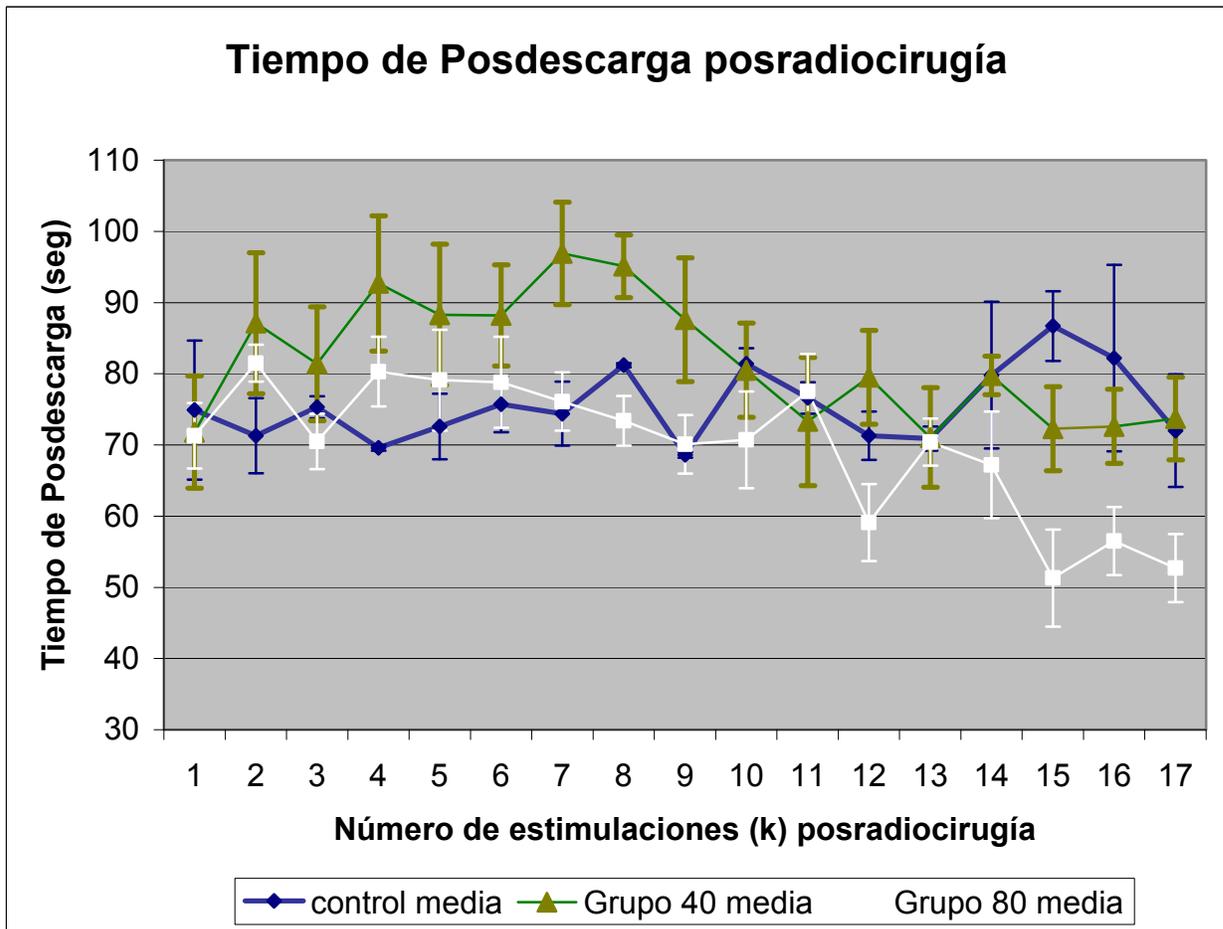


**Gráfico No2** Estados de Racine posradiocirugía. Observe una regresión a estados III o IV en los grupos que recibieron radiocirugía. Prueba de Friedman para muestras relacionados, existieron diferencias estadísticamente significativas de grupo control vs. grupo 80 Gy (  $P = 0.001$  ) y control vs. 40 Gy (  $P=0.089$  )

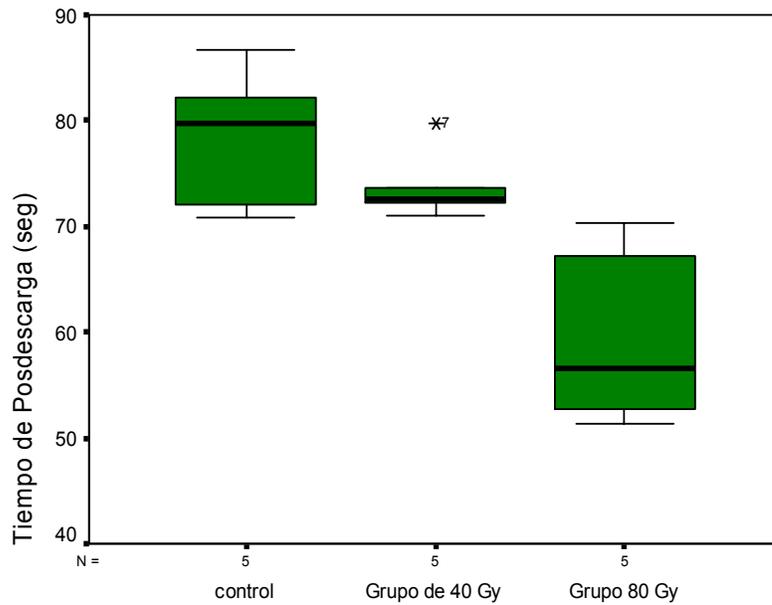
## Número de caídas posradiocirugía



**Gráfico No 3.** Cuantificación de caídas de la rata durante la estimulación semanal, existe una tendencia a la disminución tanto en el grupo de 40 Gy ( $F = 2.52$ ,  $P = 0.004$ ) como en el Grupo de 80 Gy ( $F = 4.862$ ,  $P = 0.0001$ ), existen diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo de 40 Gy ( $p 0.039$ ) y el Grupo de 80 Gy ( $p 0.021$ ) respecto al Grupo control.



**Gráfica No 4** Seguimiento del Tiempo de Posdescarga (TPD) posterior a la callosotomía mediante radiocirugía comparación de los diferentes grupos. Con diferencia estadística en el cambio del TPD en el transcurso del seguimiento durante las estimulaciones (k) ( $F = 1.887$ ,  $P = 0,024$ ), sin embargo la diferencia intergrupos fue significativa solamente cuando comparamos Grupo de 40 Gy con el Grupo de 80 Gy.



GRUPO

**Gráfica No 5.** Comparación de medias con error estándar del tiempo de Posdescarga del **4to mes** (último mes) de seguimiento Posradiocirugía del grupo control, de dosis de 40Gy y de 80Gy.

Diferencias estadísticamente significativas ANOVA ( F= 10.8, P= 0.002).

**HALLAZGOS HISTOLÓGICOS POSTERIOR A LA RADIOCIRUGÍA POSTERIOR (4 MESES)**

<b>TÉCNICA</b>	<b>RATA 2 (control)</b>	<b>RATA 5(control)</b>	<b>RATA 7(control)</b>
TINCIÓN	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera
DESMIELINIZACIÓN/ASTROCITOSIS	Astrocitosis perivascular	Ausente	Ausente
ALTERACIÓN VASCULAR (proliferación, hemorragia, vasos dilatados, engrosamiento arteriolar	Aspecto vascular normal	Aspecto vascular normal	Aspecto vascular normal
NECROSIS	Ausente	Ausente	Ausente
GFAP	+	Ausente	Ausente
MBP	Ausente	Ausente	Ausente
P53	Ausente	Ausente	Ausente
<b>TÉCNICA</b>	<b>RATA 10(40 Gy)</b>	<b>RATA 13 (40 Gy)</b>	<b>RATA KCC 1(40 Gy)</b>
TINCIÓN	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera
DESMIELINIZACIÓN/ASTROCITOSIS	+	Ausente	edema celular citotóxico
ALTERACIÓN VASCULAR (proliferación, hemorragia, vasos dilatados, engrosamiento arteriolar	Dilatación capilar	Aspecto vascular normal	Aspecto vascular normal
NECROSIS	Ausente	Ausente	Ausente
GFAP	+	Ausente	Ausente
MBP	Ausente	Ausente	Ausente
P53	Ausente	Ausente	Ausente

**HALLAZGOS HISTOLÓGICOS POSTERIOR A LA RADIOCIRUGÍA (4 MESES)**

<b>TÉCNICA</b>	<b>RATA 1(control)</b>	<b>RATA CCCF 2 (40Gy)</b>	<b>RATA14 (control)</b>
TINCIÓN	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera
DESMIELINIZACIÓN/ASTROCITOSIS	Ausente	Ausente	Ausente
ALTERACIÓN VASCULAR (proliferación, hemorragia, vasos dilatados, engrosamiento arteriolar	Aspecto vascular normal	Aspecto vascular normal	Aspecto vascular normal
NECROSIS	Ausente	Ausente	Ausente
GFAP	Ausente	Ausente	Ausente
MBP	Ausente	Ausente	Ausente
P53	Ausente	Ausente	Ausente
<b>TÉCNICA</b>	<b>RATA 15* (80 Gy)</b>	<b>RATA 16 (80 Gy)</b>	<b>RATA 17 (40 Gy)</b>
TINCIÓN	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera
DESMIELINIZACIÓN/ASTROCITOSIS	Hipercromasia nuclear, encogimiento neuronal, edema celular citotóxico  Astrocitosis perivascular	Astrocitosis perivascular	Ausente
ALTERACIÓN VASCULAR (proliferación, hemorragia, vasos dilatados, engrosamiento arteriolar	Dilatación capilar	Dilatación capilar	Engrosamiento arteriolar
NECROSIS	Ausente	Ausente	Ausente
GFAP	++	+	Ausente
MBP	Ausente	+	Ausente
P53	Ausente	Ausente	Ausente

**HALLAZGOS HISTOLÓGICOS POSTERIOR A LA RADIOCIRUGÍA (4 MESES)**

<b>TÉCNICA</b>	<b>RATA 18*(80 Gy)</b>	<b>RATA 19*(80 Gy)</b>	<b>RATA 20(80 Gy)</b>
TINCIÓN	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera	Hematoxilina-eosina Kluver-Barrera
DESMIELINIZACIÓN/ASTROCITOSIS	Astrocitosis moderada	Astrocitosis perivascular moderada	Astrocitosis perivascular leve
ALTERACIÓN VASCULAR (proliferación, hemorragia, vasos dilatados, engrosamiento arteriolar)	Vasodilatación	Dilatación del tercer ventrículo dilatación de vasos leptomeníngeos interrupción de fibras del cuerpo calloso.	Dilatación de capilares
NECROSIS	Necrosis coagulativa periventricular	Ausente	Ausente
GFAP	++	+	+
MBP	++	++	Ausente
P53	Ausente	Ausente	Ausente

## 9. DISCUSIÓN

### **Modelo kindling de epilepsia**

El modelo de epilepsia Kindling en ratas es el más utilizado como modelo de epileptogénesis estudiado en ratas, su uso se ha extendido a otras especies animales. El desarrollo de las crisis parciales (límbicas) con generalización secundaria nos permite realizar maniobras encaminadas a modificar los mecanismos de generalización de la crisis <sup>4</sup>, otros modelos como el de kainato intrahipocámpal provocan muchas crisis parciales pero pocas generalizadas <sup>2</sup>.

Para fines de este estudio, el modelo Kindling, es ideal ya que determinamos el momento y la frecuencia del estímulo convulsivo y la observación del evento es inmediata.

En esta investigación se desarrolló el modelo Kindling bajo condiciones controladas y se excluyeron todos los especímenes que no cumplieron con los criterios preestablecidos (Ej. aquellos que excedían el número de estimulaciones habituales para alcanzar el Estado V de Racine) disminuyendo el sesgo de medición, al mismo tiempo que se aleatorizaron los animales a los diferentes grupos lo que nos aseguró la homogeneidad de grupos.

Existen estudios experimentales con la callosotomía quirúrgica previa <sup>9</sup> o posterior al desarrollo del modelo kindling<sup>7</sup>, en este experimento la callosotomía anterior se realizó una vez que el modelo de epilepsia estuvo plenamente desarrollado (Estado V de Racine), similar condición esta presente en pacientes con epilepsia refractaria al tratamiento médico que se someten a un procedimiento quirúrgico como la callosotomía anterior.

Dentro las limitaciones de utilizar el modelo kindling de epilepsia esta el efecto de reclutamiento, es decir la formación de “focos en espejo” en el hemisferio ipsilateral y contralateral<sup>12</sup>, de alguna manera esta sería fuente de sesgo incluso de subvaloración del efecto antiepiléptico de la callosotomía anterior mediante radiocirugía con este modelo. Igualmente el efecto de la callosotomía para interrumpir la propagación del estímulo epileptogénico es proporcional al grado de encefalización del animal por lo que la respuesta en otras especies de animales se esperaría sea más intensa<sup>38</sup>, sin embargo el modelo en ratas es más factible y versátil.

### **Efectos conductuales**

**Grupo Control.** Una vez que el fenómeno de Kindling esta plenamente establecido con crisis convulsivas y caídas, estas persisten durante toda la vida del animal <sup>3, 5, 6</sup>. Igualmente en este estudio no se registraron modificaciones importantes en el TPD, número de caídas o en los estados de Racine en el Grupo control, de manera que nos aseguramos que los cambios en las variables dependientes mencionadas en los otros grupos (40, 80Gy) puedan ser atribuibles a la maniobra (callosotomía anterior mediante radiocirugía).

**Grupo de 40 Gy.** Los cambios en este grupo fueron evidentes (aunque menos intensos) en los estados conductuales de Racine y en el número de caídas.

Si bien existió una disminución del TPD a partir del último mes de seguimiento este no llegó a tener significancia estadística, hay que considerar que si la tendencia a esta reducción continuaba probablemente esta diferencia hubiera alcanzado significancia con un mayor tiempo de seguimiento, sin embargo la finalidad del

estudio era determinar los cambios comparativos en los tres grupos en un tiempo determinado preestablecido de 4 meses, es probable que el grupo de 40Gy requiere un mayor tiempo de latencia para su efecto “antiepileptogénico”.

A pesar que el blanco radioquirúrgico no incluyó precisamente el “foco epileptógeno” (como en la mayoría de investigaciones previas) sino la vía de propagación, resulta interesante el incremento transitorio en el TPD en los dos primeros meses de seguimiento en este grupo de 40 Gy ( dosis no precisamente bajas) coincidente con estudios previos que observaron un efecto transitorio de facilitación de la actividad epiléptica (especialmente con dosis “bajas” de radiación). **Ver gráfico No 4**, como en el trabajo experimental de *Jenrow et al.*, en ratas con modelo de epilepsia con Kindling, donde se administró una dosis de 18 a 25 Gy a la amígdala izquierda, y observaron cambios persistentes en las manifestaciones dinámicas de las crisis convulsivas dentro la primera semana posirradiación, que consistieron en un incremento en la actividad epiléptica y un aumento en las crisis convulsivas secundarias. Estos cambios representan una desinhibición de uno o varios circuitos neuronales inducidos por la radiación<sup>40</sup>

En el área clínica se ha reportado, en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal mesial tratados mediante radiocirugía con Gamma Knife a dosis de 20 Gy, una falta de reducción de las crisis convulsivas, es probable que esta dosis baja de radiación induzca cambios bioquímicos y celulares, pero no lo suficientes para incrementar el umbral para la supresión de las crisis<sup>41</sup>.

Es previsible que en algunos casos exista aumento en la intensidad moderado de la intensidad de la crisis convulsiva lo que no debe ser interpretado como fracaso terapéutico<sup>23, 41</sup>.

En el presente estudio este incremento transitorio del TPD ocurrió solo en el grupo con 40 Gy.

**Grupo 80 Gy.** En este grupo fue evidente la disminución en el número de caídas (pérdidas de postura), y en el TPD a partir de décimotercera semana de seguimiento, se comprobó una falta de generalización en casi la mitad de especímenes después de haber alcanzado un Estado 5 de Racine, como se esperaba este efecto fue más rápido e intenso comparativamente a la dosis de 40 Gy. Estos hallazgos apoyan el papel fundamental asignado al cuerpo caloso en la generalización y sincronización de las crisis generalizadas que otros estudios experimentales con Kindling previos ya describieron con la callosotomía abierta experimental <sup>7, 8, 9</sup>.

**Cambios histológicos.** En este estudio se decidió hacer un seguimiento de 4 meses, tomando en cuenta que existen estudios experimentales en ratas que ya describen cambios histológicos en este lapso de tiempo con dosis similares y para evitar los problemas técnicos en el registro en seguimientos prolongados con los consiguientes potenciales sesgos en la medición.

Existen datos muy heterogéneos en cuanto a los hallazgos histológicos según dosis, pero el presente estudio coincide con otros en que la dosis 40 Gy produce mínimos cambios especialmente luego de un seguimiento de 4 meses, lo interesante es que a pese a estos cambios mínimos existieron cambios conductuales evidentes sugiriendo un efecto “antiepileptogénico” más funcional que anatómico, creemos que con un mayor tiempo de seguimiento probablemente

se encontraría más cambios histológicos coincidente con la tendencia a la baja de TPD.

Los cambios vasculares en el grupo de 40Gy sugieren que este es un evento inicial que precede otros cambios, descritos también en otras series<sup>24, 36</sup>. Como se esperaba la dosis de 80 Gy fue más efectiva en disminuir el TPD y la intensidad de las convulsiones, con alteraciones estructurales del cuerpo calloso en diferentes grados, estos hallazgos coinciden con otras publicaciones que describen necrosis a dosis similares<sup>18, 29</sup>.

En el reporte de casos pionero que hizo *Pendl et al* reportan la ausencia de respuesta esperada con una dosis de 25 Gy a 3.2cc de la línea de isodosis (volumen amplio/dosis bajas) por lo que utilizaron dosis altas comparativamente (80Gy a 150Gy), y sugieren que la radiocirugía a un volumen pequeño/dosis alta es un método seguro para la callosotomía, sin embargo mencionan que no se conocen aún la dosis óptima para interrumpir la vía de propagación sincrónicas de las descargas epileptiformes.

## 11. CONCLUSIONES.

El modelo epilepsia Kindling demostró ser útil para la investigación de radiocirugía aplicado a la epilepsia, sin embargo no permite un seguimiento mayor a 4 meses.

La dosis de 40 Gy, con blanco en el cuerpo caloso puede mejorar la intensidad del evento convulsivo, aunque con menor intensidad y con una latencia mayor.

Los hallazgos en histología fueron mínimos para esta dosis, con la traducción clínica de que sería excepcional algún tipo de reacción adversa dosis dependiente.

Con dosis 80 Gy el efecto fue más rápido y efectivo, y a su vez existieron cambios histológicos en la mayoría, incluso necrosis, lo que hace que se considere con precaución esta dosis.

Resultaría interesante investigar la temporalidad de estos cambios histológicos en el seguimiento y correlacionados con los efectos electrocorticográficos y conductuales a largo plazo en un modelo animal con mayor grado de encefalización.

Si bien estos datos no son totalmente extrapolables a seres humanos, concluimos que no son necesarias dosis demasiado altas de radiocirugía al cuerpo caloso para “interrumpir” el impulso epileptogénico, con la consiguiente disminución de reacciones adversas como la radionecrosis y disminuyendo los tiempos de tratamiento, con un efecto que se puede evidenciar a partir del tercer mes.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Stables, James P. ; Bertram, Edward H. ; White, H. Steve, et al., : Models for Epilepsy and Epileptogenesis: Report from the NIH Workshop, Bethesda, Maryland. **Epilepsia** Nov 2002 . 43(11):1410-1420
2. Coulter D; McIntyre D; Löscher W. Animal models of Limbic Epilepsies: What Can They Tell Us? **Brain Pathol** 2002;12:240-256
3. McNamara JO, Bonhaus DW, Shin C, The Kindling model of epilepsy: a critical review. **CRC Rev Neurobiol** 1985;1:341-91
4. White, H. Steve PhD. Animal models of epileptogenesis. **Neurology** Vol.59(9) Sup 5: S7-S14 ..
5. Goddard, G., McIntyre, D., Leech, C.,. A Permanent Change in Brain Function Resulting from Daily Electrical Stimulation. **Experimental Neurology** 1969: 2,:295-330.
6. Racine, R., et al.,. Modification of seizure activity by electric Stimulation II: Motor Seizure. Electroencefalogram **Clin. Neurophysiol.** 1972 32:218-227
7. Wada J.A. Nakashima T, Kaneko Y; Forebrain Bisection and Feline Amygdaloid Kindling. **Epilepsia** Octubre de 1982;23:21
8. C Okamoto M The role of interhemispheric pathways in generalization of kindled seizures in cats and subhuman primates. **Jpn J Psychiatry Neurol.** 1991 Jun;45(2):257-60.
9. Kudo T, Yagi K, Seino M.Effect of callosal bisection on seizure development and interhemispheric transfer effects in feline motor cortical kindling. **Epilepsy Res.** 1997 Sep;28(2):105-18
10. Moriwaki A; Hattori Y; Role of the Corpus Callosum in Interhemispheric propagation of Iron\_induced Epileptogenic activity in the Rat; **Acta Med. Okayama** 1985;39(5): 421-424

11. Hiroshi F; Wada J.A.; Riche D. Role of The Corpus Callosum and Hippocampal Commissure on Transfer Phenomenon in Amygdala-Kindled Cats. **Experimental Neurology**. 1987;98:189-197
12. McIntyre DC, Edson N. Facilitation of secondary site kindling in the dorsal hippocampus following forebrain bisection. **Exp Neurol**. 1987 Jun;96(3):569-79.
13. Oguni H, Olivier A, Andermann F, Comair J: Anterior callosotomy in the treatment of medically intractable epilepsies: A study of 43 patients with a mean follow-up of 39 months. **Ann Neurol** 1991;30: 357-364,
14. Kwan Y, Wong T, Chang P, et al., Seizure outcome after corpus callosotomy: the Taiwan experience **Child's Nervous System Child's Nervous System**. Feb 2000 :16(2); 87 - 92
15. Shimizu H. Our experience with pediatric epilepsy surgery focusing on corpus callosotomy and hemispherotomy. **Epilepsia**. 2005;4(1);30-1.
16. Sorensen JM, Wheless JW, Baumgartner JE, Thomas AB, Brookshire BL, Clifton GL, Willmore LJ. Corpus callosotomy for medically intractable seizures. **Pediatr Neurosurg**. 1997 Nov;27(5):260-7.
17. Cendes F, Ragazzo PC, da Costa V, Martins LF: Corpus callosotomy in treatment of medically resistant epilepsy: Preliminary results in a pediatric population. **Epilepsia** 34: 910-917, 1993. 6
18. Niranjan A, Gobbel G, Kondziolka D M.D. Experimental Radiobiological Investigations into Radiosurgery: Present Understanding And Future Directions. **Neurosurgery** 55;3;495-505
19. Liscak R, Vladyka V. Leksell gamma Knife lesioning of the rat hippocampus: the relationship between radiation dose and functional and structural damage. **J. Neurosurgery**. 2002;97:666-674
20. Mori Y, Kondziolka D, Balzer J, Fellows W, Flickinger JC, Lunsford LD, Thulborn KR: Effects of stereotactic radiosurgery on an animal model of hippocampal epilepsy. **Neurosurgery** 2000;46:157-168

21. Brisman J, Cole A, Cosgorve R. Radiosurgery of the rat hippocampus; Magnetic Resonance imaging, Neurophysiological, Histological, and Behavioral Studies. **Neurosurgery** 2003; 53( 4); 952
22. Barcia-Salorio JL, Roldan P, Hernandez G, Lopez Gomez L: Radiosurgical treatment of epilepsy. **Appl Neurophysiol**1985;48:400-403
23. Regis J, Rey M, Bartolomei F, Vladyka V, Liscak R, Schrottner O, Pendl G Gamma Knife Surgery in Mesial Temporal Lobe Epilepsy: A Prospective Multicenter Study **Epilepsia** 2004;45(5):504–515
24. O'Connor M, Mayberg M. MD Effects of Radiation on Cerebral Vasculature: A Review . **Neurosurgery** 2001 46;1:130-151
25. Yang T, Wu SL, Liang JC, Rao ZR, Ju G: Time-dependent astroglial changes after gamma knife radiosurgery in the rat forebrain. **Neurosurgery**2000;47:407–415
26. Bellinzona M, Gobbel GT, Shinohara C, Fike JR: Apoptosis is induced in the subependyma of young adult rats by ionizing irradiation. **Neurosci Lett**1996;208:163–166
27. Peissner W, Kocher M, Treuer H, Gillardon F: Ionizing radiation-induced apoptosis of proliferating stem cells in the dentate gyrus of the adult rat hippocampus. **Brain Res Mol Brain Res** 1999 ;71:61–68
28. Hecht-Leavitt C. Grossman, Curran WJ et al: MR brain radiation injury:experimental studies in cats **AJNR**1987; 8:427-430
29. Kondziolka D, Lunsford LD, Claassen D, Maitz AH, Flickinger JC: Radiobiology of radiosurgery: Part I—The normal rat brain model. **Neurosurgery**1992;31:271–279
30. Spiegelmann R, Friedman WA, Bova FJ et al: LINAC radiosurgery: an animal model. **J Neurosurg** 1993;78:638-644.
31. Lunsford LD, Altschuler EM, Flickinger JC, Wu A, Martinez AJ: In vivo biological effects of stereotactic radiosurgery: A primate model. **Neurosurgery** 1990;27:373–382

32. Lo EH, DeLaPaz RL, Frankel KA, et al: MRI and PET of delayed heavy-ion radiation injury in the rabbit brain **In J Radiat Oncol Biol Phys** 1991;20:689-696
33. Blatt DR, Friedman WA, Bova FJ, Theele DP, Mickle JP: Temporal characteristics of radiosurgical lesions in an animal model. **J Neurosurg** 1994;80:1046-1055
34. Karger CP, Munter MW, Heiland S, Peschke P, Debus J, Hartmann GH: Dose-response curves and tolerance doses for late functional changes in the normal rat brain after stereotactic radiosurgery evaluated by magnetic resonance imaging: Influence of end points and follow-up time. **Radiat Res** 2002;157:617-625.
35. Kamiryo T, Kassell NF, Thai QA, Lopes MB, Lee KS, Steiner L: Histological changes in the normal rat brain after irradiation. **Acta Neurochir (Wien)** 1996;138:451-459
36. Kamiryo T, Lopes MB, Kassell NF, Steiner L, Lee KS: Radiosurgery-induced microvascular alterations precede necrosis of the brain neuropil. **Neurosurgery** 2001;49:409-415.
37. Gaffey C, Montoya V, Split-brain cats prepared by radiosurgery. **J Radiat. Biol**, 1973;24:229-242
38. Pendl, Gerhard M.D. ; Eder, Hans M.D.; Schroettner Oskar M.D. : Corpus Callosotomy with radiosurgery. **Neurosurgery** Agosto 1999; 45(2):303-310
39. Paxinos G. ; Watson CH. (1982): **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Academic press New York.
40. Jenrow KA, Ratkewicz A, Elisevich K; Enhanced Excitability Induced by Ionizing Radiation in the Kindled Rat. **Experimental Neurology** 2001;169:96-104
41. Srikijvilaikul T, Najm I, Foldvary-Schaefer N, Failure of Gamma Knife Radiosurgery for Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Report of Five Cases. **Neurosurgery** 2002;54;6:1395-1404.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al programa de DGEP de la UNAM por el apoyo brindado con la Beca de Posgrado para realizar esta investigación.

A todos los integrantes del Laboratorio de Neurofisiología de INNN"MV", por su orientación y su apoyo incondicional. Al servicio de Radioneurocirugía, por la oportunidad brindada. Al servicio de Neuropatología por su entrega y amistad



**HISTOLOGIA PROTOCOLO DE CALLOSOTOMIA MEDIANTE RADIOCIRUGIA EN EL MODELO KINDLING DE EPILEPSIA EN RATAS**

<b>TÉCNICA</b>	<b>RATA No</b>	<b>RATA No</b>	<b>RATA No</b>
<b>TINCION</b>			
<b>DESMIELINIZACIÓN</b>			
<b>ASTROCITOSIS</b>			
<b>ALTERACIÓN VASCULAR</b> (proliferación, hemorragia,vasos dilatados, engrosamiento arteriolar			
<b>NECROSIS</b>			
<b>GFAP</b>			
<b>MBP</b>			
<b>P53</b>			
<b>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA</b> Cambios a nivel de membrana basal			