



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA**  
**Y LEÓN (INCYL)**

**-TESIS DOCTORAL-**  
**“ELECTROFISIOLOGÍA E HISTOPATOLOGÍA DE LA**  
**MIELOPATÍA POST-IRRADIACIÓN EN RATAS”**

**FELIPE EDUARDO SERRANO MONEY**

***DIRECCIÓN DE TESIS:***  
**Dr. D. Tomás López Alburquerque**  
**Dr. D. Javier Yajeya Pérez**  
**Dr. D. Arturo Mangas Martín**

**2010**



**Dr. D. Tomás López Alburquerque**, Profesor Asociado de Neurología de la Universidad de Salamanca, **Dr. D. Javier Yajeya Pérez**, Profesor Titular de Fisiología de la Universidad de Salamanca, **Dr. D. Arturo Mangas Martín**, Investigador Contratado del Instituto de Neurociencias de Castilla y León,

**CERTIFICAN:**

Que **D. FELIPE EDUARDO SERRANO MONEY** ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“ELECTROFISIOLOGÍA E HISTOPATOLOGÍA DE LA MIELOPATÍA POST-IRRADIACIÓN EN RATAS”**, el que reúne todos los requisitos para su defensa y evaluación.

Y para que así conste, lo firmamos en Salamanca, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de dos mil diez.

**Los directores,**

Dr. Tomás López Alburquerque

Dr. Javier Yajeya Pérez

Dr. Arturo Mangas Martín

**El doctorando,**

Felipe Eduardo Serrano Money



**“...Hay hombres que realmente lo son  
Hay otros que aparentan serlo  
Pero hay unos que se ven  
en la necesidad de demostrarlo...”**



## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todo.

A mi familia (Ella, mi madre, mi abuela (Mamá Titi), Erick, mi hermano, mi hijo Felipe; Mary, Poncho, Aurora, Paca, mis tíos abuelos, mi nana Juana). Gracias a su cariño y apoyo incondicional, durante todo el tiempo, en todos los sentidos, todo lo que implicó este sueño-anhelo-trabajopudo realizarse.

A Carolina, mi novia. Su amor es el elemento fundamental que da sentido a mi vida.

Al Dr. Héctor Bourges Rodríguez y a la Lic. Herlinda Madrigal Fritsch en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” por su invaluable contribución a mi formación como persona y profesional.

A México, a través del CONACYT, por el apoyo que me brindó para realizar mis estudios.

A mis directores de tesis: El Dr. D. Tomás López Alburquerque, el Dr. D. Javier Yajeya Pérez, el Dr. D. Arturo Mangas Martín. Gracias a sus enseñanzas, su paciencia y su dedicado profesionalismo logré alcanzar este objetivo profesional tan importante para mí. No solo me quedan conocimientos, sino experiencias en sentido humano que me acompañarán por siempre.

Un agradecimiento al Dr. Enrique de Sena por su determinante cooperación para la realización del trabajo experimental.

A todos los profesores que durante este Doctorado han dejado en mí tantas cosas a través de sus clases, consejos, recomendaciones y han configurado lo que ahora soy.

A España y, especialmente, a esta maravillosa Ciudad de Salamanca por todo lo que me han proporcionado durante esta estancia que he vivido en esta parte del mundo, que aunque lejos de casa, me sentí arropado como si estuviera en la mía. Nunca olvidaré a su gente, su gastronomía, sus increíbles vinos, sus paisajes y esa cultura que compartimos, que hace ver que después de tanto tiempo, realmente estamos cerca, incluso más de lo que creemos.

A Alain, Tiago y Gustavo. No es necesario que les diga lo que su apoyo ha significado para mí. Ustedes son parte clave de este logro y jamás lo olvidaré. En mí tienen a un amigo siempre.

A mis amigos, compañeros y a todas las personas que de una u otra manera han contribuido a alcanzar todo esto, y que con su cariño, me he levantado, aún en los momentos en que creí que no podía seguir.

Y, finalmente, a todos aquellos que aunque no los recuerde en este momento, saben que les agradeceré todo lo que hicieron por mí y que les será compensado como se merecen.



## **PREFACIO**

El autor de este trabajo es un superviviente de un padecimiento neoplásico que recibió radioterapia como tratamiento y presentó mielopatía por radiación. A casi 30 años de esto, se suscitan sentimientos encontrados acerca de la evaluación de la calidad de vida que se ha llevado. Por un lado se ha continuado con vida, pero por otro, se han presentado limitaciones que, como consecuencia del tratamiento, han restringido muchas opciones en el campo profesional, social y personal.

Sería erróneo cuestionar el beneficio que se obtiene de estos tratamientos, pero también se ha observado que ha habido escaso interés en estudiar sobre los mecanismos que estas terapias producen en las diferentes estructuras del organismo. La gran mayoría de los trabajos se enfocan a la resolución del problema inmediato, al seguimiento de los pacientes en cuanto a las afecciones que han surgido después de cierto tiempo, y a ajustar los indicadores cuando se proporcionan estas terapias.

Afortunadamente, los resultados de estos estudios han sido bastante alentadores en cuanto a la prevención de daños excesivos y a la disminución de pacientes afectados, lo cual es de digno reconocimiento. Sin embargo, poco se conoce de los mecanismos que la radioterapia produce en órganos tan importantes como la médula espinal o el cerebro, amén de otros órganos de la economía del ser humano, menos aún los procedimientos para recuperar funciones básicas de los mismos.

Es por eso que se decidió hacer un Doctorado en Neurociencias, además de ser el objetivo de mi vida profesional, se pretendía detectar con metodologías utilizadas ampliamente en la práctica médica, como las electrofisiológicas e histopatológicas, algunas de las alteraciones que, en este caso, la radioterapia ocasiona en la médula espinal y buscar alternativas para mejorar la calidad de vida de las personas afectadas.

Más allá de conseguir un sueño, querer cotizarse mejor en el mercado laboral o mejorar en la escala social, está el espíritu de lucha por alcanzar la dignidad y el respeto de todo ser humano, que gran parte se pierde en la discapacidad, así como la oportunidad para difundir los resultados del esfuerzo del trabajo del investigador.

Evidentemente, esto es solo el principio de un largo camino por recorrer, como siempre, en la búsqueda de mejorar la calidad de vida de los supervivientes afectados por problemas oncológicos y de mejorar los tratamientos que hasta el momento se tienen disponibles.

Como muchos saben, las afecciones de la radiación ionizante no se circunscriben a la práctica médica exclusivamente, sino a la utilización de otros medios que la producen, no siempre terapéuticos, y que han afectado a muchas personas en el mundo y con terribles consecuencias. También es necesario considerar esto como parte de las investigaciones en estas áreas,

con el fin de que algún día, se cuente con alternativas que ofrecer cuando sea necesario.

## **RESUMEN**

La médula espinal es un órgano que pone límite a las dosis de radiación en la radioterapia de los tumores que se originan en su proximidad. Eventualmente, por sobredosis accidental o hipersensibilidad individual, puede producirse una mielopatía post-irradiación que se manifiesta clínicamente por paresia, hipoestesia o parestesias y raramente, un síndrome de segunda motoneurona progresivo y muy discapacitante.

El objetivo del trabajo es evaluar mediante estudios electrofisiológicos e histopatológicos las lesiones medulares y/o radicales producidas por una dosis baja y única de irradiación de 22 Gy con fotones de rayos X en la región lumbo-sacra de la médula espinal de 19 ratas de 4 meses de edad a los 12 meses post-irradiación.

El estudio electromiográfico de los músculos gemelos de ambas extremidades inferiores no mostró signos de actividad denervativa aguda (fibrilaciones, ondas positivas) post-irradiación. Los diferentes parámetros (latencia, amplitud y duración del potencial compuesto motor) de la conducción motora del nervio ciático recogiendo la respuesta en músculos plantares, no mostraron diferencias significativas entre los estudios pre y post-irradiación que indicaran pérdida de unidades motoras por lesión de las astas y/o raíces anteriores de la médula. Tampoco se observó un aumento de la latencia de la onda F post-irradiación. Su retraso hubiese orientado hacia una posible desmielinización de las raíces anteriores de la médula.

El estudio de potenciales evocados somatosensoriales obtenidos con electrodos superficiales cefálicos tras la estimulación del nervio plantar interno no mostró diferencias significativas en las latencias y amplitudes P2-N2, entre los grupos de ratas control y sometidas a radiación, pero sí en la amplitud P1-N1. En consecuencia, no se detectó ninguna alteración significativa en la conducción de la vía somestésica central.

Estos hallazgos están en consonancia con los resultados de los estudios histopatológicos e inmunocitoquímicos realizados en la región lumbo-sacra de la médula de las ratas. En efecto, no se detectaron lesiones vasculares, desmielinización o signos degenerativos en las neuronas o glía. Entre los factores que han podido influir en los resultados, se postulan la baja dosis de irradiación, el corto tiempo de seguimiento tras la irradiación y posiblemente el reducido número de ratas estudiadas. Finalmente, puede concluirse que dosis de irradiación de 22 Gy no parece ser lesiva en la región lumbo-sacra de la médula espinal de ratas.

## **ABSTRACT**

The spinal cord is an organ that limits radiation doses in radiotherapy of nearby tumors.

Eventually, due to accidental overdose or individual hypersensitivity, a post-radiation myelopathy can occur that becomes clinically evident with the manifestation of paresis, hypoesthesia, or paresthesias and, occasionally, a very disabling lower motor neurone syndrome.

The aim of this is to evaluate through electrophysiological and histopathological studies, the medular and/or root lesions produced by a low single radiation dose of 22 Gy with photon X-rays in the lumbosacral level of the spinal cord of 19 rats 4 months of age at 12 months after irradiation.

The electromyographic study of the gastrocnemius muscles did not showed acute denervation activity (fibrillations, positive waves) after irradiation. The different parameters (latency, amplitude and duration of the compound motor action potencial of paw muscles after stimulation of sciatic nerve) did not showed statistical differences between pre and post-irradiation assessment suggesting damage to motor neurones of ventral horns of the spinal cord. Neither a post-irradiation delay of the F wave latency was observed. If so, a possible demyelination of anterior roots could be suspected.

The study of somatosensory evoked potentials with cephalic superficial electrodes after medial plantar nerve stimulation between control and radiated rats was not statistically different. So, no

significant alteration was detected in the conduction of the central somesthetic pathway.

These findings are in keeping with results of histopathologic and immunohistochemical studies in the rat lumbosacral spinal cord. No vascular, demyelination, or degenerative signs in neurones or glia were observed. Among factors which might influenced absence of evidences in the hypothesis support are the low radiation dose, the short follow-up at time of assessment, and the reduced number of animals studied. Finally, may be concluded that a 22 Gy single dosedo not seem to be dangerous to the lumbosacral spinal cord of rats.

## INDICE

			Pág.
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>		<b>19</b>
	1.1	Definición	22
	1.2	Frecuencia/incidencia	23
	1.3	Edad y sexo	25
	1.4	Tipo de neoplasia irradiada	25
	1.5	Latencia	26
		1.5.1 Signos y síntomas	27
	1.6	Diagnóstico	28
	1.7	Anatomía patológica	29
	1.8	Características patológicas de la mielopatía post-irradiación	31
	1.9	Tolerancia a la irradiación	35
	1.10	Influencia de la dosis	36
	1.11	Fraccionamiento, tamaño de fracción y tiempo total	37
	1.12	El efecto del fraccionamiento	37
	1.13	Nivel de irradiación de la médula espinal	37
	1.14	Estudios experimentales de mielopatía post-irradiación en ratas	39
	1.15	Estudios en animales sobre efectos de dosis-volumen en la médula espinal	45
	1.16	Necrosis de la sustancia blanca	47
	1.17	Apoptosis oligodendroglial inducida por irradiación	48
	1.18	Efecto de las irradiaciones sobre las células	48
		1.18.1 Alteraciones cromosómicas	48
	1.19	Estudios electrofisiológicos	52
	1.20	Potenciales evocados somatosensoriales	56
<b>2.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>		<b>59</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>		<b>63</b>
	3.1	Objetivo general	65
	3.2	Objetivos específicos	65
<b>4.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>		<b>67</b>
	4.1	Animales y métodos	69
	4.2	Irradiación de los animales de experimentación	72
	4.3	Evaluación histológica	74
	4.4	Análisis estadístico	80
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>		<b>83</b>
	5.1	Electromiografía	85
	5.2	Conducción nerviosa motora	86

	5.3	Potenciales evocados somatosensoriales	89
	5.4	Alteraciones anatómicas	91
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>		95
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>		109
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		113
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b>		135



## ABREVIATURAS

**<sup>60</sup>Co:** Cobalto de número atómico 60 que indica que es un átomo radiactivo capaz de emitir partículas gama por poseer un neutrón más en su núcleo.

**CGRP:** Calcitonin gene related peptide.

**ED<sub>0</sub>:** Dosis efectiva que afecta al 0% de la población.

**ED<sub>50</sub>:** Dosis efectiva que afecta al 50% de la población.

**ED<sub>100</sub>:** Dosis efectiva que afecta al 100% de la población.

**EEG:** Electroencefalografía.

**EMG:** Electromiografía o electromiográfico.

**Gy:** Un gray es la dosis absorbida en un elemento de materia, de masa 1 kilogramo, al que las radiaciones ionizantes comunican de manera uniforme una energía de 1 joule o julio.  
1 Gy = 1 J/kg.

**HE:** Hematoxilina-eosina.

**kV:** kilovoltios.

**LFB:** Luxol Fast blue.

**MeV:** Mega electrón voltios.

**MR:** Mielopatía post-irradiación.

**μs:** microsegundos.

**μV:** microvoltios.

**ms:** milisegundos.

**mV:** milivoltios.

**O<sub>s</sub>O<sub>4</sub>:** tetraóxido de Osmio.

**PBS:** Phosphate buffered saline (tampón de fosfatos en solución salina).

**PES:** Potenciales evocados somatosensoriales.

**PMMA:** Polimetilmetacrilato.

**SNC:** Sistema nervioso central.

**SNP:** Sistema nervioso periférico.

**SP:** sustancia P.

## 1. INTRODUCCIÓN



La mielopatía post-irradiación(MR) es una complicación de la radioterapia en diversos tipos de cáncer desde que ésta se ha utilizado como uno de los principales métodos terapéuticos. Debido a la morbilidad y mortalidad asociada, el daño por radiación a la médula espinal ha sido el objeto de más trabajos clínicos que cualquier otro tejido no afectado por la neoplasia inicial y que ha sufrido daño por radiación. La médula espinal es probablemente el segundo órgano (después de la piel) más estudiado por los radiólogos (Schultheiss y Stephens 1992).

La MR ha sido, y es hoy en día, un evento que se presenta con poca frecuencia en los pacientes que han recibido radioterapia para el tratamiento de alguna neoplasia. Desde la primera publicación sobre el padecimiento, hace casi 70 años (Ahlbom 1941), hasta las más recientes, señalan los casos que se han presentado, y se han descrito como estudios de caso, precisamente por presentarse raras veces, pero cuando esto ocurre, las repercusiones sobre la calidad de vida de los pacientes se ve seriamente afectada, además de que la radiación *per se*, ocasiona riesgos importantes de salud para ellos (Dynes y Smedal 1960; Atkins y Tretter 1966; Reagan y col. 1968; van den Brenk y col. 1968).

La importancia de este padecimiento no solo radica en la gravedad de las consecuencias, que muchas veces son ocasionadas por dosificación inadecuada del esquema de la radioterapia, sino que, independientemente del tipo de neoplasia que padecen, los pacientes son de condición muy variada, pues son de edades, países y

particularidades médicas distintas, además de otros factores. Es por ello, que la gran mayoría de los trabajos se publican como estudios de caso, pues cada uno de ellos es muy diferente a otro.

Generalmente, los primeros síntomas incluyen un déficit sensorial y una sensación disminuida de la temperatura, descoordinación, debilidad de las extremidades inferiores y una disminución de la propiocepción. Cuando el paciente es más consciente de los síntomas, se presentan cambios en la marcha, dificultad para caminar, paraparesis, síndrome de Brown-Séquard, espasticidad, dolor, debilidad, hiperreflexia y varios grados de incontinencia; son comunes el signo de Babinski, el signo de Lhermitte y una progresión ascendente dependiendo del nivel de la médula que ha sido irradiado (Schultheiss y Stephens 1992).

Varias complicaciones que afectan la médula espinal, la cauda equina y el plexo lumbo-sacro se han asociado a la radioterapia. Dosis altas de radiación pueden ocasionar daño severo a la médula espinal y al endotelio vascular en horas o días, pudiéndose desarrollar una mielopatía progresiva crónica de características sensoriales y autonómicas (van der Sluis y col. 2000).

### **1.1 Definición**

La MR se define como el daño producido a la médula espinal por la radiación ionizante (rayos X o rayos  $\gamma$  en la mayoría de los casos). La destrucción de la sustancia blanca y otros tejidos nerviosos es la principal característica patológica. Los síntomas clínicos de la MR varían dependiendo del nivel y el área afectada de la médula espinal o bien, de la extensión de la lesión (Schultheiss y Stephens 1992).

Goldwein (1987) describe las modalidades que se presentan de este síndrome:

### **Paraplejía/Tetraplejía Aguda**

Este síndrome se distingue de la MR progresiva crónica por la instauración aguda (en horas o días) de un déficit neurológico severo. Se supone que es el resultado de un daño vascular inducido por radiación que culmina en un infarto en la médula espinal.

### **Enfermedad de Motoneuronas Inferiores**

Este síndrome descrito por Greenfield y Stark en 1948, que es extremadamente raro, se caracteriza clínicamente por atrofia muscular, fasciculaciones y arreflexia sin alteraciones de la sensibilidad ni de los esfínteres.

### **Mielopatía por Radiación Transitoria Aguda**

Esta forma, la más común de mielopatía, cuando afecta a la médula cervical, con frecuencia se asocia a un signo de Lhermitte: descarga eléctrica descendente por la columna al flexionar el cuello (Jones 1964).

### **Mielitis por Radiación Progresiva Crónica**

Esta es la única mielopatía del humano de la que existe confirmación patológica. La verdadera frecuencia es difícil de determinar y varía entre menos del 1% (Reagan y col. 1968) y el 12,5% (Locksmith y Powers 1968) en las diferentes publicaciones. Las variaciones dependen de varios factores incluyendo el período de tiempo contemplado y de la selección de los pacientes.

La MR progresiva crónica se caracteriza por un período de latencia durante el cual el paciente es asintomático. Los síntomas se presentan generalmente entre 9 y 15 meses después de la terminación de la radioterapia, como parestesias e hipoestesia termo-algésica. Hay una progresión constante durante 6 meses que involucra a todos los sistemas medulares (Schultheiss y col. 1984).

## **1.2 Frecuencia/incidencia**

La radioterapia de los neoplasias malignas frecuentemente llevan a que se irradie el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP) lo que ocasiona la mielopatía. Entre los estudios para determinar la incidencia de la misma se encuentran los de Atkins y Tretter (1966) en 4 de 10 pacientes con carcinomas de pulmón, tráquea, esófago, Hodgkin (frecuencia=40%).

En 1972, Palmer realiza una recopilación de los trabajos más importantes a la fecha y muestra que la incidencia es del 0,8 al 10%. Abbatucci y col. (1978) describen una incidencia de 12 casos de 1715 estudiados lo que da una proporción de 0,6%; Wara y col. en 1975 observaron una incidencia de 42 casos de 284 estudiados (14,7%) combinando pacientes irradiados en el segmento cervical y torácico de la médula espinal. El trabajo de Fitzgerald y col. (1982) (6 de 45 casos) muestra una incidencia de 13,3% de casos de mielopatía en pacientes de carcinoma broncogénico primario. Marcusy Million en 1990 y Jeremic y col. en 1991, estudiaron pacientes que recibieron dosis mayores de 60 Gy y que presentaron mielopatía en la zona cervical con una incidencia de 0,17% (2 de 1112) y 5,5% (4/72) respectivamente. Una investigación con pacientes tratados con radiocirugía mostró que 6 pacientes de 1075 estudiados en una clínica de Stanford, California, entre 1996 y 2005, presentaron mielopatía tardía dando una proporción de 0,5% en pacientes con tumores benignos o malignos en la médula torácica media (Gibbs y col. 2009).

A modo de tentativa para estimar la frecuencia con la que se presenta la MR, se revisó la literatura y se encontró que desde el trabajo publicado por Ahlbom en 1941 (4 casos), se han descrito más de 500 casos. Algunos de los trabajos más citados y con mayor número de casos descritos: Greenfield y Stark 1948; Dynes y Smedal 1960; Pallis y col. 1961; Atkins y Tretter 1966; Reagan y col. 1968; Henry y col.



1971; Palmer 1972; Burns y col. 1972; Sadowsky y col. 1976; Sanyal y col. 1979; Fitzgerald y col. 1982; Lagueny y col. 1985; Gallego y col. 1986; Feistner y col.1989; Lamy y col. 1991;Bowen y col. 1996; Higgins y col. 1997; Lalu y col. 1998; Ésik y col. 1999;van der Sluis y col. 2000;Mathis y col. 2007.

### **1.3 Edad y sexo**

La edad y el sexo no son factores determinantes de la MR, ya que puede presentarse en todos los períodos de la vida adulta (Reagan y col. 1968), pues lo que interviene principalmente es la afección neoplásica inicial. Las edades de los pacientes en los estudios revisados van de 16 hasta 81 años (Bowen y col. 1996; van der Sluis y col. 2000; Alfonso y col. 1997; Ésik y col. 1999; Knap y col. 2007; Mathis y col. 2007).

### **1.4 Tipo de neoplasia irradiada**

En más de la mitad de los casos la neoplasia irradiada se encuentra en la esfera otorrinolaringológica (faringe, hipofaringe, nasofaringe, laringe, base de la lengua) (Boden 1948, 1950; Itabashi y col. 1957; Alajouanine y col.1959, 1961; Dynes y Smedal 1960; Pallis y col. 1961; Kristensson y col. 1967; Reagan y col. 1968; Henry y col. 1971; Burns y col. 1972; Alfonso y col. 1997) aunque también se han presentado casos por cáncer de tiroides (Lengyel y col. 2003); cáncer de pulmón (Fitzgerald y col. 1982; Ferrero y Obarrio 1965); tumores espinales (Gibbs y col. 2009), feocromocitoma (de Carolis y col. 1986), esófago, mediastino, torácicos, parótidas (Knap y col. 2007), linfoepitelioma (GómezCamello y García García2008), meduloblastoma (Sadowsky y col. 1976); linfoma (Gallego y col. 1986) y carcinoma de trompa de Falopio (Higgins y col. 1997).

En un apartado especial se encuentran los casos de seminoma, ya que en varios de los trabajos publicados en relación a la MR, este

padecimiento se presenta con bastante frecuencia (Knap y col. 2007; Greenfield y Stark 1948; Mathis y col. 2007; Lagueny y col. 1985; Feistner y col. 1989; Lamy y col. 1991; Bowen y col. 1996; van der Sluis y col. 2000; Bauduceau y col. 2003; Grünewald y col. 1992; Mathis y col. 2007; Tallaksen y col. 1997; Horowitz y Stewart 1983; Kristensen y col. 1977). Hoy en día se sigue utilizando la radioterapia como tratamiento de elección.

Igualmente, otros trabajos muestran que existe una proporción importante de MR en lo que se refiere a la enfermedad de Hodgkin (Mathis y col. 2006; Lagueny y col. 1985; Lamy y col. 1991; Lecky y col. 1980).

No obstante, cuando las dosis se mantienen bajas, la MR no se presenta (García-Serra y col. 2005). Hoy en día se presentan pocos casos de MR al someterse a radioterapia por seminoma, aunque la mayoría de los trabajos publicados son de los Estados Unidos, Canadá, Países Europeos (España, Francia, Noruega, ex-Yugoslavia, Reino Unido, Italia, Hungría), Australia, Corea, Japón, Israel e India pero no se conoce la situación en Latinoamérica, África o Asia, aparte de los mencionados, por lo que no se puede evaluar los tratamientos en esos sitios. De hecho, es muy probable que muchos casos de MR sean mal diagnosticados y considerados dentro de otras enfermedades neurológicas.

### **1.5 Latencia**

Existe un intervalo entre el final de la radioterapia y las manifestaciones clínicas, que generalmente oscila entre los 10 y 24 meses, aunque se han descrito casos extremos, de tres meses (Greenfield y Stark 1948) y 24 años (Grünewald y col. 1992). Así, los estudios señalan pacientes con tiempos sumamente variables de latencia (Lengyel 2003; Gibbs y col. 2009; de Carolis y col. 1986; Henry y col. 1971; Knap y col. 2007; Burns y col. 1972; van der Sluis

y col. 2000; Gómez Camello y García García 2008).

### **1.5.1 Signos y síntomas**

Aunque se han realizado varios intentos para categorizar los diferentes síndromes de la MR (Reagan y col. 1968; Schultheiss y col. 1988; van der Kogel 1977a), los diferentes signos y síntomas pueden ocurrir en casi cualquier combinación, dependiendo de la localización y la severidad de la lesión. Los síntomas avanzan a diferente velocidad, aún para un determinado paciente (un caso atípico de un paciente que estuvo estable durante 17 años antes de presentar súbitamente una parálisis completa). Generalmente, los primeros síntomas pasan desapercibidos por los pacientes. Entre ellos, se encuentran una deficiencia sensorial en un solo miembro, ya sea inferior o superior; una disminución de la sensación térmica, debilidad y torpeza motora y disminución de la propiocepción. En fases posteriores aparecen alteraciones en la marcha y hemiparesia. Los signos de la exploración neurológica son: síndrome de Brown-Séquard, espasticidad, dolor, debilidad, hiperreflexia y varios grados de incontinencia. El signo de Babinski es bastante común. (Schultheiss y Stephens 1992; Greenfield y Stark 1948, Pallis y col. 1961; Alajouanine y col. 1961; Henry y col. 1971). Otros autores (Stoll y Andrews 1966; Maier y col. 1969) asociaron el síndrome clínico a un daño producido por la radiación en el plexo lumbosacro.

Aunque el signo de Lhermitte se asocia frecuentemente a la mielopatía transitoria, éste acompaña los síntomas de desarrollo tardío de la mielopatía permanente con más frecuencia de la que se detecta (Dynes y Smedal 1960). Usualmente, hay una progresión ascendente de signos que llevan a la tetraplejía dependiendo del nivel anatómico de la irradiación (Holdorff 1980).

Los problemas de esfínteres son frecuentes y de mal pronóstico, y la evolución ascendente del síndrome sensitivo es normalmente menos nítida que la de la afectación motora (Henry y col. 1971).

La mortalidad actuarial por MR es del 55% a los 18 meses para la lesión en médula cervical y del 25% a los 18 meses para la lesión a nivel torácico, a partir de la presentación de los síntomas (Schultheiss y col. 1986).

Existe controversia acerca de la localización exacta de la lesión. La radiación produce una fibrosis retroperitoneal que secundariamente lesiona el plexo lumbosacro (Klana1974).

## **1.6 Diagnóstico**

Generalmente, los síntomas tempranos principales son parestesia y debilidad muscular que comienzan en las piernas. Debido a que no hay síntomas característicos de MR, el diagnóstico se hace cuando un paciente satisface los criterios siguientes:

1. Deben descartarse otras etiologías. La causa más común de mielopatía en un paciente con cáncer es el avance de un tumor o metástasis. Además, hay que descartar las enfermedades primarias del SNC.
2. La presentación de los síntomas debe ser consistente con la MR, descartando los casos de síntomas en extremidades superiores en ausencia de síntomas de las extremidades inferiores, o en aquellos donde el dolor es el único síntoma.
3. La dosis y tiempo de manifestación del daño debe ser consistente con una lesión por radiación a la médula espinal. Una latencia de menos de 6 meses es rara y los pacientes que recibieron menos de 50 Gy, no están a riesgo de MR. Es necesario considerar si se ha dado quimioterapia, antecedentes de daño neurológico o enfermedades

vasculares. Las proteínas del líquido cefalorraquídeo se encuentran ligeramente elevadas; la proteína básica de mielina y los linfocitos están elevados (Schultheiss y col. 1995). Las velocidades de conducción espinales se encuentran disminuidas (Dorfman y col. 1982, Snooks y Swash 1985) y aunque la evaluación neurológica muestre síntomas como los descritos, hay que poner atención a la observación del signo de Babinski y al posible diagnóstico de Guillain-Barré. Sin embargo, una mielopatía por radiación de progreso lento es difícil de distinguir de cualquier otra mielopatía de origen desmielinizante.

### **1.7 Anatomía patológica**

Las lesiones de la MR se han estudiado por diversos autores: Ahlbom 1941; Boden 1948; Greenfield y Stark 1948; Itabashi y col. 1957; Malamud y col. 1954; Dynes y Smedal 1960; Alajouanine y col. 1961; Kristensson y col. 1967; Coy y col. 1969; Castaigne y col. 1970.

Stevenson y Eckhardt (1945) enfatizan la desmielinización masiva de los fascículos antero-laterales y posteriores con pequeñas fosas de necrosis. Estas se presentan en la sustancia blanca que es donde ocurren las modificaciones más importantes, ya que la sustancia gris casi no se afecta.

Boden (1948) destaca la importancia de las lesiones vasculares como engrosamiento de las fibras de las arteriolas y una disminución de la luz vascular. Malamud y col. (1954) señalan las petequias hemorrágicas surgidas por la desintegración celular con algunos vasos intra-medulares engrosados por los depósitos de sustancia fibrinoide teñibles en color malva con hematoxilina-eosina, pero no se adhieren a la sustancia amiloide.

Alajouanine y col. (1961) señalan la presencia de capas de una sustancia homogénea de un aspecto pseudo-amiloide.

En resumen, las lesiones principales son:

- Predominancia de lesiones en la sustancia blanca.
- Presencia de una sustancia amorfa pseudo-amiloide de localización perivascular.
- Reacción de gliosis marginal con proliferación de astrocitos y de fibroblastos anormales.
- Alteración de la pared vascular con engrosamiento e hialinización que produce un estrechamiento de la luz y a veces una trombosis completa.
- Modificación del número y forma de los vasos que le confieren un aspecto telangiectásico y ocasionalmente aparece con hemorragias petequiales.
- En conjunto, la sustancia gris está más comprimida por las lesiones de cordones vecinos que destruidos realmente, sin embargo, existe daño de las células del asta anterior. También se ha observado una degeneración walleriana adyacente a la zona de necrosis.
- La mayoría de las patologías que resultan de la radioterapia son cervicales, pero el número de las irradiaciones torácicas y de mediastino no son despreciables; las complicaciones mielopáticas dorsales son más raras.
- Los sitios afectados más frecuentes son:  
 La médula cervical, ya que la dosis recibida es en general superior a la absorbida por el segmento dorsal: en promedio, 62 Gy contra 43 Gy. Por otro lado, la vascularización medular juega un papel determinante. El examen anatómico-patológico muestra la importancia de las lesiones vasculares a nivel de la médula irradiada y por otro lado, son los tejidos mejor vascularizados los que presentan la mayor sensibilidad. Estudios experimentales han mostrado que esta radiosensibilidad puede estar fuertemente disminuida por una anemia o por una reducción del riego sanguíneo al tejido irradiado, y que en los enfermos que fueron irradiados en presencia de oxígeno

hiperbárico a 4 ATM, aumentaba el riesgo de que sobreviniera una MR (van den Brenk y col. 1968).

Muy precozmente, los investigadores intuyeron el papel preponderante que jugaban las lesiones vasculares (Malamud y col. 1954; Kristensson y col. 1967). En la actualidad, está plenamente establecido que la isquemia producida por la degeneración de las paredes vasculares y la estenosis de luz, junto con los problemas de permeabilidad vascular, son factores determinantes en la extravasación de las proteínas plasmáticas.

Ésik y col. (1999) en un estudio detallado de necropsia de un paciente con MR, encuentra desmielinización, pérdida de axones, daño a la médula cervical, daño vascular mínimo, engrosamiento de paredes vasculares y degeneración secundaria de ambos fascículos piramidales. La irradiación fue de 61 Gy y la paciente mostró signos notables de mejoría de la mielopatía 9,5 años después de la presentación de los síntomas.

## **1.8 Características patológicas de la mielopatía post-irradiación**

### Hallazgos generales

Generalmente, la médula espinal dañada puede estar inflamada o, a veces, atrófica, o puede verse normal cuando el área afectada es limitada. Se observan licuefacción, hemorragia o cambios quísticos en el centro de la sustancia blanca irradiada.

Las médulas espinales que han sufrido daño se vuelven duras y las meninges usualmente se engruesan (Schultheiss y Stephens 1992). La sustancia gris casi siempre se encuentra respetada. No hay diferencias esenciales entre las lesiones humana y experimental. En las lesiones del parénquima, la sustancia blanca es la que está principalmente involucrada, y la sustancia gris se afecta de forma secundaria cuando

las lesiones de la sustancia blanca son lo suficientemente severas. Los cambios patológicos en la MR se dividen en dos categorías generales: lesiones de la sustancia blanca y lesiones vasculares dependiendo del principal tejido dañado, aunque las dos se encuentran frecuentemente coincidentes (van der Kogel 1985).

Una lesión de la sustancia blanca no se acompaña de una lesión vascular cuando se desarrolla precozmente después de la irradiación (necrosis temprana de la sustancia blanca). Los hallazgos comunes en la lesión de la sustancia blanca que se observan en ambos casos clínicos y modelos experimentales se detallan en la Tabla I. El cambio esencial es la destrucción de la mielina y de las fibras nerviosas. Ésta empieza a nivel de las fibras nerviosas individuales y luego se disemina y se funde; finalmente, resulta en lesiones necróticas coagulativas o licuefactivas (Mastaglia y col. 1976).

**Tabla I.** Lesiones de la sustancia blanca en la mielopatía post-irradiación.

- 
1. Degradación de la mielina de fibras nerviosas aisladas
  2. Degradación de la mielina de grupo de fibras nerviosas (espongiosis)
  3. Necrosis/malacia “inactiva”
    - a) espongiosis, esferoides
    - b) cicatriz
  4. Necrosis/malacia “activa”
    - a) necrosis/malacia coagulativa
    - b) necrosis/malacia licuefactiva
      - i) amorfa
      - ii) campos de células espumosas
      - iii) quística
  5. Necrosis/malacia hemorrágica
- 

Tomada de Schultheiss y Stephens 1992.

Las lesiones vasculares se desarrollan generalmente después de un largo período de tiempo, mayor que en el que aparecen las lesiones de la sustancia blanca. En el daño vascular tardío, la lesión vascular se localiza en la sustancia blanca y, ocasionalmente, no se presentan



cambios parenquimales. La irradiación con dosis bajas es insuficiente para la inducción de una lesión de sustancia blanca debido a la diferencia de radiosensibilidad entre el endotelio vascular y las células gliales. Los cambios vasculares no están necesariamente acompañados por alteraciones endoteliales, tales como la hiperplasia, la inflamación, anisocariocitosis o hiperplasia (van der Kogel 1985). Aunque no hay vasculopatías específicas para la MR, la combinación de lesiones vasculares y degradación de la mielina o necrosis/malacia en muchos casos de humanos (Schultheiss y col. 1988) y de primates (Morris y col. 1992), es característica de la MR. Las lesiones vasculares encontradas en la médula espinal irradiada se exponen en la Tabla II (Okada y Okeda 2001). No son los únicos cambios, se acompañan de otras lesiones vasculares que se observan en esta tabla.

**Tabla II.** Vasculopatías en la mielopatía post-irradiación

- 
1. Vaso sanguíneo morfológicamente intacto
  2. Vascularización alterada
  3. Telangiectasia o dilatación vascular
  4. Degeneración hialina y engrosamiento
  5. Edema y exudación de fibrina
  6. Fibrosis perivascular e inflamación
  7. Vasculitis
  8. Degeneración fibrinoide /necrosis
  9. Acumulación de eritrocitos o trombosis
  10. Hemorragia
- 

Tomada de Okada y Okeda 2001

Se ha observado una discreta respuesta astro y microglial en la sustancia blanca de la MR (van der Kogel y Barendsen 1974; Hubbard y Hopewell 1979; Delattre y col. 1988; Schultheiss y col. 1990, Schultheiss y col. 1994; Morris y col. 1996; Miyagawa y col. 1996; Okada y col. 1998), particularmente inflamación. En los casos leves de daño de la sustancia blanca (degradación de la mielina de las fibras nerviosas), está ausente. Se ha observado que las alteraciones del funcionamiento en la médula espinal están causadas por la

depleción de las células neurogliales y los oligodendrocitos (para la médula espinal y de las células de Schwann para las raíces nerviosas) y se considera que son las dianas principales (Stewart y col. 1995).

Por otro lado, para determinar hasta dónde es el endotelio vascular o las células gliales progenitoras las dianas responsables de la necrosis tardía de la sustancia blanca, Morris y col. (1994) llevaron a cabo trabajos para radiar selectivamente el endotelio vascular administrando intraperitonealmente un compuesto de Boro [BSH (Na<sub>2</sub>B(12)H(11)SH)] seguido de irradiación local con neutrones térmicos, pues se sabe que la barrera hemato-encefálica excluye al BSH del parénquima del SNC. Se observó que las diferencias en la supervivencia de los progenitores gliales estaban directamente relacionadas con la distribución de la dosis en el parénquima, lo que indica la importancia de la dosis al endotelio vascular como el evento primario que lleva a la necrosis de la sustancia blanca (Morris y col. 1994; Coderre y col. 2006).

Aunque las vasculopatías asociadas con el daño por radiación aparentemente ocurren tanto en arterias como en venas, ciertas características sugieren un daño preferencial a venas (Schultheiss y col. 1995). Se ha visto que en un modelo experimental de monos con síntomas neurológicos de MR, éstos consistentemente tenían lesiones en el tracto corticoespinal lateral, el cual se sabe que se afecta por las lesiones venosas (Schultheiss y col. 1990).

Algunos investigadores, utilizando técnicas de imagen, ofrecen un panorama que muestra tanto los aspectos patológicos, como las reacciones en los distintos niveles de la médula espinal y la forma en que la radiación afecta los tejidos nerviosos, incluso proponiendo alternativas en el tratamiento de estas patologías (Ésik y col. 1999; Lengyel 2003; Lengyel y col. 2003; Gómez Camello y García García 2008; Komachi y col. 1995).

## 1.9 Tolerancia a la irradiación

Desde los primeros trabajos descritos se han venido sugiriendo los umbrales para la irradiación del tejido nervioso (Pallis y col.1961; Maier y col. 1969; Ellis 1971; Schiødt y Kristensen1978; Sanyal y col.1979). Se ha recomendado una dosis media de 40 Gy para la region torácico-lumbar en 20 fracciones en un tiempo de 28 días con  $^{60}\text{Co}$  para evitar la debilidad de las extremidades inferiores (Maier y col. 1969). La estimación de la radiación recibida por el tejido neural depende de muchos factores incluyendo el número de fracciones y el intervalo entre ellos. La dosis nominal estándar propone racionalizar la dosis radioterapéutica respecto al tamaño de la dosis y el intervalo:  $\text{Dosis total} = \text{dosis nominal estándar} (N^{0,24} * T^{0,11})$  donde N representa el número de fracciones y T el tiempo total en días (Ellis 1971).

El umbral para la médula espinal se ha estimado en alrededor de 40 Gy en 25 fracciones (Combes y col.1975; Wara y col.1975; Rheinhold y col. 1976).

Boden intentó en 1948, definir la tolerancia para la médula cervical y concluyó que 35 Gy para campos mayores a 15 cm y 45 a 50 Gy para campos de menos de 10 cm, era adecuado, pero Pallis y col. en 1961, consideraron altos los valores y señalaron que 42 Gy era algo aceptable.

Atkins y Tretter (1966) indicaron que 47,5 Gy eran bien tolerados en 25 fracciones y Phillips y Buschke (1969) concluyeron que la tolerancia de la médula espinal era de 50 Gy en 25 fracciones en 5 semanas.

En trabajos revisados para identificar las dosis recibidas por los pacientes de MR, éstas fluctuaron entre 42 y 62 Gy (Lengyel 2003; Fitzgerald y col. 1982; Boden 1948; Pallis y col. 1961; Atkins y Tretter 1966; Gibbs y col. 2009; de Carolis y col. 1986; Reagan y col. 1968; Henry y col. 1971; Knap y col. 2007; Burns y col. 1972; Grünewald y col. 1992; Wong y col. 1994; Gómez Camello y García García 2008; van der Sluis y col. 2000).

No se dispone de datos suficientes para determinar la tolerancia de estimaciones equivalentes de la cauda equina en el hombre. Sin embargo, se ha observado una radiculopatía necrotizante progresiva en la cauda equina de rata con una dosis aproximada de 20-60 Gy (van der Kogel 1979).

### **1.10 Influencia de la dosis**

Muchos investigadores han buscado una dosis tolerable de radiación, esperando reducir el número de casos de MR (Boden 1948; Pallis y col. 1961; Ellis 1971; Marcus y Million 1990). El riesgo de MR se ha estimado en menos del 0,5% si la espina dorsal recibió una dosis total de 45-50 Gy en fracciones diarias de 1,8-2 Gy y se ha estimado que la dosis fraccionada convencionalmente que causa el 5% de incidencia (ED<sub>50</sub>) es probablemente de 68 a 73 Gy (Schultheiss y col. 1990).

Los grados de denervación también son muy variables y los estudios electrofisiológicos casi siempre se muestran normales contribuyendo a constatar la complejidad de esta entidad (van der Sluis y col. 2000). Evidentemente, los factores que más interesan y preocupan no solo en la MR, sino en el tratamiento de las neoplasias en general, es la administración de la radioterapia, principalmente la dosis, el fraccionamiento y el tiempo en el que se debe proporcionar. Los trabajos de varios investigadores son una muestra de la relevancia y continuamente se llevan a cabo estudios que permiten afinar los

tratamientos (van Luijk y col. 2005; Phillipens y col. 2004; Kirkpatrick y col. 2010). Ya en 1987, Goldwein proponía que la MR era el resultado de errores técnicos en el posicionamiento de los campos de tratamiento.

### **1.11 Fraccionamiento, tamaño de fracción y tiempo total**

Experimentalmente, es evidente que el fraccionamiento incrementa la ED<sub>50</sub> (que es la dosis efectiva para el 50% de la población expuesta o 50% de respuesta a una determinada dosis recibida por una población) y prolonga el período de latencia de la MR (van der Kogel y Barendsen 1974; Goffinet y col. 1976; White and Hornsey 1978; Leith y col. 1982; van der Kogel 1985, 1991) porque la reparación del daño subletal ocurre entre fracciones.

### **1.12 El efecto del fraccionamiento**

El efecto del fraccionamiento está influido por el tiempo total del tratamiento, el tiempo entre la primera fracción a la última fracción, el número de fracciones y la dosis por fracción (Jeremic y col. 1991).

El volumen irradiado influye en la ED<sub>50</sub> pues cuando se irradian grandes volúmenes, la ED<sub>50</sub> y el período de latencia disminuyen en relación a la presentación de los signos neurológicos. Recientemente, se ha observado que utilizando el fraccionamiento convencional de 1,8-2 Gy/fracción a todo el grosor de la médula, el riesgo estimado de mielopatía es de <1% y <10% a 54 Gy y 61 Gy, respectivamente, con una fuerte dependencia de la dosis/fracción ( $\alpha/\beta=0,87$  Gy) (Kirkpatrick y col. 2010).

### **1.13 Nivel de irradiación de la médula espinal**

El segmento de la médula espinal irradiado así como su longitud, van conformando el panorama de las variables más reconocidas hasta hoy

(Coy y col. 1969), considerando la influencia de la genética como factor de susceptibilidad y señalando la frecuencia con la que se presentan la debilidad de los miembros inferiores (Sadowsky y col. 1976).

Trabajos posteriores muestran una descripción que contemplan la debilidad, la atrofia muscular, la pérdida de los reflejos y las fasciculaciones en las distribuciones segmentarias que corresponden a las regiones donde se ha recibido la radiación. Entre aquellos que muestran la sensibilidad de las diferentes regiones de la médula espinal está el de Bradley y col. en 1977, donde señalan que las regiones cervical y torácica son más sensibles que la lumbosacra, así como el que las raíces posteriores lo son más que las anteriores.

El tipo y la localización del daño dependen del nivel de la médula espinal donde se recibió la irradiación (van der Kogel y Barendsen 1974; van der Kogel 1977a y 1977b). Después de la irradiación de la médula espinal a nivel torácico y cervical o a la parte superior lumbar, generalmente se desarrolla la necrosis de la sustancia blanca. ¿Qué funículo se afecta preferentemente en la necrosis de la sustancia blanca?, depende del nivel en el que se ha irradiado la médula espinal.

Cuando se irradia la médula espinal a nivel torácico-lumbar, la necrosis de la sustancia blanca del funículo lateral y anterior del ser humano y la ventral del roedor, es la que ocurre con más frecuencia (Leith y col. 1975; Miyagawa y col. 1996; Okada y col. 1998; van der Kogel 1991). La severidad del daño al cordón disminuye gradualmente en dirección caudal, probablemente debido a la disminución en el diámetro del cordón (van der Kogel 1991). En la espina dorsal lumbar baja y la región sacra, la característica patológica dominante es la necrosis de las raíces nerviosas (radiculopatía) (van der Kogel y Barendsen 1974).

Un estudio de interés es el realizado por Dorfman y col. en 1982 donde se estimó la velocidad de conducción somatosensorial espinal en individuos que habían recibido radioterapia. Se observó que la velocidad de conducción somatosensorial espinal estuvo correlacionada con el tiempo del tratamiento y el número de fracciones, y se sugirió que la radioterapia podría producir disfunción espinal subclínica y que se podían también monitorizar fisiológicamente los efectos mielopáticos de la radioterapia a través de mediciones electrofisiológicas.

### **1.14 Estudios experimentales de mielopatía post-irradiación en ratas**

Los estudios de MR en ratas se han realizado con el objetivo de determinar, por un lado, las dosis de tolerancia de la médula espinal, y por otro, los efectos sobre los distintos segmentos de la misma, así como las latencias de aparición de los síntomas. Entre los resultados principales de los estudios se ha observado que con dosis entre 35 y 65 Gy con irradiación de rayos X, la paraplejía, al irradiar la zona torácica, se presentaba entre 127-150 días y la médula espinal se dañó severamente, pero las raíces eran respetadas; en la zona lumbar la paraplejía se detectaba entre los 83-211 días. Las motoneuronas alfa prácticamente no se afectaban y la médula presentaba un daño leve o moderado a la sustancia blanca, pero el daño más severo se observó en las raíces del segmento lumbo-sacro. Las raíces posteriores se afectaban más que las anteriores. Así, se identificó que la médula a nivel torácico era más susceptible que a nivel lumbosacro, pero que las raíces a este nivel eran más susceptibles que a nivel torácico (Bradley y col. 1977; Ang y col. 1983; Lo y col. 1992; Geraci y Mariano 1994; Bijl y col. 2005).

En cuanto a los trabajos realizados de forma experimental en animales, el de Lo y col. (1992) es importante en relación al realizado en esta tesis, ya que ellos utilizaron un modelo de ratón para evaluar el daño por radiación después de dosis únicas de 12 a 75 Gy. El segmento irradiado fue de T9,10-L4,5y se encontró que: a) la dosis requerida para paralizar el 50% de los animales ( $ED_{50}$ ) fue de 19,79, 20,77, y 28,85 Gy para una parálisis leve, parcial y completa respectivamente, evaluada de 200 a 360 días después de la irradiación; b) el mayor daño fue progresivo pero no fue necesariamente así: después de dosis hasta de 28 Gy se observó recuperación ocasional; c) la latencia dependió de la dosis y del nivel del daño. Después de dosis alrededor de la  $ED_{50}$ , la parálisis ocurrió entre los 180 y los 300 días; d) hubo fluctuaciones importantes en la relación latencia-dosis a dosis menores de 35 Gy. Por lo que la latencia puede no ser siempre un punto de referencia fiable para comparar los efectos biológicos de la radiación en este rango de dosis; e) la radiosensibilidad de la médula espinal del ratón fue similar a la de la rata; f) histológicamente, la desmielinización fue la lesión dominante en los animales paralizados y se concluyó que el ratón era buen modelo, siempre y cuando el segmento irradiado fuera de 2,2 cm de longitud.

En experimentos llevados a cabo en ratas donde el segmento irradiado fue de 1 cm, con dosis entre 16 y 150 Gy y el seguimiento fue de 16 meses para determinar el efecto de dosis-respuesta, se observó que el período de latencia dependió de la dosis en el rango entre  $ED_0$  a la  $ED_{100}$ . En el rango de  $ED_{100}$  a 1,5 veces la  $ED_{100}$ , la latencia fue independiente de la dosis. Y cuando fue de más de 1,5 veces la dosis de  $ED_{100}$ , la latencia fue dependiente de la dosis. Histológicamente, se observó daño vascular y desmielinización en el segmento irradiado de todos los animales con parálisis. En la primera región dosis-dependiente ( $ED_0$  a  $ED_{100}$ ) se encontró una distribución bimodal de los



períodos de latencia (rango de 18 a 22 Gy). El primer pico de incidencia de parálisis ocurrió a los 5 meses y el segundo a los 12-13 meses después de la irradiación. En el rango de ED<sub>100</sub> a 1, 5 veces esta dosis (rango de 24 a 30 Gy) solo se observó el pico de incidencia de parálisis que ocurre a los 5 meses (Geraci y Mariano 1994).

Asscher y Anson (1962) irradiaron ratas Wistar en las regiones cervical y torácica superior. Destacaba la importancia de la etiología del daño vascular en la radionecrosis. Ambas regiones de la médula de ratas normotensas e hipertensas se irradiaron con 15, 20 y 30 Gy con rayos X de 220 kV. En los grupos hipertensos, la mayoría de los animales murieron repentinamente, aún después de recibir la dosis más baja de 15 Gy, con o sin ataxia, y con latencias muy variables (1-8 meses). Las médulas de estos animales mostraron lesiones vasculares con necrosis fibrinoide y trombosis de las arterias espinales. Ninguno de los animales normotensos, sacrificado como control siempre que moría una rata hipertensa, mostró daño alguno. Esto demuestra la importancia del sistema vascular en el desarrollo del daño por radiación.

Investigadores del Laboratorio Nacional de Brookhaven llevaron a cabo estudios con altas dosis de radiación (29-54 Gy) proporcionadas al segmento torácico de la médula espinal y entre los hallazgos, se encuentra el hecho de que después de una dosis única de 35 Gy a los segmentos T2-T4, la parálisis se desarrolló después de una latencia promedio de 200 días (rango: 166-277 días). Sorprendentemente, la misma dosis al segmento torácico-lumbar completo, mostró latencias de 150 a 270 días con el mismo valor promedio. Una dosis ligeramente menor de 29 Gy al pequeño campo torácico indujo parálisis después de una latencia promedio de 248 días (174-309), sugiriendo una relación inversa de dosis y período de latencia. Los primeros signos de necrosis fueron focales, con una degradación casi simultánea de mielina, axones y glia. En la médula torácica superior

se apreció una propensión por las vías anterolaterales, mientras que cuando se afectaban las columnas dorsales, era cuando se presentaba necrosis masiva (Innes y Carsten 1961; Carsten y Zeman 1966).

Las vías corticoespinales y las raíces nerviosas se conservaron bien. La sustancia gris y las meninges mostraron pocos cambios y las lesiones vasculares no fueron muy pronunciadas durante los primeros 5 meses después de la irradiación de los segmentos cervicales y lumbares de ratas irradiadas con dosis únicas entre 1 y 60 Gy (Mastaglia y col. 1976). Las lesiones vasculares no fueron muy pronunciadas durante los primeros 5 meses después de la irradiación de los segmentos cervical y lumbar de la médula espinal. Los detalles histopatológicos se describieron empleando microscopía electrónica y técnicas de marcado de los nervios. La degeneración de la mielina con un ensanchamiento nodal y una degradación paranodal, seguida de signos de hinchazón axonal y desintegración diseminada de la vaina de mielina, son los signos principales. Estos cambios ocurrieron de forma temprana, tanto como 2 semanas post-irradiación, y se incrementaba con tiempos más largos y dosis más altas. Se apreció más afectación a las columnas ventrales y las dorsales superficiales.

A los 3 meses se presentaron claros signos de desmielinización. La importancia de este estudio es la demostración de que los cambios tempranos relacionados con la mielina se observaban aún a dosis tan bajas como 5 a 10 Gy, proveyendo un substrato para el clínicamente importante signo de Lhermitte, después de la irradiación de segmentos grandes de la médula espinal como en la enfermedad de Hodgkin. Este fenómeno transitorio está asociado a la desmielinización difusa, que ha sido descrito como un síndrome de somnolencia después de un tratamiento con radio y quimioterapia de las lesiones cerebrales. Además, estas observaciones muestran que los eventos relacionados con la depleción celular se pueden detectar después de dosis bajas y que el umbral o la tolerancia de las dosis están relacionados con un malfuncionamiento general.

Un factor importante es que se irradiaron segmentos relativamente pequeños en estos estudios (5 mm en zona cervical; 10 mm en zona lumbar), y se ha demostrado que el volumen es una variable de consideración en las relaciones dosis-respuesta y en la patogénesis de la MR (Hopewell y col. 1987).

Como en la mayoría de los primeros estudios, el nivel de dosis elegido estaba por arriba de inducción de la parálisis, que estaba alrededor de 20 Gy en dosis única. Los animales que se irradiaron en la zona torácico-lumbar mostraron un amplio rango de tiempos de presentación de la parálisis (83-211 días) (Bradley y col. 1977). Histológicamente, todos los animales sacrificados de 3 a 4,5 meses mostraban necrosis extensa de las raíces nerviosas dorsales. A pesar de la dosis alta, la mayoría de las médulas espinales tenían apariencia normal. En los animales sacrificados entre 4,5 y 7 meses las raíces ventrales también mostraban bastante daño.

Después de irradiar con dosis únicas entre 22 y 40 Gy, se desarrolló necrosis entre 1 y 2 meses en las raíces ventrales. La ocurrencia de paresis correlacionó con el desarrollo de la necrosis de las raíces ventrales ya que la mayoría de las fibras motoras están localizadas en estas raíces. En la parte terminal lumbar y lumbo-sacra de la médula espinal ocurre algo notable, pues en los estudios de Bradley y col. (1977), van der Kogel y Barendsen (1974) y van der Kogel (1979), se observó una disminución de la severidad del daño del cordón conforme se desplazaba en sentido caudal. En la mayor parte del cordón lumbar a nivel de las vértebras T12-L1, el daño estaba restringido a las vías ventrolaterales cerca de las zonas de salida de las raíces ventrales. A niveles más caudales, no solamente disminuye el diámetro rápidamente, sino que el daño que se detecta, está únicamente en la cauda equina. Así que después de la irradiación de la médula espinal por debajo de las vértebras L1/L2, la característica patológica dominante es la necrosis de las raíces (radiculopatía) lo que está en contraposición con lo que sucede en los segmentos cervical y

torácico. Aunque Bradley y col. (1977) describen un engrosamiento de los vasos de las áreas necróticas, las trombosis o los cambios de las paredes vasculares no se detectaron y las arterias espinales estaban normales. A dosis mayores se observan incrementos en la permeabilidad vascular y necrosis.

En estudios posteriores (Stewart y col. 1995) en donde se evaluaba el daño producido por 25 Gy de radiación con rayos X en la sección cervical de la médula espinal a nivel vascular, utilizando un marcador de funcionalidad de la barrera hemato-encefálica con peroxidasa de rábano (HRP), se observó que a 93 días después de la irradiación, se notaba una extravasación extensiva de la HRP a 114 días en la sustancia blanca pero no en la sustancia gris. El daño por radiación a las células endoteliales, que forman la barrera hemato-encefálica antes de la presentación del déficit neurológico juega un papel clave en la patogénesis de la sustancia blanca.

Los estudios más recientes de radiosensibilidad muestran que, aún en la propia región cervical de ratas, hay diferencias en cuanto a tolerancia de la radiación mostrando que la sustancia blanca lateral es más sensible que la parte central y la sustancia gris prácticamente no se altera aún a dosis tan altas como 80 Gy (Bijl y col. 2005).

Phillipens y col. (2004) determinaron que se presentaba una mayor radiosensibilidad para las raíces nerviosas lumbares que para la sustancia blanca a nivel torácico. Adamus-Górka y col. en 2008 observaron que la probabilidad de inducir una mielitis por radiación es dependiente del volumen en la región cervical mientras que en la región torácica no se observó efecto alguno relativo al volumen. Sugirieron que podría haber una radiosensibilidad intrínseca causada por la diferente cantidad de sustancia blanca en las diferentes regiones de la médula espinal.

Así, se puede determinar que la MR es principalmente una lesión de la sustancia blanca inducida por la radiación ionizante después de un

cierto período de latencia. Involucra las fibras mielinizadas y los vasos sanguíneos y los funículos laterales se afectan de manera preferente. Varios factores como la dosis de radiación y el fraccionamiento, modifican el tiempo en que se presenta y su severidad. Aunque las células gliales y el endotelio vascular son las principales dianas y juegan un papel determinante en el desarrollo de MR, las investigaciones experimentales apoyan el hecho de que el daño vascular producido por la radiación y que origina como resultado una hiperpermeabilidad vascular y exudación venosa, es un proceso clave. Los efectos de la radiación ionizante en cada componente celular y su contribución a la MR son problemas que aún quedan pendientes de resolver (Burns y col. 1972; Berlitz y Schwchheimer 1987; Okada y Okada 2001).

### **1.15 Estudios en animales sobre efectos de dosis-volumen en la médula espinal**

Generalmente, se supone que la dosis de tolerancia para muchos tejidos normales, aumenta cuando se disminuye el volumen irradiado de ese tejido. Es importante discriminar entre la tolerancia estructural del tejido y la tolerancia funcional.

La tolerancia estructural del tejido depende de la sensibilidad a la radiación celular y de la habilidad de las células clonogénicas, dentro de un volumen definido para mantener la población de células maduras por encima de un nivel crítico. La tolerancia funcional depende de hasta dónde el órgano como un todo puede contribuir a su función. Esto está determinado por la organización del tejido como por la sensibilidad celular. El comportamiento de la dosis de tolerancia como una función del volumen irradiado es fuertemente dependiente del órgano (Hopewell y Trott 2000).

Cuando se estudian los efectos de dosis-volúmenes en la médula espinal es de vital importancia determinar una respuesta bien definida. En la mayoría de estudios de efectos de dosis-volumen en la médula espinal la respuesta es la parálisis inducida por radiación. En el modelo de rata, ésta siempre se debe a la necrosis de la sustancia blanca cuando ocurre dentro de los 210 días después de la irradiación (van der Kogel 1979; Phillipens y col. 2004).

Una indicación más precisa de la importancia del tamaño del segmento, provino de estudios para la determinación de los valores de ED<sub>50</sub> para ratas que desarrollaban parálisis en menos de 30 semanas de irradiación o que mostraban signos neurológicos o evidencia histológica de daño por irradiación que ocurriera después de períodos de latencia de más 30 semanas. Estos puntos terminales estuvieron relacionados en un principio a la necrosis de la sustancia blanca y a un daño vascular general, respectivamente. Para la parálisis que se presentaba en más de 30 semanas, la ED<sub>50</sub> se incrementó notablemente de 21,5±0,3 Gy para un campo de 16 mm, a 50,98±2,28 Gy cuando se irradiaban 4 mm de longitud de la médula. Para las lesiones vasculares se encontró solo una variación pequeña en la ED<sub>50</sub> de 20,0±0,5 Gy a 25,58±2,78 Gy para campos de 16 y 4 mm, respectivamente (Hopewell y col. 1987).

La información disponible para animales y humanos que fueron re-irradiados sugieren que existe una recuperación parcial del daño subclínico del daño inducido por radiación que se vuelve evidente aproximadamente a los 6 meses post-irradiación y se incrementa en los siguientes dos años, pero los datos a largo plazo son insuficientes para calcular una relación dosis-volumen para la mielopatía cuando una parte de la médula se trata con un régimen hipofraccionado (Kirkpatrick y col. 2010)

El estudio realizado por van Luijk y col. en 2005(b) donde prueban varios modelos de dosis-volumen respecto a la ocurrencia de necrosis de la materia blanca, concluye que en la médula espinal de rata, un mecanismo de reparación no-local que actúa del tejido no-irradiado al irradiado, juega un importante papel en la prevención de la necrosis de la sustancia blanca después de la irradiación.

### **1.16 Necrosis de la sustancia blanca**

Las opiniones acerca de la patogénesis de la necrosis de la sustancia blanca en la literatura se han enfocado ya sea a un origen primario glial o a un origen vascular primario o a una combinación de ambos (van der Kogel 1979).

La necrosis de la sustancia blanca se caracteriza por desmielinización, pérdida de axones, necrosis focal y necrosis licuefactiva, después de dosis únicas  $\geq 20$  Gy (van der Kogel 1991).

En la parte inferior del rango de dosis, las lesiones pueden permanecer como focos diseminados. Después de dosis mayores los focos individuales se expanden rápidamente y se fusionan en áreas necróticas mayores, mostrando que la extensión de la necrosis de la sustancia blanca es menor en un volumen grande (16mm) que en volúmenes pequeños (8 y 4 mm) a dosis isoeffectivas para daño neurológico. En años recientes está más claro que las células endoteliales y las células gliales no son las únicas dianas y componentes en el proceso que eventualmente resulta de la necrosis de la sustancia blanca. Durante el período de latencia que precede a los signos neurológicos hay una fase activa donde sustancias vasoactivas, citoquinas y factores de crecimiento juegan un papel importante en la comunicación inter e intracelular. Poco se conoce acerca de la orquestación y el período de tiempo de los procesos involucrados que preceden a la necrosis de la sustancia blanca (Hopewell y col. 1987).

### **1.17 Apoptosis oligodendroglial inducida por irradiación**

En la médula espinal irradiada se observa una reducción de oligodendrocitos 24 horas después de la radioterapia con rayos X (Atkinson y col. 2003). De las 2 a las 4 semanas después de la radioterapia se presenta una dramática pérdida de células progenitoras oligodendrogliales en la médula espinal de la rata (Chari y col. 2003). Después de la radioterapia a la médula espinal de la rata con 15 o 23 Gy con fotones de 6MeV, el reservorio progenitor de oligodendrocitos clonogénicos se reduce a menos del 0,1% de su población normal, seguida de una recuperación dosis-dependiente, alcanzando un máximo de 40-80% de los valores control a los 3 meses post-radioterapia. Sólo después de la dosis paralizante de 23 Gy ocurre una disminución secundaria de oligodendrocitos, entre 4 y 5 meses post-radioterapia (Hopewell y van der Kogel 1999).

Varios eventos tempranos, tales como la apoptosis, la densidad reducida y los cambios en la expresión génica oligodendroglial se han visto en la médula espinal irradiada de roedores. Estos eventos se observaron después de una dosis mielopática de 22 Gy y cambios similares después de una dosis mucho más baja de 8 Gy. La relevancia de la apoptosis oligodendroglial temprana a la desmielinización tardía permanece desconocida. Sin embargo, estos hallazgos sugieren que los eventos tempranos pueden no estar directamente asociados con la desmielinización tardía observada después de la radioterapia (Atkinson y col. 2003).

### **1.18 Efecto de las irradiaciones sobre las células**

#### **1.18.1 Alteraciones cromosómicas**



La acción de las radiaciones sobre los cromosomas puede producir una gran variedad de lesiones. Algunas, como las mutaciones, pueden ocurrir con dosis muy bajas. No conlleva alteraciones morfológicas o funcionales en la célula que ha recibido la irradiación y sólo se manifiesta en la descendencia.

Con dosis superiores pueden producirse alteraciones celulares más importantes. Cuando la célula ha recibido una dosis de radiación puede continuar con una actividad metabólica normal, sin embargo, en muchos casos aparecen mitosis aberrantes, células gigantes o células multinucleadas acompañadas de alteraciones morfológicas de los cromosomas (Valls y Algara 1994).

Estas alteraciones se denominan: roturas, inversiones, traslocaciones, duplicaciones etc. Si la célula ha recibido un daño cromosómico no letal, puede reproducirse y exhibir o no alteraciones cromosómicas. Esto se debe a que algunas lesiones subletales no tienen una traducción morfológica porque se han producido a nivel de los genes. Estas alteraciones genéticas pueden ser el origen de un tumor maligno o de una malformación congénita en la descendencia. Si las alteraciones cromosómicas o genéticas son importantes, impiden la reproducción o llevan a la muerte celular inmediata, independientemente de que tengan o no traducción morfológica.

Existen varias opciones para la clasificación de las alteraciones morfológicas observables en los cromosomas. Por ejemplo:

1. Ruptura única en un cromosoma.
2. Ruptura única en más de un cromosoma.
3. Ruptura múltiple en un cromosoma.
4. Adhesividad y soldaduras entre los cromosomas.

Estas lesiones radioinducidas pueden repararse sin lesión residual. Puede perderse parte de un cromosoma o pueden producirse reagrupamientos o cambios de orden de los genes en el cromosoma afectado.

La aparición de alteraciones simples es directamente proporcional a la dosis total administrada. Las lesiones moleculares son importantes en cuanto a la complejidad química y abundancia de la molécula alterada. Si ésta es abundante, la célula puede sustituirla por otra indemne sin alterar la fisiología. Si la molécula es simple puede repararse o sintetizarse de nuevo sin mayor complicación para la célula, no así la alteración de moléculas complejas y/o escasas que ocasionan trastornos de importancia vital (Valls y Algara 1994).

De aquí se desprende la teoría de la diana que los físicos y biólogos de inicios del siglo pasado desarrollaron para explicar los efectos de las radiaciones sobre soluciones, proteínas y la aparición de mutaciones e interpretar la “muerte celular”. Según ésta, la célula contendría centros vitales, cuyo número varía para los diferentes tipos celulares que, en caso de ser alcanzados por la radiación, ocasionarían la muerte celular. La inactivación/destrucción de una de estas dianas puede alcanzarse por acción directa, pero también de forma indirecta a través de la ionización del agua u otras moléculas próximas (Latorre Travis, E. 1979).

En una población celular, un cierto número de células, más o menos constante, se encuentra en fase proliferativa, ya que se observan células en mitosis. Manteniendo las condiciones estables, el número de mitosis es constante. El cociente entre el número total de células y el número de mitosis se denomina “índice mitótico”.

Cuando se somete a un cultivo celular de índice mitótico conocido a una dosis de radiación baja, se observa que el número de mitosis

disminuye. Más tarde, su número aumenta progresivamente, alcanza la normalidad, la sobrepasa y luego desciende, situándose en los valores previos a la irradiación. Cuando la dosis es todavía mayor, el daño celular radioinducido es también mayor y las células alcanzadas no son capaces de progresar hasta la mitosis. Algunas consiguen recuperarse, pero no todas lo consiguen, por lo que no se observa el retorno a la normalidad ni la sobrecarga mitótica propia de las dosis inferiores. El número de mitosis permanece por debajo de lo normal (Valls y Algara 1994).

Existe evidencia experimental de que el ADN es la diana principal de la muerte celular inducida por radiación. Se pueden dar dosis altas a las membranas plasmáticas y al citoplasma sin causar la muerte celular. Ésta correlacionó estrechamente sólo con dosis dirigidas al núcleo y no contra la membrana plasmática o el citoplasma. (Warters y Hofer 1977).

Debido a la importancia del ADN, las células y los organismos han desarrollado una serie de procesos complejos y vías para asegurarse de que el ADN se mantenga intacto e inalterado del continuo ataque intracelular (por ejemplo, oxidación y alquilación debido al metabolismo) y de fuera (por ejemplo, sustancias químicas ingeridas, radiación ultravioleta y radiación ionizante) (Harper y Elledge 2007). Esto incluye diferentes formas de reparación del ADN para contrarrestar de forma efectiva los diferentes tipos de daño que ha sufrido, inducido por los diferentes agentes.

En cuanto a la respuesta de los tejidos a la radiación existen efectos agudos y tardíos. Entre los tejidos que sufren efectos agudos, que son de reposición rápida, están la piel, los vasos sanguíneos, el epitelio intestinal, la médula ósea, el sistema inmunológico y los órganos germinales. Cada uno de ellos tiene características particulares en cuanto a las dosis que afectan a las células madre y el tiempo que

tardan en reponerse. (Hendry y West 1997).

Los efectos tardíos pueden tener un período de latencia prolongado, son consecuencia de un proceso degenerativo y tienen un curso irreversible y progresivo. Se observan tras la administración de tratamientos con radiaciones ionizantes a volúmenes limitados del organismo y con dosis elevadas. Su mecanismo de producción es bastante uniforme. La destrucción de la población celular parenquimatosa, específica del tejido y generalmente bien diferenciada, es seguida de una curación por reparación: sustitución de tejido conjuntivo fibroso. Además del sistema vascular, cartílago y hueso, entre los órganos de afectación tardía se encuentran: esófago, pulmón, corazón, intestino, riñón, hígado, tiroides, el ojo, testículos, ovarios y el SNC, que es de interés particular en este trabajo (Siegal y Pfeffer 1995). El SNC está formado por células muy especializadas que tienen una limitada capacidad de reproducirse. Los efectos de la radiación sobre estas células pueden no llegar a verse nunca; se consideran radiorresistentes (Valls y Algara 1994).

### **1.19 Estudios electrofisiológicos**

Algunos autores han realizado estudios electrofisiológicos a pacientes con MR con resultados distintos. Entre ellos están la electromiografía, la velocidad de conducción motora y las latencias de la onda F. Los estudios electromiográficos muestran denervación de los músculos estudiados (tibial anterior, peroneos y gemelos, entre otros). Las fasciculaciones son un síntoma que se presenta con frecuencia. Las velocidades de conducción motora varían, ya que los pacientes han sido sometidos a diferentes dosis de radiación en diferentes niveles de la médula espinal y por diversos tipos de tumor, pero por lo general, se observaban más lentas. Las amplitudes distales estaban dentro de la normalidad, así como los potenciales sensoriales. Las latencias de las ondas F se encuentran, la mayoría de las veces, retardadas, y la presencia de descargas mioquímicas son comunes. En el estudio EMG

pueden detectarse signos denervativos crónicos en nervios periféricos (potenciales de unidad motora con aumento de la amplitud y la duración)(Sadowsky y col. 1976; de Carolis y col. 1986; Lamy y col. 1991; Grünewald y col. 1992; Bowen y col. 1996; van der Sluis y col. 2000; Mathis y col. 2007). Estas evidencias sugerían que el daño producido por la radiación podía presentarse a un tiempo más prolongado de lo que se pensaba en un principio y sugería que el daño vascular era un elemento importante a considerar (Grünewald y col. 1992).

Hace tiempo que se realizan estudios electrofisiológicos donde se pretendía evaluar la integridad de la médula espinal, tanto como método diagnóstico, como de funcionalidad, especialmente durante las intervenciones quirúrgicas de médulas espinales dañadas. En 1982, Dorfman y col. encontraron evidencia electrofisiológica de daño subclínico a la médula espinal debido a radioterapia, estimando la velocidad de conducción somatosensorial espinal a través de potenciales evocados en pacientes que habían recibido el tratamiento a la parte torácica por cáncer de pulmón y en individuos controles. Los autores encontraron que la latencia de la onda F se prolongaba en los pacientes en comparación con los controles, pero el tiempo de conducción en la extremidad inferior era similar en ambos grupos. La velocidad de conducción somatosensorial espinal fue significativamente más lenta en los pacientes. La latencia supraespinal fue idéntica y no estuvo relacionada con la dosis total de radiación recibida, pero sí con el tiempo del tratamiento y el número de fracciones. Por tanto, los estudios electrofisiológicos demostraron que la conducción a través de los segmentos irradiados se mostraba disminuída y que la magnitud de la anormalidad estaba relacionada con la tasa de administración de la radioterapia. Además, era posible monitorizar los efectos biológicos de la radioterapia sobre la médula espinal en pacientes de forma individualizada.

En 1991, de Scisciolo y col. llevaron a cabo un estudio electrofisiológico a largo plazo evaluando el daño por radiación a la médula espinal en pacientes que llevaron tratamiento con radio y quimioterapia y que posteriormente fueron estudiados aproximadamente 10 años después del tratamiento. La dosis de quimioterapia fue muy similar en todos los pacientes. La radioterapia fue estándar para 7 de ellos, pero 6 recibieron dosis más altas en regiones pre-definidas de la médula espinal. Los pacientes se observaron normales clínicamente, así como en el estudio de resonancia magnética. También se les realizó un estudio electrofisiológico para determinar hasta donde se había comprometido el sistema nervioso central y periférico. Se midió la velocidad de conducción motora y sensitiva en las extremidades inferiores así como los potenciales evocados en cráneo y médula espinal en respuesta a la estimulación de los nervios sural y tibial en el tobillo. Conjuntamente, los potenciales evocados motores fueron registrados en las extremidades superiores e inferiores durante la estimulación cortical. Todos los datos neurofisiológicos fueron normales en los pacientes que recibieron una dosis de radiación estándar, mientras aquellos que fueron expuestos a dosis más altas de radiación mostraron alteración de los potenciales evocados somatosensoriales (PES) corticales y una disminución del tiempo de conducción central lumbo-cortical así que, aunque los pacientes eran asintomáticos, presentaban daño al sistema nervioso central, principalmente en la médula espinal.

Una pregunta que se suscitó, justificadamente, fue hasta qué punto eran comparables las mediciones de los parámetros electrofisiológicos que se determinaban experimentalmente en animales con las obtenidas en humanos por lo que Allison y Hume (1981) realizaron un análisis comparativo de los potenciales evocados somatosensoriales de latencia corta en ratas, gatos, monos y humanos. Los hallazgos permitieron identificar que los diversos componentes en todos ellos

eran muy semejantes, lo que permitió llevar a cabo estudios en estos animales de experimentación, que son los más comunes, con la certeza de que los resultados podrían ser extrapolables a humanos.

Los estudios electrofisiológicos en ratas donde se describen los métodos para el registro sensorial del nervio plantar medial y lateral y la medición de los PES y motores, muestran que son metodologías útiles y accesibles para la evaluación de la integridad y funcionamiento de la médula espinal, así como que las ratas son un buen modelo animal (Allison y Hume 1981; Kurokawa y col. 2004; Ponsford 1988; Fehlings y col. 1988; Oguzhanoglu y Kurt 2001).

El estudio realizado por Fehlings y col. (1988) ofreció este tipo de información determinando los PES y los potenciales evocados motores en ratas. Ambos parámetros se propagan en vías separadas. Los primeros son conducidos primariamente a lo largo de las vías aferentes en las columnas dorsales y los segundos se propagan a través de las fibras motoras descendentes, por lo que resultan útiles para determinar la integridad de la médula espinal y ambos potenciales son complementarios.

En un estudio electromiográfico de estimulación del nervio ciático con registro en el músculo gemelo realizado por Cavanagh en 1968, donde se comparan los valores de duración del intervalo entre las amplitudes de los animales sometidos a radiación con los valores que presentaron antes de la irradiación, se muestra una diferencia estadísticamente significativa, lo que indica que aún a dosis bajas, el daño a la médula espinal se presenta, aunque no haya evidencias histopatológicas ni diferencias entre algunos parámetros electrofisiológicos. La evaluación se realizó aproximadamente a los 12 meses, que es una edad tardía, como sucede en el ser humano. Cabe comentar que a pesar de que la dosis fue baja, el tiempo de evaluación fue equivalente aproximadamente, a la mitad de la vida de las ratas de esta

especie. Puede suponerse que pacientes que recibieron radioterapia a dosis estándar y que no presentaran anomalías a nivel de médula espinal, no significa que no se haya producido daño alguno, sino que no ha pasado el tiempo suficiente para que las alteraciones se hagan evidentes. La mayoría de las veces, los pacientes fallecen a causa de su problema de inicio (el cáncer) o de complicaciones ulteriores, o bien, no se les diagnostica como MR sino como otro tipo de problema neurológico, así que los estudios electrofisiológicos permiten detectar los daños subclínicos y son recomendables para el seguimiento de los pacientes.

### **1.20 Potenciales evocados somatosensoriales**

En el proceso de la revisión bibliográfica se observó que hasta el momento no se han publicado trabajos en donde se hayan determinado los PES en animales de experimentación (ratas) sometidos a radiación en la región lumbo-sacra de la médula espinal.

Un (PES) es la manifestación eléctrica de la respuesta cerebral o de la vía somestésica tras la aplicación de estímulos eléctricos, mecánicos o de otra naturaleza en las fibras aferentes sensitivas de los nervios periféricos. El estudio de los PES se realiza mediante técnicas incruentas de fácil aplicación clínica, que mediante una metodología apropiada, aportan datos objetivos sobre el funcionamiento de la vía somestésica periférica y central y potencian la sensibilidad diagnóstica de la exploración neurológica, ya que se pueden detectar lesiones subclínicas. Los PES permiten el estudio de los segmentos proximales del sistema nervioso periférico que son inaccesibles a las técnicas neurofisiológicas estándar (López Alburquerque 2008a).

En la conducción del estímulo eléctrico que origina el PES, participan mayoritariamente las fibras nerviosas de mayor calibre y de conducción más rápida: las fibras tipo IA (aferentes musculares y las



tipo II (aférentes cutáneas), cuya velocidad de conducción es de aproximadamente 60-75 m/s en el antebrazo. En el SNC el impulso es conducido ipsilateralmente por los cordones posteriores hasta el núcleo de Goll (*nucleus gracilis*), cuando el estímulo se aplica en los miembros inferiores, y hasta el núcleo de Burdach (*nucleus cuneatus*), cuando se estimula un nervio de los miembros superiores. En estos núcleos se establece la primera sinapsis. El impulso continúa su trayecto por el lemnisco medio hacia el núcleo ventral posterolateral contralateral del tálamo en donde tiene lugar la segunda sinapsis. Finalmente, el estímulo llega al área somestésica primaria del córtex parietal postcentral (tercera sinapsis).

La sección experimental de los cordones posteriores en animales o la ablación criogénica del núcleo ventral posterolateral del tálamo, reducen sensiblemente e incluso anulan el PES cerebral, pero no se modifica cuando la sección se limita a los fascículos espinotalámicos. Si se aplica un estímulo suficientemente intenso (doloroso) para estimular fibras tipo III y IV, puede haber conducción extralemniscal (Cusick y col. 1979).

La identificación de algunos componentes de los PES, que son de obtención obligada, y los tiempos de conducción obtenidos mediante las latencias interpicos, son los parámetros de aplicación clínica más importantes. En general, un aumento de los tiempos de conducción indica la presencia de lesión de tipo desmielinizante. Por el contrario, es más incierta la relación entre el descenso de la amplitud y la pérdida axonal. Existe incertidumbre sobre la exacta ubicación de los generadores anatómicos de algunos componentes de los PES (López-Alburquerque 2008a).

En aquellos estudios en donde se realizaron pruebas de conducción nerviosa (PES Y EMG), los sujetos sometidos a radiación presentaron valores normales (Fisher 2002; Lecky y col. 1980), aunque no todos

(de Scisciolo y col. 1990), pues los individuos expuestos a las altas dosis mostraron PES corticales alterados (Magrini y col. 1990). En otros se observó disminuida la velocidad de conducción motora (Snooks y Swash 1985).

## **2. HIPÓTESIS**



La irradiación de la columna lumbosacra de ratas, mediante una dosis baja de fotones de rayos X, produce unas lesiones subclínicas tardías en los cordones posteriores y en las astas anteriores de la médula y/o raíces nerviosas que pueden ser detectadas mediante estudios neurofisiológicos y/o histopatológicos.



### **3. OBJETIVOS**





### **3.1. Objetivo General**

Determinar mediante diferentes técnicas neurofisiológicas (electromiografía, conducción nerviosa motora y potenciales evocados somatosensoriales) e histopatológicas (morfométricas) las probables lesiones medulares y/o radicales producidas por una dosis baja de irradiación con fotones de rayos X en la región lumbo-sacra de la médula espinal de ratas de 4 meses de edad a los 12 meses post-irradiación.

### **3.2. Objetivos específicos:**

1. Irradiar ratas de 4 meses de edad con una dosis única de 22 Gy de fotones de rayos X en la región lumbo-sacra de la médula espinal para determinar su efecto lesivo.
2. Realizar estudios electromiográficos y de conducción nerviosa para investigar la presencia de signos denervativos y pérdida de unidades motoras como consecuencia de una posible lesión de las astas anteriores de la médula espinal y/o de las raíces nerviosas.
3. Obtener los potenciales evocados en corteza cerebral resultantes de la estimulación de nervios mixtos de extremidades inferiores para evaluar la conducción de la vía somestésica periférica y central, particularmente de las raíces posteriores y/o cordones posteriores de la médula.

4. Identificar las posibles lesiones histopatológicas de las astas anteriores y/o fascículos medulares, particularmente los corticoespinales y cordones posteriores, mediante diferentes técnicas histológicas e inmunocitoquímicas.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

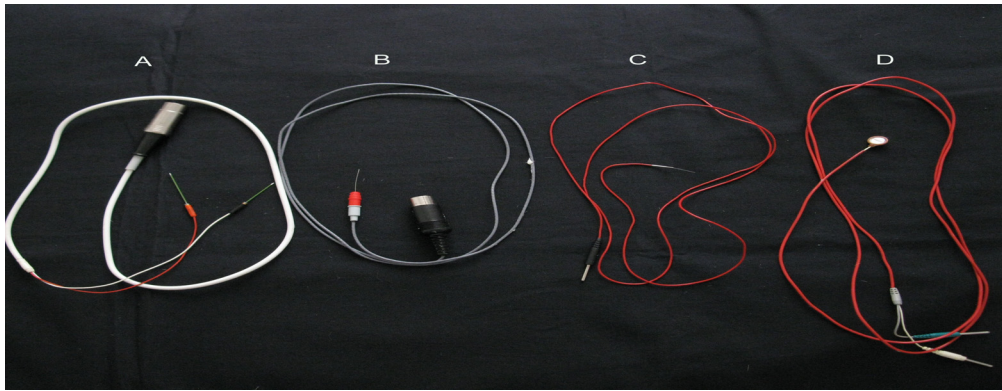


#### **4.1 Animales y métodos**

Se utilizaron 19 ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 4 meses de edad y 230-250 gramos de peso. Todos los animales de experimentación se mantuvieron en condiciones normales de animalario convencional con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y proporcionándoles comida y agua *ad libitum* y con tratamiento de acuerdo a las normas establecidas para animales de laboratorio por la legislación española y europea. Se les evaluó su condición motora y su peso con una periodicidad de aproximadamente 1 mes.

A cada animal se le realizó, bajo anestesia, un estudio electrofisiológico con un electromiógrafo Nihon Kohden Neuropack Four, con cuatro canales amplificadores, que consistió en lo siguiente: 1) electromiografía de los músculos en gemelos de ambas extremidades posteriores, 2) conducción motora del nervio ciático y 3) potenciales evocados somatosensoriales. Se realizaron dos estudios en cada animal: el primero antes de la irradiación y el segundo antes de ser sacrificados para el estudio anatomopatológico.

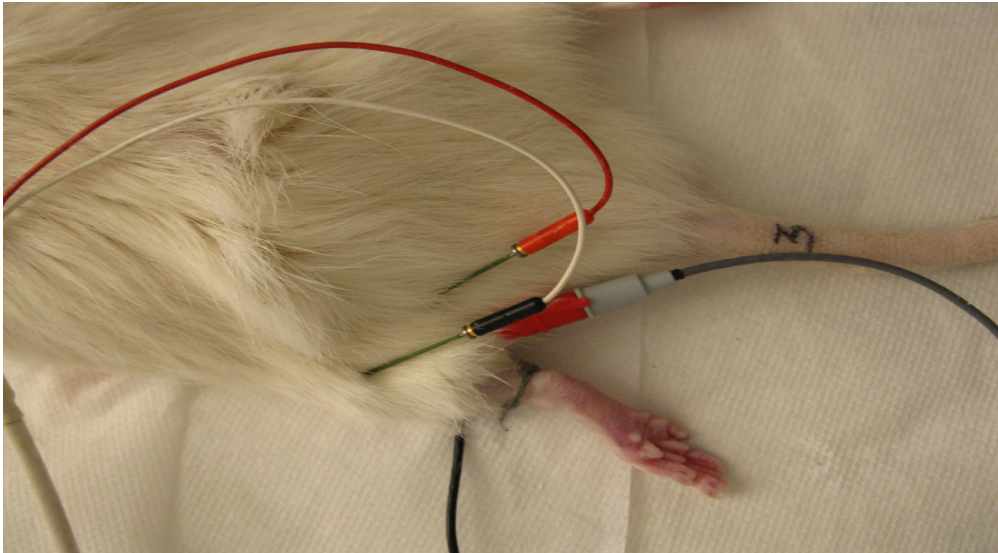
1. Electromiografía. Para el estudio electromiográfico se utilizaron electrodos coaxiales de aguja (Figura 1B).



**Figura 1:**Conjunto de electrodos utilizados en los diferentes estudios electrofisiológicos. **A:** par de electrodos monopolares para la estimulación del nervio ciático. **B:** Electrodo coaxial de aguja para el estudio electromiográfico y la obtención del potencial de acción motor en gemelo. **C:** Electrodo monopolar de aguja para la estimulación del nervio plantar interno. **D:** Electrodo circular superficial para el registro del potencial de acción compuesto motor de los músculos plantares y de los potenciales evocados somatosensoriales.

Se insertaron en al menos tres puntos de los músculos gemelos de ambas extremidades posteriores. Se evaluó fundamentalmente la presencia de actividad espontánea: fibrilaciones, ondas positivas, fasciculaciones, mioquimias o descargas repetitivas complejas. El registro se realizó utilizando una sensibilidad del electromiógrafo de 50  $\mu\text{V}$ /división, un tiempo de estudio de 100 ms y una banda de frecuencias entre 20y 10000 Hz.

2. Conducción nerviosa motora. El estudio de conducción motora se realizó en el nervio ciático izquierdo de cada animal. Se estimuló el nervio a su salida de la pelvis, en la raíz del miembro inferior, con un electrodo monopolar de aguja situando el electrodo referencial 2 cm lateral (Figuras 1A y 2).

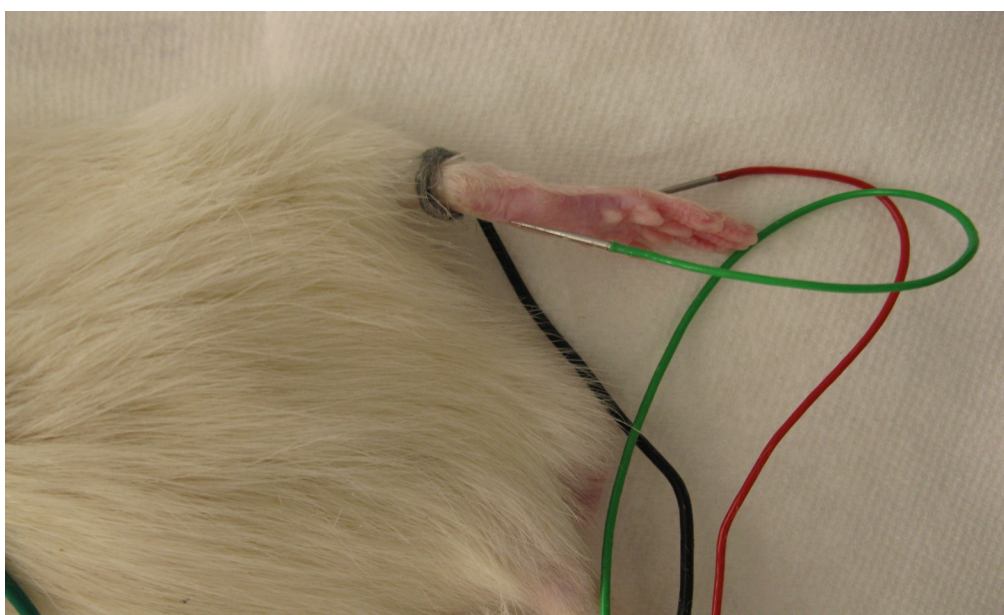


**Figura 2:** Técnica de registro de la conducción motora del nervio ciático. Los dos electrodos superiores son los estimuladores (activo el rojo y referencial el negro). El tercer electrodo (coaxial de aguja) está insertado en el músculo gemelo.

La respuesta motora se recogió en gemelos, con electrodo coaxial de aguja, y en músculos plantares (potencial de acción compuesto motor) mediante electrodos superficiales circulares de Ag/AgCl (Figura 1D).

El electrodo activo se colocó en la planta del pie y el referencial en el dorso. Se aplicó un gel conductor entre la piel y el electrodo y se fijaron con cinta adhesiva. La intensidad del estímulo se fue aumentando hasta la obtención de la respuesta de máxima amplitud. Las latencias de las respuestas se midieron desde el punto de estímulo a inicio del despegue del potencial desde la línea de base. La amplitud se midió de la línea de base-pico y pico-pico. También se evaluó la latencia de la respuesta F en los músculos plantares.

3. Potenciales evocados somatosensoriales (PESs). Se realizaron estimulando de forma individualizada y secuencial el nervio plantar interno de ambas extremidades posteriores con un electrodo monopolar de aguja en la región medial de la planta del pie colocando el electrodo referencial en el dorso del mismo (Figuras 1C y 3).



**Figura 3:** Técnica de estimulación nerviosa para la realización de los potenciales evocados somatosensoriales. Puede observarse el electrodo estimulador monopolar de aguja (verde), insertado en la planta del pie sobre el nervio plantar interno y el electrodo referencial (rojo) en el dorso del pie. El tercer electrodo(negro) es la conexión a tierra.

La respuesta se recogió en córtex utilizando electrodos superficiales circulares de EEG (Figura 1D). El electrodo activo se colocó en la línea interauricular y el referencial en el extremo de la nariz (Figura 4).



**Figura 4:** Colocación de los electrodos cefálicos para el registro de los potenciales evocados somatosensoriales. El electrodo activo (verde) y referencial (rojo) se



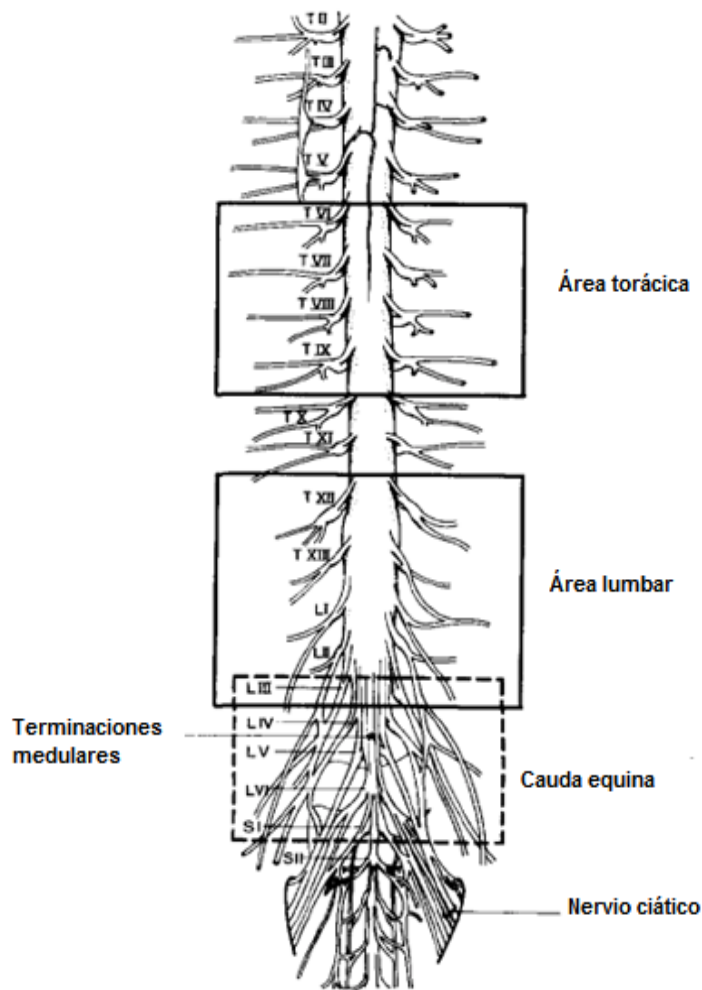
colocaron mediante pasta conductora sobre una superficie previamente rasurada y escarificada mediante un producto abrasivo y, finalmente, limpiada con alcohol.

Previamente, se rasuró la cabeza y se limpió con una sustancia abrasiva y posteriormente con alcohol, para reducir la impedancia de los electrodos ( $<10 \Omega$ ), que se fijaron mediante pasta conductora. Se aplicaron 500 estímulos a una frecuencia de 5 Hz, con una intensidad suficiente para producir una leve contracción de los dedos del pie. El tiempo de estudio se estableció en 20 ms, la sensibilidad en 20  $\mu\text{V}$ /división y la banda de frecuencia se acotó entre 20 y 1000 Hz. Todos los estudios se realizaron dos veces para confirmar la persistencia de los registros y los trazados resultantes de la promediación digital se guardaron para su posterior análisis. Se estudió la morfología, latencia y amplitud de los potenciales precoces P1, N1 y P2.

#### **4.2 Irradiación de los animales de experimentación**

Se utilizaron 5 ratas de similar edad y peso como controles y 14 ratas fueron irradiadas con fotones de un acelerador lineal de electrones modelo Primus de la firma comercial Siemens. Los fotones tienen una energía nominal de 6 MeV.

Se empleó un haz de irradiación de 20 x 10 milímetros, calibrado para administrar una dosis de 22 Gy a 15 mm de profundidad, en una sola sesión, estando la superficie del volumen a irradiar a 100 cm de distancia del foco del acelerador.



**Figura 5:** Diagrama de la médula espinal de la rata y raíces adaptado de Greene (1968), mostrando las áreas diana de irradiación: torácica, lumbar y cauda equina. En este trabajo el área irradiada abarcó la parte baja lumbar, la sacra y un pequeño fragmento caudal.

Como la médula está aproximadamente a 8 mm de profundidad y la dosis se deposita a 15 mm, se colocó sobre cada animal, 6 mm de sustancia equivalente a tejido (PMMA). De esta forma los 22 Gy se depositaron a 9 mm de profundidad en el animal. El área se ubicó a aproximadamente a 3,0 cm de distancia de la base de la colay fue de 1,5 cm de largo por 1,0 cm de ancho (Figura 5). El tiempo de irradiación para cada animal fue de 14,15 minutos, es decir 14 minutos y 9 segundos, con lo que la tasa de dosis fue de 1,55 Gy/min.

### 4.3 Evaluación histológica

#### Animales

Como se ha mencionado anteriormente los animales se mantuvieron en condiciones estándar durante todo el periodo de experimentación, incluyendo el periodo de adaptación previo al inicio del trabajo.

#### Perfusión y obtención de las secciones de tejido

Los animales fueron anestesiados profundamente con Equitesina (2,4 mg por kg vía intraperitoneal), heparinizados y perfundidos a través de la aorta con 50 ml de solución salina (9 g/l de NaCl) y a continuación, con 500 ml de paraformaldehído al 4% en tampón PBS (pH 7,2) (solución fijadora).

Se extrajeron encéfalo y médula espinal de cada uno de los animales. Se etiquetaron y, posteriormente, se realizó la post-fijación durante doce horas en la misma solución fijadora (Paraformaldehído al 4%).

A continuación, el material se introdujo en una solución creciente de sacarosa comenzando al 5% (lavado del excedente de fijador) hasta llegar al 30% de sacarosa en tampón PBS; la sacarosa se introduce en el tejido cambiando la densidad del mismo, por lo que los baños se cambian tras el hundimiento del encéfalo (5→10→15→20→25→30%). Después de mantener el tejido durante un periodo de 2-3 días en la concentración superior (30%) se consideró finalizada la crioprotección. Todo el proceso fue realizado a 4°C (Mangas y col. 2007).

Utilizando un criostato, se obtuvieron secciones seriadas transversales de entre 10 y 12µm. A las secciones obtenidas se les aplicó una técnica inmunocitoquímica indirecta con diferentes marcadores y técnicas morfológicas.

### Técnica Inmunocitoquímica

Mediante técnicas inmunocitoquímicas se obtuvo información acerca de:

a) la integridad del sistema nervioso con un anticuerpo panleucocítico (anti-CD45) que nos permitirá ver si la barrera hematoencefálica se encuentra alterada. Si esto es así, se encontrarán infiltrados de leucocitos en la médula espinal, que en condiciones normales no se localizan. De una forma indirecta, esto sirve también para evaluar una posible inflamación en caso de que persistiera (Mangas y col. 2006, 2008, 2009a).

b) evaluar la normalidad en sistemas bien definidos de sustancias como el CGRP, SP, acetilcolina, que de una forma indirecta, dan una idea del mantenimiento de las funciones de la médula, es decir, verificar si han sido alterados los sistemas. De este modo, se comparan los animales sometidos a la exposición de radiación ionizante con los controles (animales no irradiados).

La técnica previamente descrita (Mangas y col.. 2006, 2007, 2008, 2009a y b; Coveñas y col. 2010) consta de los siguientes pasos:

Dos horas antes de la realización de la técnica, los portaobjetos que contienen las secciones seriadas son sacados del congelador y se lavan en PBS durante unos diez minutos con el fin de que las secciones de tejido no se despeguen de los portaobjetos.

1- Tratamiento de las secciones con una solución compuesta de 1/3 de peróxido de hidrógeno al 33% y 2/3 de metanol al 99,5% durante un periodo de treinta minutos. Este proceso se realiza para inactivar las peroxidasas endógenas. A continuación, se lavan las secciones en PBS durante un periodo de diez minutos. Este proceso se repite tres veces.

2- Preincubación de las secciones en tampón PBS con 1% de suero normal de caballo y 0,3% de Tritón X-100 (solución mezcla) durante un periodo de treinta minutos a temperatura ambiente.

3- Incubación con el primer anticuerpo anti-Sustancia P (1/3000-1/5000), anti-CGRP (1/5000), anti-Acetilcolina (1/200-1/500), anti-L-Glutamato (1/500-1/1000), anti-CD45 (1/200) diluidos en la solución mezcla durante un periodo de dos horas y posteriormente, se mantienen las secciones durante doce horas a 4° C.

4- Transcurrido ese tiempo, se realizan dos lavados de las secciones en PBS durante diez minutos a temperatura ambiente y en agitación.

5- Se realiza un lavado posterior en la solución mezcla durante veinte minutos a temperatura ambiente.

6- A continuación, se lleva a cabo la incubación con el segundo anticuerpo diluido 1/200 (biotinilado anti-conejo (Vector, USA) para las secciones que fueron incubadas previamente en el paso 3 con anti-Sustancia P, anti-CGRP, anti-L-Glutamato y biotinilado anti-ratón (Vector, USA) para aquellas que fueron incubadas en el paso 3 con anti-Acetilcolina y anti-CD45 en la solución mezcla y durante un periodo de una hora a temperatura ambiente.

7- Posteriormente, se efectúan varios lavados de diez minutos con PBS, a temperatura ambiente y en agitación.

8- Tras el lavado, se incuban las secciones con el complejo Vectastain ABC (Vector) diluido 1/100 en la solución mezcla durante un periodo de una hora a temperatura ambiente.

9- A continuación, se efectúan varios lavados en PBS durante un tiempo mínimo de diez minutos por lavado, en agitación y a temperatura ambiente.

10- En el siguiente paso se realizan dos lavados en TRIS tampón durante un tiempo aproximado de diez minutos a temperatura ambiente.

11- Finalmente, se lleva a cabo el revelado de la peroxidasa con 3,3'-diaminobenzidina (33,2mg) en 100 ml de Tris-ClH y 50µl de peróxido de hidrógeno al 33%. El periodo de revelado es variable según los distintos marcadores, la mayoría de ellos han precisado unos tiempos aproximados de 10 minutos. Algunos requirieron tiempos ligeramente superiores, como el CD45, dada la lentitud del revelado.

12- Tras el revelado (paso 11), se lavan exhaustivamente las secciones en PBS y posteriormente se añade el medio de montaje (Glicerol/Sörensen) en proporción 1:1 y se coloca el cubreobjetos.

### Técnicas Histológicas

Dada la complejidad del estudio, se han realizado diferentes técnicas histológicas para corroborar los resultados que se obtienen mediante las técnicas inmunocitoquímicas. Así pues, se han realizado hematoxila-eosina (HE), inmersión del tejido en tetraóxido de Osmio (OsO<sub>4</sub>) y Luxol Fast Blue (LFB). La HE se desarrolló con el objetivo de evaluar la integridad del tejido de una forma general, y en particular, la presencia o no de infiltrados, así como para la diferenciación de las distintas regiones por comparación con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson 1982.

Protocolos seguidos para la realización de estas técnicas:

Al igual que para la realización de las técnicas inmunocitoquímicas, los portaobjetos que contienen las secciones seriadas, son sacados del

congelador al menos 2 horas antes, posteriormente se lavan en PBS durante unos diez minutos con el fin de que las secciones no se despeguen de los portaobjetos.

#### *Hematoxilina-Eosina*

- 1) Agua destilada (5-10 minutos)
- 2) Hematoxilina (10 minutos)
- 3) Lavar en agua corriente (30 minutos)
- 4) Eosina (5 minutos)
- 5) Alcohol 50% (10 segundos)
- 6) Alcohol 70% (10 segundos)
- 7) Alcohol 80% (30 segundos)
- 8) Alcohol 96% (5 minutos)
- 9) Alcohol 100% I (5 minutos)
- 10) Alcohol 100% II (5 minutos)
- 11) Xileno I (5 minutos)
- 12) Xileno II (5 minutos)
- 13) Xileno III (5 minutos)
- 14) Montar en Entellán (Merck)

#### *Luxol Fast Blue*

- 1) Agua destilada (5-10 minutos)
- 2) Alcohol 95% (varios lavados)
- 3) Luxol 0,1% en Alcohol 95% (noche a 37°C)
- 4) Alcohol 95% (varios lavados)
- 5) Lavado en agua destilada
- 6) Inmersión en Carbonato de Litio (15 segundos)(\*)
- 7) Alcohol 70% (30-60 segundos)(\*)
- 8) Lavado en agua destilada
- 9) Cresil Violeta 0,1% (10 minutos a 37°C)
- 10) Lavado en agua destilada
- 11) Lavado en Alcohol 70%
- 12) Diferenciación en Alcohol 95% (\*\*)

- 13) Alcohol 100% I (5 minutos)
- 14) Alcohol 100% II (5 minutos)
- 15) Xileno I (5 minutos)
- 16) Xileno II (5 minutos)
- 17) Xileno III (5 minutos)
- 18) Montar en Entellán (Merck).

(\*) Se diferencia hasta que las sustancias blanca y gris se aprecian claramente. En ocasiones hay que repetir varias veces.

(\*\*) Se diferencia hasta que los núcleos se distinguen.

#### *Tetraóxido de Osmio*

Esta técnica es utilizada comúnmente en microscopía electrónica para la cual los bloques se sumergen en esta solución. En este trabajo se utilizó la de inmersión de los portaobjetos en la solución de OsO<sub>4</sub>.

- 1) Lavado abundante en agua destilada para evitar la formación de cristales con el PBS.
- 2) Inmersión de los portaobjetos en una solución acuosa de OsO<sub>4</sub> al 0,5% (durante 4 horas a temperatura ambiente y noche a 4°C).
- 3) Lavado abundante en agua destilada.
- 4) Añadir el medio de montaje (Glicerol/Sörensen) en proporción 1:1 y colocar el cubreobjetos. Posteriormente, sellar el portaobjetos para evitar que se oxide antes de la evaluación.

#### Cartografía

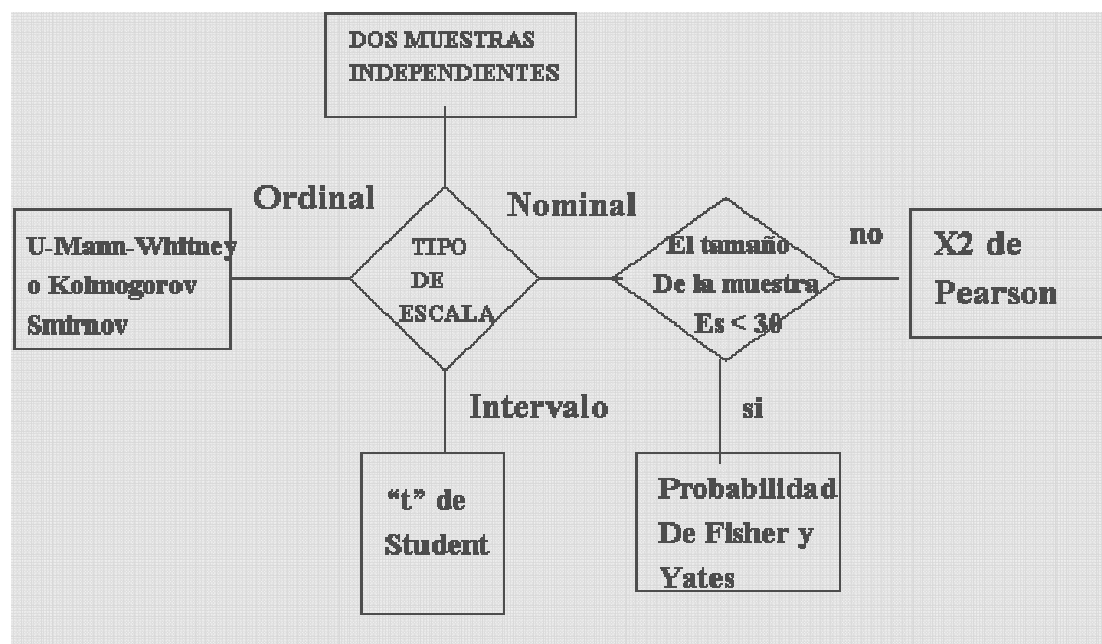
Como se ha mencionado anteriormente, para la cartografía de las secciones tratadas se utilizó el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson 1982.



Las microfotografías presentadas en este trabajo fueron obtenidas con una cámara digital Olympus DP50 acoplada a un microscopio Kyowa Unilux 12. Para una mejor visualización de los resultados se ajustó únicamente el brillo y contraste de las capturas. No se realizó ninguna otra manipulación de las imágenes. La confección de las figuras con microfotografías y los ajustes de brillo y contraste fueron realizados con Adobe Photoshop Elements 2.0.

#### 4.4 Análisis estadístico

Se analizaron los datos estadísticamente de acuerdo a los procedimientos estipulados por las propias características de los datos y en función de lo que se pretendía estudiar. Para ello, se tomó como referencia lo señalado por Castilla y Cravioto (1991) (Figuras 6 y 7).



**Figura 6:** Diagrama de flujo para la toma de decisiones de la prueba estadística a elegir de acuerdo a las características de los datos a analizar (Castilla 1991).

En este caso, se tienen dos muestras dependientes (antes y después de la radiación). Se aplicó la prueba de  $\chi^2$  de Bartlett para determinar si había o no homogeneidad de varianzas. En caso de que se presentase, se utilizó la prueba de  $t$  de Student para muestras dependientes y en el caso en que no fuera así, se utilizó la prueba de Wilcoxon, colocando los datos de forma ordinal como indica el flujograma. En caso de que

no se presentara homogeneidad de las varianzas se utilizó la prueba  $t$  de student-Welch, o bien, la prueba U de Mann-Whitney.



**Figura 7:** Diagrama de flujo para la toma de decisiones para la elección de la prueba estadística en caso de muestras dependientes (Castilla 1991).



## **5. RESULTADOS**

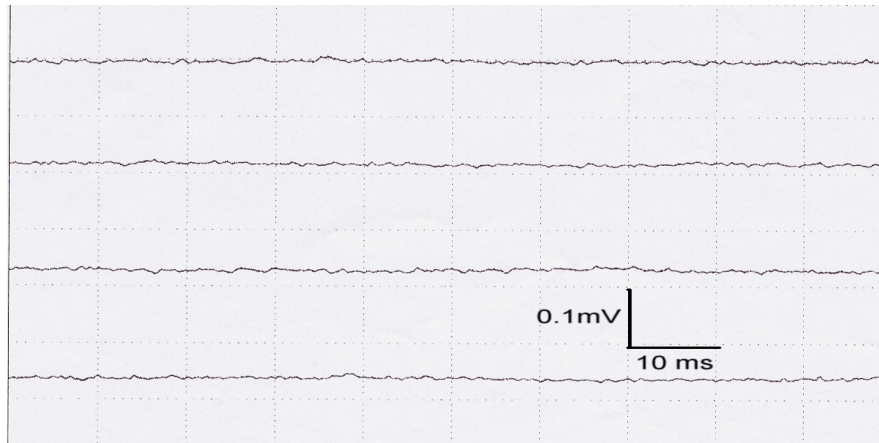
Ninguna rata presentó signos deficitarios neurológicos ni murió por causa de la irradiación durante el periodo del estudio. Tres ratas murieron por otras causas.

### **5.1 Electromiografía**

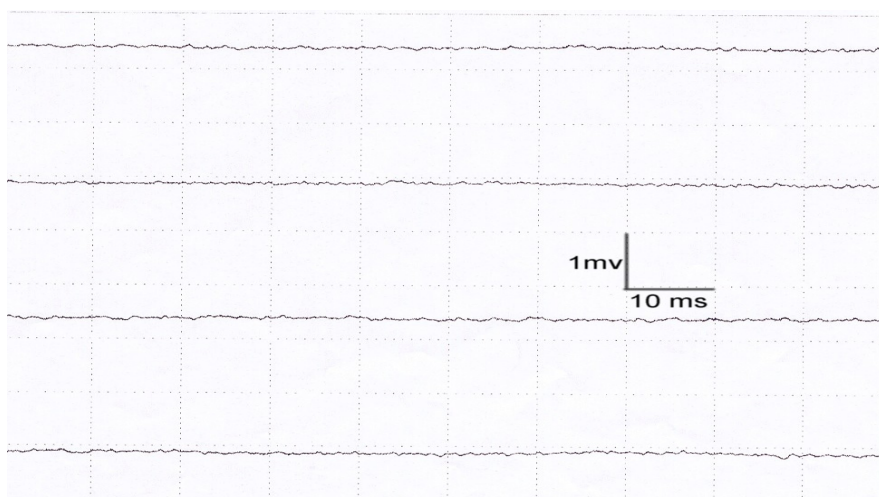
El estudio electromiográfico de los músculos gemelos de ambas extremidades inferiores no mostró ninguna actividad espontánea en

repososugestiva de denervación aguda (fibrilaciones u ondas positivas), tanto en el estudio basal como en el estudio post-irradiación (Figura 8).

**A**

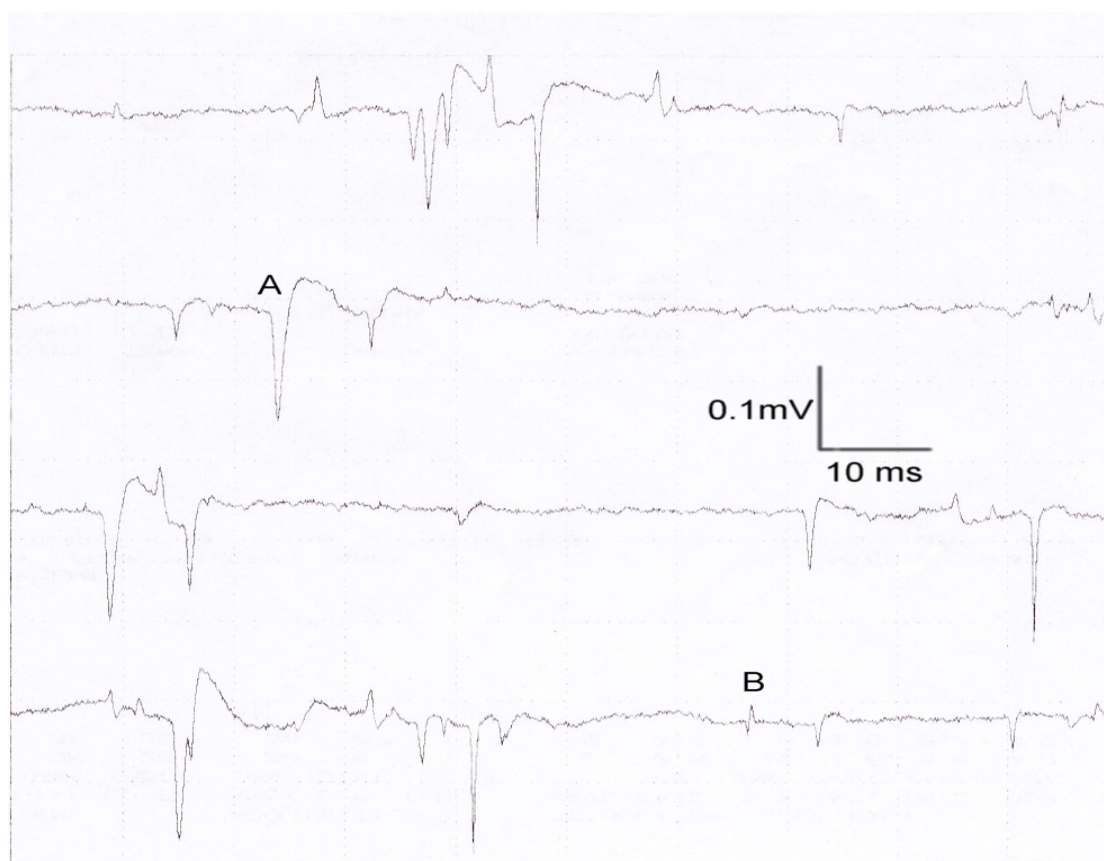


**B**



**Figura 8:** Registro electromiográfico del músculo gemelo de una rata antes (**A**) y después (**B**) de la irradiación. Aparece silencio eléctrico constituido por una línea isoelectrica. No se detectan signos denervativos agudos. ms: milisegundos. mV: milivoltios

En la figura 9 se muestran las alteraciones que se registran en un músculo en reposo tras una lesión nerviosa tipo neurotmesis. Debido a que el registro se realizó bajo anestesia, no pudo efectuarse un estudio de potenciales de unidad motora por activación muscular voluntaria.

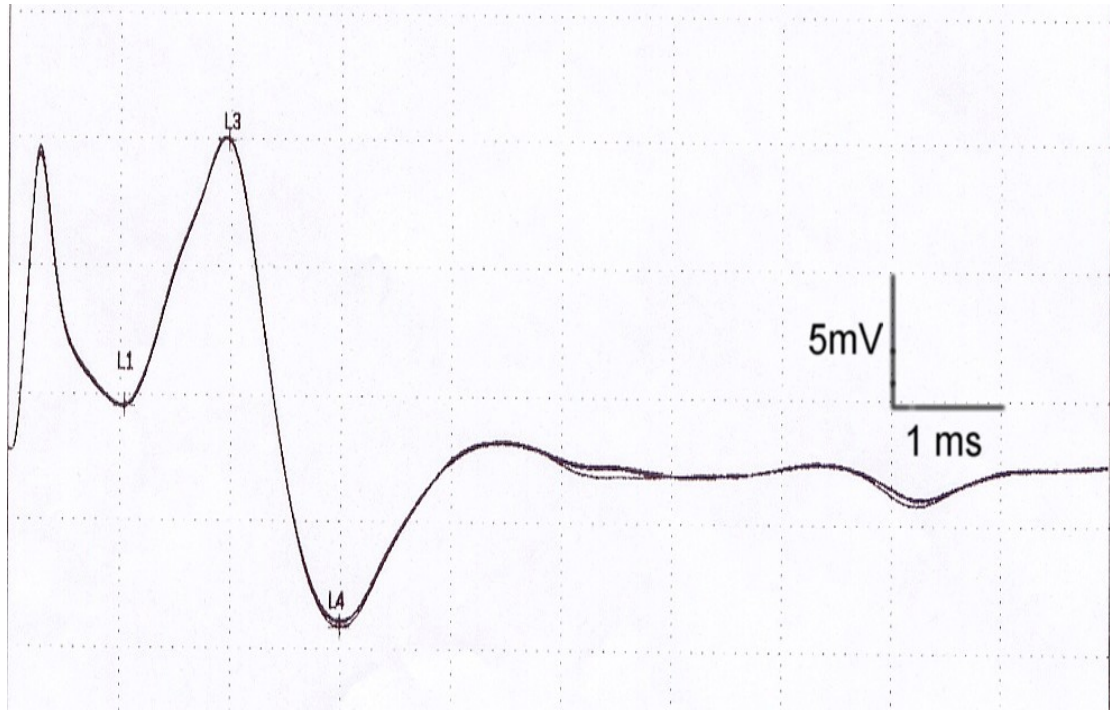


**Figura 9:** Ondas positivas (A) y fibrilaciones (B) registradas en el músculo gemelo de una rata anestesiada a la que se le había realizado cuatro semanas antes una sección del nervio ciático. ms: milisegundos. mV: milivoltios

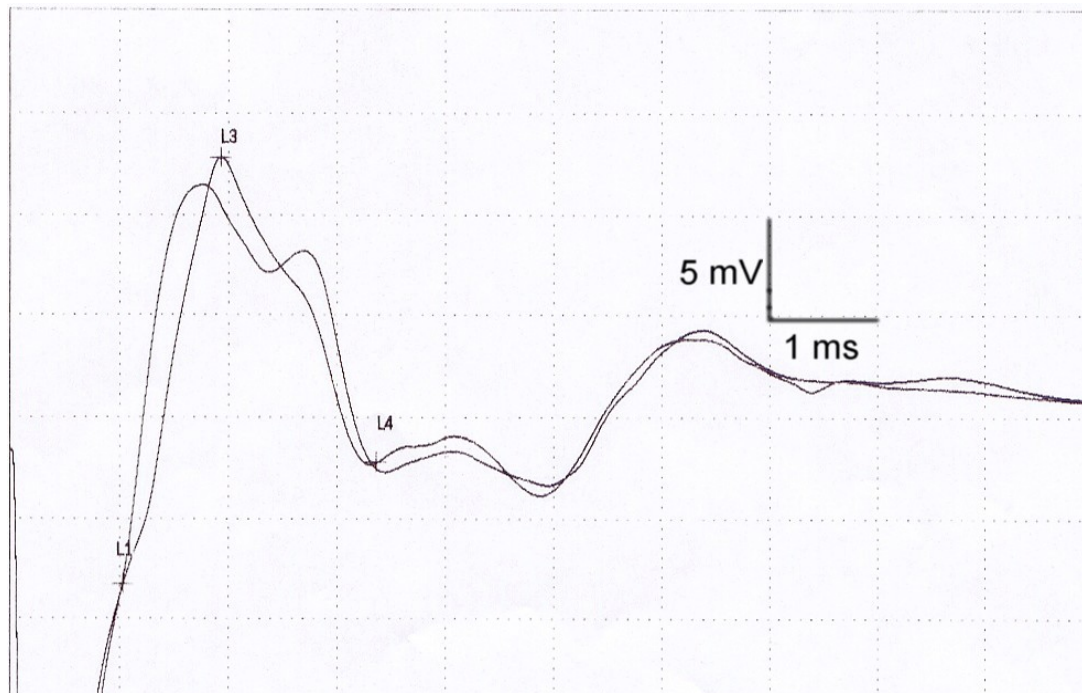
## 5.2 Conducción nerviosa motora

En todos los animales, al estimular el nervio ciático, se obtuvieron potenciales de acción motores en los músculos gemelos y en los plantares, tanto en situación basal, como tras la irradiación. Asimismo, se registró sistemáticamente la onda F en los músculos plantares (Figuras 10 y 11).

**A**



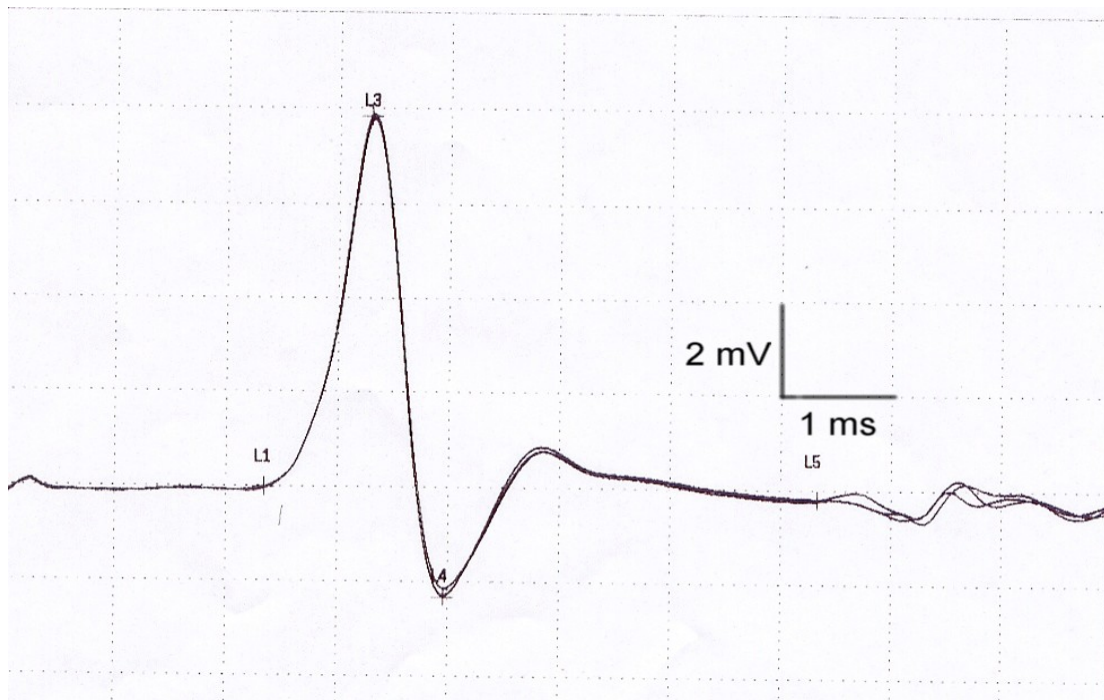
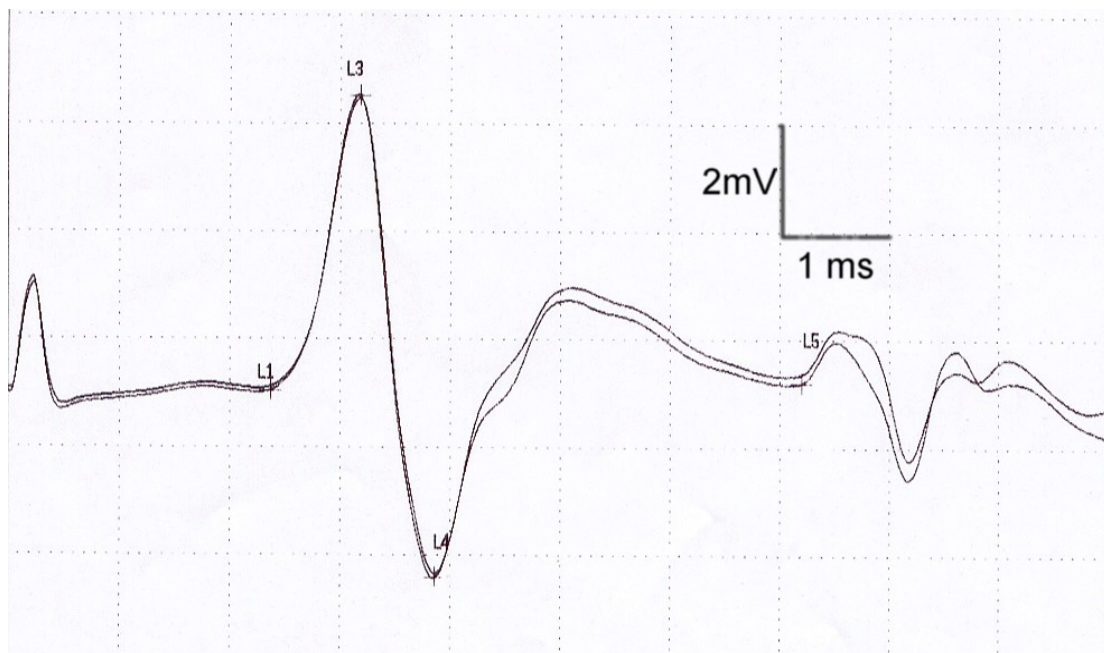
**B**



**Figura 10:** Potencial de acción motor obtenido en gemelo mediante electrodo coaxial de aguja tras la estimulación del nervio ciático en una de las ratas, antes (**A**) y después (**B**) de la irradiación. No se observan diferencias significativas en la latencia, duración y amplitud de los potenciales. ms: milisegundos; mV: milivoltios

**A**



**B**

**Figura 11:** Potencial de acción compuesto motor de los músculos plantares recogido con electrodos superficiales tras la estimulación del nervio ciático, antes (**A**) y después (**B**) de la irradiación. Los diferentes parámetros del potencial (latencia, amplitud y duración) son similares en ambos registros. A la derecha del registro (L5) aparece la onda F. ms: milisegundos; mV: milivoltios

Las latencias medias registradas en el músculo gemelo pre y post-irradiación no mostraron diferencias significativas. Tampoco se

observaron en la amplitud. La duración del potencial fue significativamente mayor en el estudio post-irradiación.

**Tabla III:** Resultados de la latencia, duración y amplitud del potencial evocado motor obtenido en el músculo gemelo de las ratas pre (A) y post-irradiación (B). Asimismo, se muestran las latencias de la onda F. Todos los valores se expresan en medias y desviaciones estándar. El asterisco (\*) señala las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

LATENCIA (ms)		DURACIÓN (ms)		AMPLITUD ( $\mu$ V)				ONDA F (ms)	
				(B-P)		(P-P)			
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1,11 $\pm$ 0,20	1,22 $\pm$ 0,54	1,83 $\pm$ 0,67	2,38 $\pm$ 0,44*	11,03 $\pm$ 8,29	16,23 $\pm$ 9,74	19,97 $\pm$ 10,54	17,79 $\pm$ 6,75	6,01 $\pm$ 0,81	7,21 $\pm$ 2,80

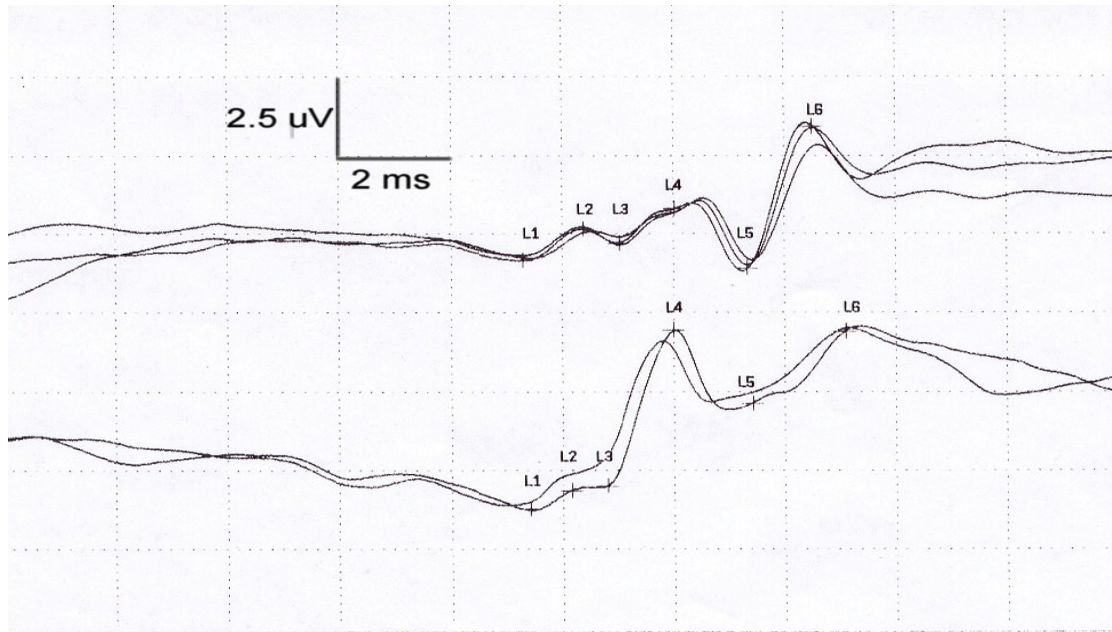
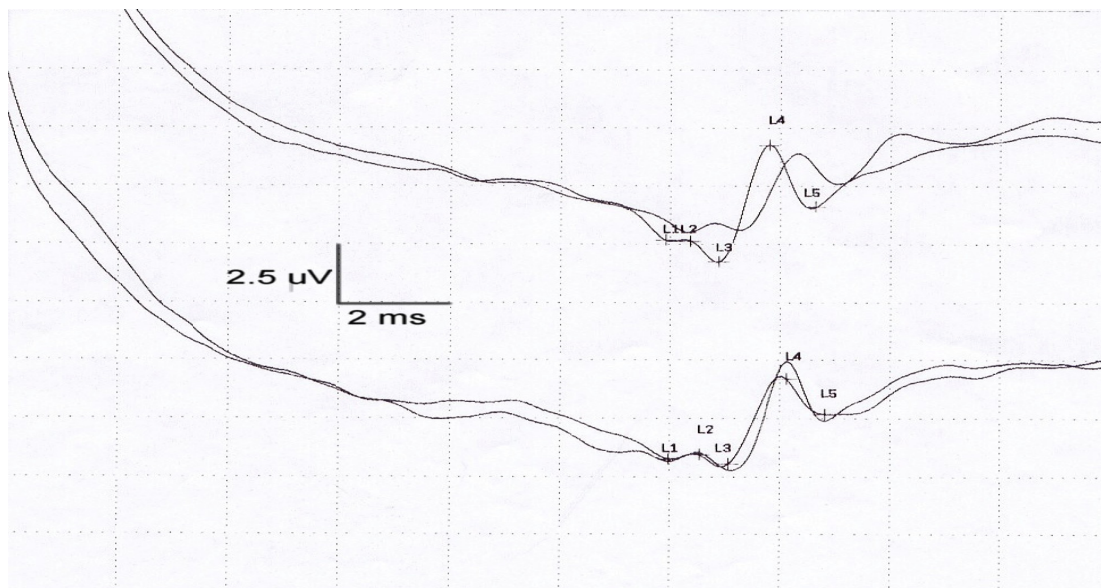
No se observó una diferencia significativa entre los valores de las latencias pre y post-irradiación del potencial compuesto motor obtenido en los músculos plantares, en su duración ni en su amplitud. Por el contrario, se observó una diferencia significativa ( $p < 0,01$ ) entre las latencias pre y post-irradiación de la onda F (Tablas III y IV).

**Tabla IV:** Resultados de la latencia, duración y amplitud del potencial evocado motor obtenido en músculos plantares de las ratas pre (A) y post-irradiación (B). Asimismo, se muestran las latencias de la onda F. Todos los valores se expresan en medias y desviaciones estándar. El asterisco (\*) señala las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

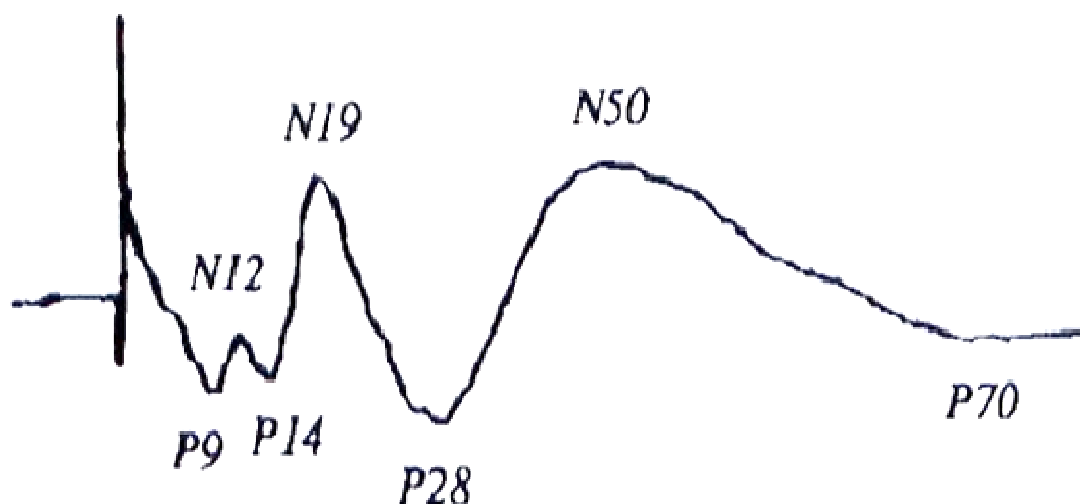
LATENCIA (ms)		DURACIÓN (ms)		AMPLITUD ( $\mu$ V)				ONDA F (ms)	
				(B-P)		(P-P)			
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
2,32 $\pm$ 0,20	2,18 $\pm$ 0,44	1,98 $\pm$ 0,71	1,80 $\pm$ 0,78	4,18 $\pm$ 1,92	3,53 $\pm$ 2,02	6,05 $\pm$ 1,95	6,05 $\pm$ 3,56	7,66 $\pm$ 0,37	6,93 $\pm$ 0,54*

### 5.3 Potenciales evocados somatosensoriales

En todas las ratas estudiadas, tanto controles como irradiadas, se obtuvieron los PES y se pudo identificar el primer potencial positivo que se considera como la llegada del estímulo al córtex somatosensorial (Figura 12). Como puede observarse, la morfología es similar a los PES obtenidos en ratas con electrodos epidurales (Figura 13). La comparación de los valores obtenidos de latencia del primer potencial positivo del grupo de ratas irradiadas no mostraron diferencias estadísticamente significativas con los obtenidos de las ratas control (probabilidad de t de student de 0,08) (Tabla V).

**A****B**

**Figura 12: A.** Potencial evocado somatosensorial en una rata post-irradiación. El registro superior corresponde a la estimulación del nervio plantar interno de la pata derecha y el inferior a la pata izquierda. **B.** Similar registro en una rata control, cuya morfología típica está constituida por dos componentes positivos iniciales de baja amplitud (L1 y L3) seguidos de un tercer componente negativo (L4) de mayor amplitud. ms: milisegundos;  $\mu$ V: microvoltios



**Figura 13:** Morfología de PES registrados en una rata con electrodos intracraneales epidurales y tiempo de análisis de 100 ms. Pueden observarse dos potenciales positivos iniciales de baja amplitud (P9 y P14) seguidos de un potencial negativo de mayor amplitud (N19) considerado como la llegada al cortex sensorial(Hurlbert y col. 1993).

**Tabla V:** Resultados de la latencia y amplitud de los PES en las ratas controles (A) e irradiadas (B). Todos los valores se expresan en medias y desviaciones estándar.

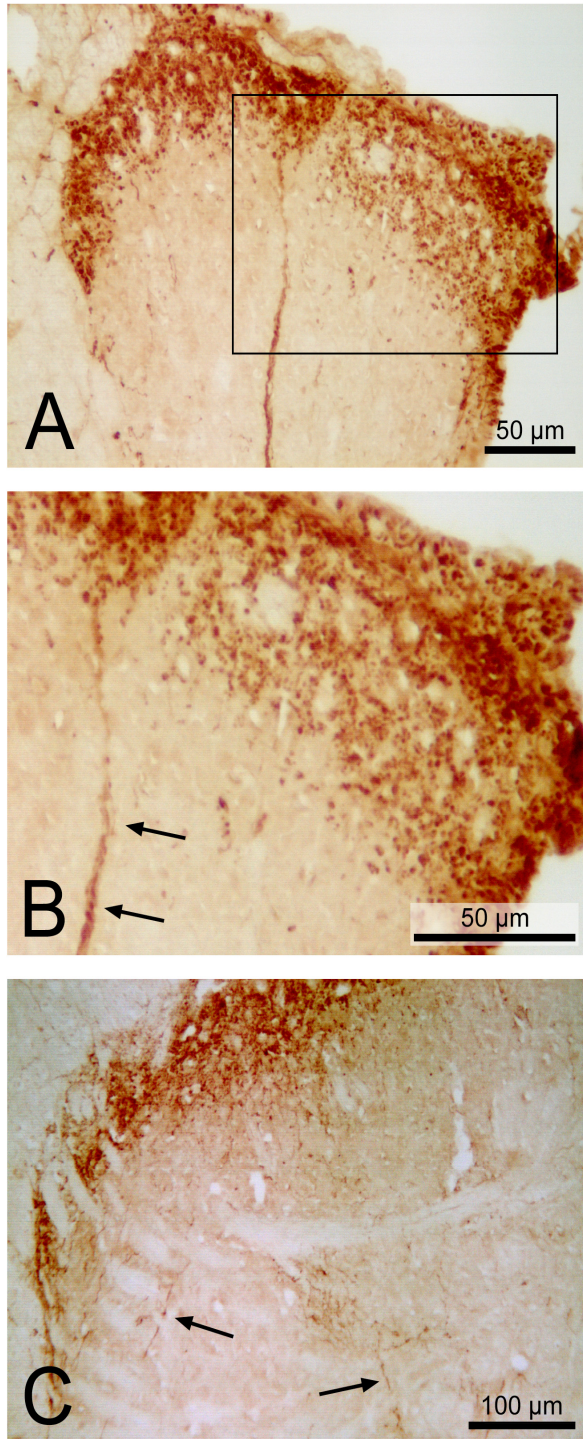
LATENCIA (P1) (ms)		AMPLITUD (P1-N1) ( $\mu$ V)	
A	B	A	B
10,66 $\pm$ 0,95	11,22 $\pm$ 0,70	0,18 $\pm$ 0,11	0,41 $\pm$ 0,39

Las gráficas y tablas de los valores individuales de cada parámetro evaluado de los estudios electrofisiológicos y de los valores promedio y desviación estándar de cada grupo, se encuentran en la sección de anexos (apartado 9).

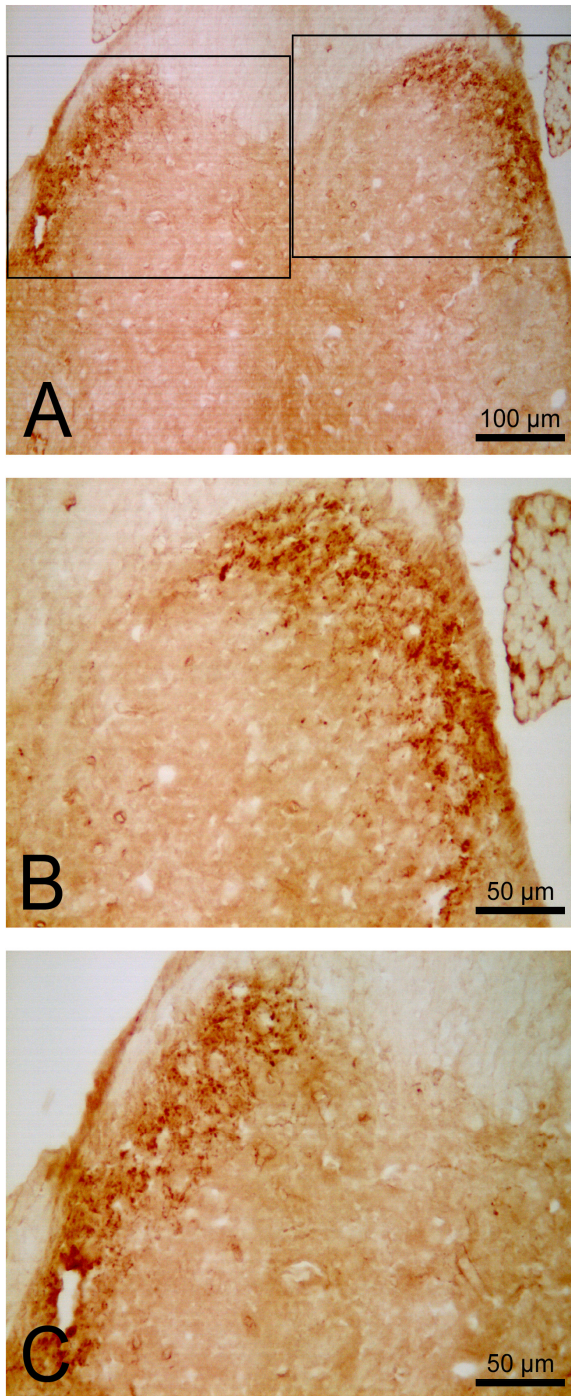
#### 5.4 Alteraciones anatómicas

El estudio comparativo de las médulas mediante las técnicas inmunocitoquímicas al cabo de un año de haber radiado los animales, es poco concluyente, ya que no se ha observado ningún marcador con esta técnica que muestre diferencias entre los animales controles y los animales radiados. Los niveles de CGRP (Figura 14), sustancia P (Figura 15) L-Glutamato y acetilcolina no revelan diferencias entre

estos dos grupos de animales (Figuras 14 y 15). Además, el marcador panleucocítico (anti-CD45) revela la total ausencia de infiltrados en la médula a nivel torácico, lumbar y sacro.



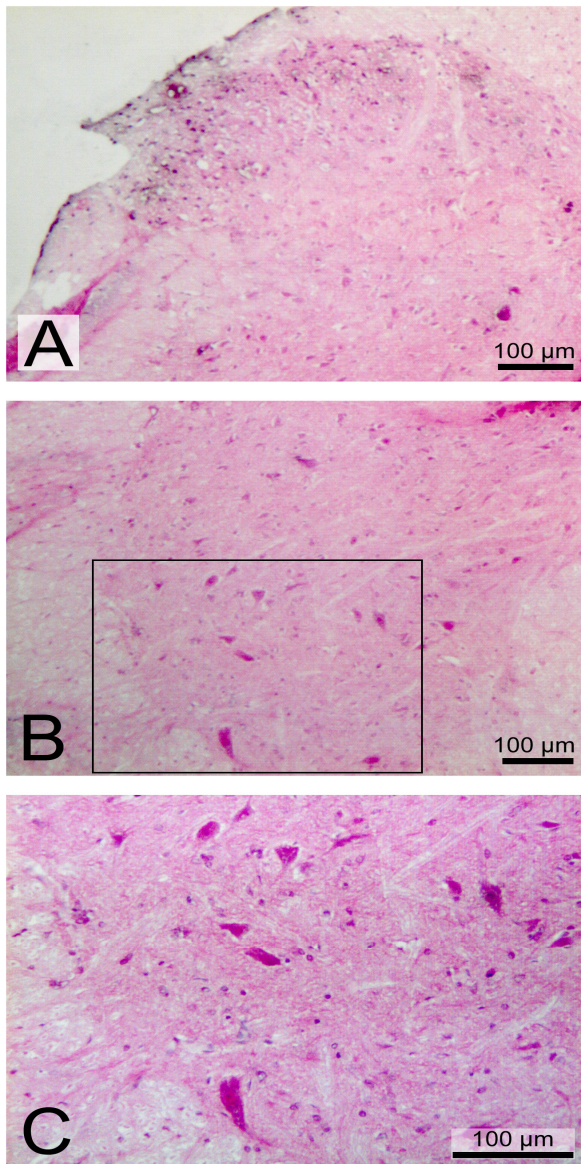
**Figura 14:** Imágenes representativas de la inmunoreactividad observada en animales no radiados (**A y B**) y radiados (**C**). Como se puede observar, la estructura general de la médula espinal se mantiene en ambos animales a nivel lumbar. Capturas realizadas tras la aplicación de una técnica inmunocitoquímica para la visualización de CGRP. **A:** CGRP en el asta dorsal. **B:** aumento de la región delimitada por un recuadro en **A**. **C:** inmunoreactividad encontrada con CGRP en animales radiados. Como se puede observar, la distribución es similar, las flechas en **B y C** indican fibras inmunorreactivas.



**Figura 15:** Ejemplo de la inmunorreactividad encontrada con sustancia P en la región sacra de la médula espinal de animales irradiados después de aplicar la técnica inmunocitoquímica. Al igual que en otros niveles, la estructura de la médula se mantiene. En la Figura **A** se aprecia la inmunorreactividad en las astas dorsales. **B:** aumento de la región delimitada en **A** por el recuadro de la derecha. **C:** aumento de la región delimitada en **A** por el recuadro de la izquierda

Los datos ofrecidos por las técnicas inmunocitoquímicas son corroborados por las técnicas histológicas (ver Figura 16). Tras el análisis de todas las series de portaobjetos correspondientes a los dos

grupos de animales (irradiados y controles), se puede certificar la ausencia total de infiltrados leucocíticos en los niveles torácico, lumbar y sacro de la médula, al menos en el momento en el que se perfundieron los animales (doce meses después de la radiación). Las técnicas aplicadas de LFB y OsO<sub>4</sub> revelan que no hay alteración de la vaina de mielina. Tan sólo se aprecia una ligera dilatación de los vasos en el grupo de animales irradiados. A nivel histológico esto se ha descrito ampliamente como uno de los efectos de la radiación, pero también se encuentra acompañada de una desestructuración del tejido, y este último punto, no ha sido apreciado en este estudio.



**Figura 16:** Imágenes tomadas después de realizar la técnica de Hematoxilina-Eosina. Como se puede apreciar en la figura, la estructura de la médula no se ve alterada. Las imágenes corresponden a un nivel lumbar (L5). En **A** se muestra un aumento del asta dorsal. La imagen **B** muestra igualmente la conservación de la estructura de la médula espinal y motoneuronas del asta ventral. La región delimitada con el recuadro se encuentra aumentada en **C**.

## **6.DISCUSIÓN**





El presente estudio confirma que se puede evaluar mediante una técnica neurofisiológica atraumática (PES) con registro cerebral extracraneal la vía somestésica medular, procedimiento que no había sido aplicado previamente en la investigación de la mielopatía post-irradiación en roedores. Aunque no se han detectado alteraciones significativas, se ha comprobado una correlación entre los resultados clínico-funcionales, neurofisiológicos e histopatológicos. En efecto, ninguna de las ratas irradiadas murió por causa de la radiación ni mostró signos deficitarios neurológicos, particularmente paresia o parálisis, en consonancia con la ausencia de lesiones en los estudios histopatológicos de la médula y las alteraciones marginales detectadas en los estudios neurofisiológicos (van der Kogel 1991). Probablemente, si se hubiese prolongado el tiempo de estudio, hubiera aparecido disfunción motora en las ratas o en su defecto alteraciones electrofisiológicas y/o anatómo-patológicas.

El tipo de irradiación que se ha utilizado en los diferentes trabajos no influye en las lesiones que se producen a las zonas irradiadas. En esta investigación se utilizaron rayos X de 6 MeV, aunque en otras se han utilizado diversos tipos de radiación como rayos pequeños de protones (van Luijk 2003; van Luijk y col. 2005a; Adamus-Gorka y col. 2008), rayos gama de  $^{137}\text{Cs}$  (Geraci y Mariano 1994), rayos X de distinta energía (Asscher y Anson 1962; Bradley y col. 1977), fotones (Phillipens 2004), neutrones (van der Kogel y Barendsen 1974), positrones (Lengyel 2003),  $^{60}\text{Co}$  (van den Aardweg y col. 1994).

La dosis aplicada (22 Gy) a los animales de experimentación en este trabajo, se determinó con base a los criterios de minimizar la mortalidad, así como analizar los cambios que ocurren en la médula espinal mediante técnicas histológicas y electrofisiológicas con dosis bajas de irradiación, pero suficientes para producir una mielopatía o radiculopatía. En efecto, Innes y Carsten, en 1961, irradiaron ratas con dosis únicas de 20 Gy observando daño similar a la necrosis de la

sustancia blanca, aunque las lesiones se localizaban preferentemente en segmentos cérico-dorsales de la médula.

Por otro lado, Bradley y col.(1977), van der Kogel y Barendsen (1974) y van der Kogel (1983, 1991) observaron muy pocos cambios en la médula después de dosis únicas tan altas como 40 Gy. Las lesiones van disminuyendo gradualmente en severidad en dirección caudal. En la mayor parte de la región lumbar, a nivel de las vértebras T12-L1, el daño se restringe a las vías ventrolaterales, cerca de las zonas de salida de las raíces ventrales. En segmentos más caudales, el diámetro disminuye rápidamente y el daño se limita a esa región. Después de la irradiación de la médula por debajo de las vértebras L1/L2 la característica patológica principal es una necrosis de las raíces nerviosas (radiculopatía) que es totalmente diferente de los hallazgos en las regiones cervicales y torácicas.

En este estudio, la dosis de radiación fue aplicada correctamente en la zona lumbo-sacra de la médula espinal a 3,0 cm de la base de la cola, en un área de 1,5 cm de largo y 1,0 cm de ancho a una profundidad entre 8 y 11 mm. Al realizarse la disección se apreció que la médula se encontró a la distancia estimada.

En un estudio realizado por van der Kogel en 1993 se irradiaron ratas en la zona cérico-torácica desde segmentos de 1,0 hasta 6,0 cm y no se observaron diferencias significativas en las dosis de tolerancia (ED<sub>50</sub> 21-22 Gy). Así, se consideró que la dosis aplicada estaba de acuerdo a los criterios definidos con anterioridad para obtener las condiciones patológicas y realizar el trabajo en el aspecto electrofisiológico y anatómo-patológico.

Ningún animal de experimentación presentaba parálisis al momento en que fueron sacrificados (12 meses post-irradiación) para el estudio anatómo-patológico. El tiempo de aparición de los síntomas post-irradiación es muy variable. Animales irradiados en el campo lumbar mostraron un rango amplio de tiempos en cuanto a la aparición de la parálisis, que oscila entre 83 y 211 días después de una dosis única de 35 Gy (Bradley y col. 1977). En algunas ratas no se apreciaron cambios en zonas que fueron irradiadas. Dos ratas que sobrevivieron 250 días post-irradiación presentaron áreas de remielinización en áreas focales desmielinizadas. En el área lumbar más de la mitad de las ratas no mostraron evidencias de daño medular. En las restantes, aunque tenían signos neurológicos, no se detectó un daño directo en la médula, pero sí en las raíces posteriores y, menos evidente, en las raíces anteriores, por lo que los investigadores señalaron que la radiculopatía y no la mielopatía era la responsable de los signos clínicos.

En humanos, la latencia puede ser mayor, desde tres meses a cinco años (Palmer 1972). Se han descrito casos, que van de 14 y hasta 20 años después (Laguens y col. 1985; Katirji 1990). Tras el inicio de los síntomas, la progresión es la regla.

Se ha observado que irradiando 1 cm de médula cervical de ratas con diferentes intensidades de  $^{137}\text{Cs}$  como fuente de rayos gamma (entre 16 y 150 Gy), ninguna rata irradiada con 16 Gy mostró parálisis. Los autores concluyeron que había dos fases en la latencia de la parálisis en el rango de radiación de 18-22 Gy: una a los 5 meses y otra entre 12 y 13 meses después de la irradiación, lo que sugirió un daño glial y vascular que se convierte en daño predominantemente glial. En las dosis limítrofes en roedores es típico que se presenten largos períodos de latencia (más de 10 meses) (Geraci y Mariano 1994).

El segmento irradiado es otro de los factores que influyen en la evaluación del daño por radiación a la médula espinal. Para evaluar modelos y estimar la probabilidad de complicación del tejido normal, con base en el efecto de dosis-volumen en la zona torácico-lumbar de la médula espinal de la rata, Philippens y col (2004) irradiaron con una dosis única de 16 a 20 Gy, 4 diferentes segmentos medulares (4, 1,5, 1,0 y 0,5 cm) cuando se presentaba paresia o necrosis de la sustancia blanca, y encontraron que las lesiones en las ratas de los segmentos de 4 y de 1 cm estaban limitadas a las raíces nerviosas en la región lumbar, por lo que la necrosis de las raíces nerviosas tenía un efecto neurológico menos pronunciado que la necrosis de la sustancia blanca a nivel torácico.

En el estudio electromiográfico no se detectó actividad espontánea como fibrilaciones, ondas positivas, descargas repetitivas complejas o fasciculaciones, alteraciones que aparecen en las lesiones de las motoneuronas del asta anterior y/o las raíces anteriores. La presencia de actividad espontánea anormal, particularmente fibrilaciones y ondas positivas, en un miotoma determinado, es el hallazgo aislado más importante para confirmar una radiculopatía (López Alburquerque 2008b). Aunque son una manifestación aguda de denervación (aparecen hacia las 2-3 semanas tras la lesión), se mantienen hasta los 12-18 meses en las radiculopatías, particularmente en la musculatura distal de extremidades. No se descarta la posibilidad de lesiones denervativas agudas precoces que hayan desaparecido debido a una reinervación posterior. Los hallazgos electromiográficos reinervativos crónicos no pueden ser estudiados en ratas anestesiadas y, en general, en cualquier animal, pues el estudio de la morfología, amplitud y duración de los potenciales de unidad motora requiere de cierto grado de colaboración del animal.

Algunos autores han encontrado mayor radiosensibilidad de las raíces lumbares que de la sustancia blanca de la médula torácica en ratas (Philippens y col. 2007), hallazgos que están sustentados en los casos publicados de síndrome selectivo de asta anterior o "amiotrofia" post-radioterapia en humanos (paraplejía flácida, arrefléxica, sin alteraciones de la sensibilidad), particularmente asociados a tumores malignos testiculares (Greenfield y Stark 1948; Kristensen y col. 1977; Lagueny y col. 1985; de Carolis y col. 1986; Feistner y col. 1989; Lamy y col. 1991; de Scisciolo y col. 1991; Grünwald y col. 1992; Bowen y col. 1996; van der Sluis y col. 2000; Mathis y col. 2007). Las alteraciones neurógenas que encuentran estos investigadores fueron fibrilaciones, ondas positivas, fasciculaciones, mioquimias, descargas repetitivas complejas y potenciales de unidad motora aumentados en amplitud y duración, resultado de un proceso de denervación/reinervación crónica. La conducción motora y sensorial generalmente fue normal.

Frecuentemente, se observó un alargamiento de la latencia de la onda F, en consonancia con una probable alteración de la conducción en los segmentos proximales nerviosos, probablemente en las raíces anteriores. La mayoría de estos pacientes recibieron una dosis de radiación total entre 35 y 90 Gy. Las zonas irradiadas incluyeron principalmente el mediastino, cadenas linfáticas ilíacas y aórticas lumbares, además del escroto. Lo que sugieren estas alteraciones, son el resultado de una lesión localizada preferentemente en las raíces anteriores, aunque no se descarta una lesión asociada de las motoneuronas de las astas anteriores de la médula espinal (Mathis y col. 2007). Los investigadores proponen un origen mixto de la patología, vascular y degenerativo, secundario a la radioterapia. En la revisión bibliográfica que se llevó a cabo no se han encontrado estudios electromiográficos en ratas sometidas a radiación.

Tampoco se modificó la conducción motora del nervio ciático (conducción a músculo gemelo, a músculo de la planta del pie o

latencia de la onda F) tras la radiación en el grupo de ratas estudiadas. No se han encontrado referencias de estudios de este tipo realizados en rata. En algunos de ellos, particularmente en humanos, se ha observado un leve descenso de la velocidad de conducción debido a la pérdida de los axones de mayor diámetro y un retraso de la latencia de la onda F (van der Sluis y col. 2000).

La duración de los potenciales motores de los músculos gemelos obtenidos tras la estimulación del nervio ciático se encontraron más prolongados tras la irradiación, aunque este resultado tienen escasa relevancia ante la ausencia de variación de la duración del potencial compuesto motor en músculos plantares. Como se ha referido previamente, este potencial, que fue obtenido con electrodos superficiales de copa, representa la resultante de varios potenciales de unidad motora frente al registrado en músculo gemelo con electrodo coaxial de aguja, que registra solamente una unidad motora.

La latencia de la onda F obtenida en los músculos plantares, paradójicamente fue menor después de la radiación, lo que es difícil de explicar debido a que la onda F se obtiene mediante un estímulo antidrómico de la motoneurona y, por tanto, explora los segmentos proximales del nervio, incluidas las raíces anteriores; de estar lesionadas éstas, particularmente con desmielinización, se esperaría un aumento de la latencia (Eisen 1985). Por otra parte, el aumento de peso y tamaño de las ratas en el segundo estudio también hubieran influido en este sentido. No se han encontrado referencias en la literatura consultada que evalúen la latencia de la onda F en ratas sometidas a radiación. En humanos, se ha observado un aumento de la latencia de la onda F (Feistner y col. 1989; Bowen y col. 1996; de Carolis y col. 1996).

En todas las ratas pudieron registrarse PES con la técnica de los electrodos superficiales, aunque no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y post-irradiación. La morfología

de los PES obtenida con esta técnica es similar a la referida con electrodos intracraneales (epidurales) estimulando el nervio ciático (Hurlbert y col. 1993), aunque otros investigadores han obtenido morfologías ligeramente diferentes debido a la variedad de técnicas utilizadas (Allison y Hume 1981; Fehlings y col. 1988; Stienen y col. 2003). Utilizando la misma técnica, se obtienen registros muy similares en las diferentes especies como ratas, gatos, monos o humanos, sugiriendo la existencia de los mismos generadores de los PES (Allison y Hume 1981; Oguzhanoglu y Kurt 2001).

Hurlbert y col. (1993) en su estudio sobre 18 ratas, obtienen un primer potencial positivo de baja amplitud, con una latencia media de  $9,1 \pm 0,7$  ms (rango 7,1-10,8 ms) denominado P9, que se corresponde con el potencial P1 obtenido en el grupo control del presente estudio, cuya latencia es de  $10,6 \pm 0,9$  ms (rango 9,3-12,3). Se ha considerado que esta onda, junto al complejo P2-N2 (L3-L4 de los trazados en los potenciales obtenidos en este trabajo), representa la llegada del estímulo al córtex sensorial. No se descarta que el primer componente P1 tenga un origen subcortical, probablemente talámico, siendo el complejo P2-N2 la respuesta propiamente cortical (Hurlbert y col. 1993).

El pequeño retraso obtenido en las ratas de este estudio es debido a que el estímulo se aplicó distalmente en los nervios plantares, frente al nervio ciático en el estudio de Hurlbert y col. (1993). Solamente se evaluó este primer potencial de corta latencia que refleja la conducción a través de la vía somestésica central. Mientras que los potenciales de corta latencia dependen de las propiedades físicas y temporales del estímulo (variables exógenas), los componentes de larga latencia, con mayor amplitud y distribución bilateral, tienen un substrato anatómico incierto y se afectan por el estado psicofísico del sujeto, particularmente del nivel de conciencia, y por tanto, pueden verse afectados por la anestesia (López Alburquerque 2008a).



Hurlbert y col (1993) observan gran variabilidad de los componentes del PES con latencias superiores a 30 ms. Por ello, el tiempo de análisis de los PES en este estudio se acotó en los primeros 20 ms. Los potenciales precoces, que están vehiculados por las fibras de grueso calibre del nervio y cordones posteriores de la médula no se afectan por la anestesia. El principal inconveniente de la medida de los componentes precoces, en particular el potencial P10 del grupo de ratas estudiadas, es su baja amplitud, que en ocasiones puede dificultar su identificación. Por el contrario, frente a los componentes tardíos, su latencia es muy estable.

La medida de la amplitud puede realizarse indistintamente utilizando los criterios base-pico o más fácilmente pico-pico. Debido a que las amplitudes de los PES son muy variables y no siguen una distribución normal, no se utilizan los valores absolutos para evaluar una afectación de la vía somestésica, su interpretación debe realizarse con cautela. En general, suele considerarse anormal una diferencia superior al 50% entre ambos lados. La alteración de la amplitud o la ausencia de un componente es un hallazgo inespecífico ya que puede significar indistintamente bien una alteración o bloqueo de la conducción, bien una pérdida axonal o neuronal de la estructura generadora del potencial (López Alburquerque 2008a). La amplitud de los PES puede estar influida por la intensidad del estímulo, aunque no se observan diferencias en los potenciales precoces cuando la intensidad del estímulo oscila entre 3 y 10 mV (Hurlbert y col 1993). Los potenciales tardíos están más influenciados por la intensidad del estímulo. En este trabajo se aplicó una intensidad estimada con referencia a la movilidad de los dedos de la pata, por la dificultad o incertidumbre sobre la cercanía del electrodo estimulador del nervio plantar. Si se aplicara la misma intensidad del estímulo, la intensidad real sería menor en los casos en los que el electrodo se encontrara más alejado del nervio.

En el grupo de ratas estudiadas no se han observado diferencias significativas en latencias y amplitud de los diferentes componentes de los PES. Se utilizó un grupo control para evitar el factor distorsión de latencias producido por el crecimiento de las ratas, que incidiría aumentando los valores de éstas, debido a la gran longitud que representa la vía somestésica periférica y central desde los nervios plantares a vértex. Se ha observado que los componentes precoces de los PES ( $\leq 19$  ms) se correlacionan significativamente con el peso de la rata (Hurlbert y col. 1993). La ausencia de referencias previas en la literatura sobre estudio de PES post-irradiación en ratas nos impide comparar nuestros resultados, que probablemente traducen la ausencia de lesiones encontradas en los estudios anatómopatológicos.

Algunos estudios de PES en humanos han confirmado la existencia de una mielopatía post-irradiación. En efecto, Dorfman y col. (1982), en un cálculo indirecto de la conducción espinal mediante PES y la onda F en adultos que recibieron radioterapia en la médula torácica por cáncer de pulmón, observaron un retraso en el tiempo de conducción medular. La velocidad de conducción somestésica medular no estuvo asociada a la dosis total de radiación recibida, aunque sí a la duración del tratamiento. Por el contrario, otros autores han observado una correlación entre la dosis recibida y la alteración de los PES en sujetos sometidos a la radioterapia (de Scisciolo y col. 1991). En algunos casos, se ha observado una sensibilidad superior a la resonancia magnética en la detección de lesiones medulares tras la radioterapia (Magrini y col. 1990). Eventualmente, pueden aparecer manifestaciones clínicas, como el signo de Lhermitte, que indiquen la presencia de una mielopatía post-irradiación pero sin alteración de los PES (Lecky y col. 1980). No se descarta que las ratas hayan sufrido una lesión transitoria con recuperación posterior sin repercusión en la vía somestésica, como han observado algunos investigadores con dosis bajas de radiación (28 Gy) en ratones (Lo y col. 1992).

Bijl y col. en 2002 sugirieron la influencia de una distancia de migración crítica de 2-3 mm para las células involucradas en los procesos regenerativos. En la médula espinal de ratas ocurre un mecanismo no-local de reparación que actúa del tejido no-irradiado al irradiado, lo que evita que ocurra la necrosis de la sustancia blanca (van Luijk y col. 2005). Es posible que un mecanismo semejante haya sucedido a las ratas del estudio y por ende, no se pudieron apreciar las manifestaciones clínicas convencionales en estudios de radiación a la médula espinal. Puede ser que la razón de no haber encontrado evidencias anatomo-patológicas responda a este mismo hecho.

Como se expuso previamente, un tiempo de latencia mayor entre radiación y análisis de resultados podría haber dado lugar a la aparición de lesiones tardías post-irradiación y, en consecuencia, una alteración de los PES. Finalmente, dado que se observó un discreto aumento de la latencia del primer componente positivo (P1) de los PES en las ratas tras la irradiación ( $11,2 \pm 0,7$ ) frente a los controles ( $10,6 \pm 0,9$ ), si se hubiese estudiado un mayor número de ratas, podría haberse obtenido una diferencia significativa entre las ratas control y las irradiadas.

En relación a los hallazgos anatomo-patológicos en este trabajo, no se observaron cambios significativos en la médula espinal de las ratas estudiadas debido a las razones comentadas con anterioridad en otros apartados y donde se destaca que, aparte de que la dosis pudo ser insuficiente, los mecanismos de reparación que se desencadenan pudieran formar parte de la explicación de que no se apreciaran signos de degeneración característicos de tejidos irradiados.

Mastaglia y col. en 1976, observaron que la degeneración de la mielina se iniciaba con un ensanchamiento nodal y una degradación paranodal seguida de inflamación axonal y desintegración diseminada de la vaina de mielina. Los cambios se sucedieron a 2 semanas post-irradiación y se incrementaron con tiempos más largos y dosis más

altas. Se detectó una predilección por las columnas ventrales y superficiales. A los tres meses, los signos de remielinización eran evidentes. Algo muy importante del estudio era que los cambios de la mielina se observaban con dosis tan bajas como 5-10 Gy. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, las regiones irradiadas fueron la cervical y la lumbar, con las particularidades ya comentadas. Estos investigadores hacen especial mención a la presencia de degeneración walleriana de la sustancia blanca en fibras de todos los calibres, que al principio era en unas pocas, pero se incrementó con el tiempo y no se detectó que hubiera una relación con la dosis. Ellos postularon un avance tardío (hacia los 12 meses) de la radionecrosis en ratas sometidas a exposiciones de radiación superiores a los 19 Gy.

En los estudios donde se analiza la histopatología de la MR en humanos, las lesiones de la médula espinal se clasifican como lesiones parenquimales de la sustancia blanca (tipo 1), lesiones vasculares primarias (tipo 2) o una combinación de lesiones vasculares y de la sustancia blanca (tipo 3). Las lesiones 1 y 3 tenían períodos de latencia más cortos que los del tipo 2. El nivel irradiado de la médula no pareció influir sobre el tipo de lesión. Las reacciones inflamatorias se observaron más frecuentemente en las lesiones de tipo 3 (Schultheiss y col. 1988).

Finalmente, puede concluirse que en el modelo experimental propuesto de MR en ratas sometidas a bajas dosis de radiación (22 Gy) en la médula lumbo-sacra, no se han detectado, a los 12 meses tras la radiación, alteraciones neurofisiológicas en nervios periféricos de extremidades posteriores ni en la médula, de acuerdo con la ausencia de lesiones en los estudios histopatológicos.



## **7. CONCLUSIONES**



1. Se han desarrollado y normalizado los diferentes parámetros de estimulación y registro de una nueva y sencilla técnica para el estudio de la mielopatía post-irradiación en ratas, mediante potenciales evocados somatosensoriales (PES) con registro extracraneal.
2. En todos los animales explorados se pudo identificar el primer componente positivo (P1) del PES cerebral con una latencia media de alrededor de 11 ms, así como el complejo P2-N2, que representa la llegada al córtex sensorial del estímulo aplicado al nervio plantar interno.
3. No hubo diferencia significativa de la latencia P1 del PES entre el grupo de ratas control y el sometido a irradiación que expresara una alteración de la conducción en la vía somestésica central compatible con MR.
4. La ausencia de actividad denervativa en los músculos gemelos y la normalidad de la amplitud del potencial compuesto motor en los músculos plantares indican la ausencia de lesiones en el asta anterior y /o raíces anteriores de la médula en las ratas sometidas a irradiación ionizante. El descenso de la latencia de la onda F post-irradiación es de significado incierto.
5. El examen histopatológico de la médula irradiada no mostró lesiones significativas en los vasos capilares, la mielina o las motoneuronas del asta anterior.
6. La ausencia de alteraciones o lesiones en los estudios neurofisiológicos e histopatológicos está en consonancia con la ausencia de déficit funcional neurológico (paresia o parálisis) en las ratas sometidas a irradiación.



- 7.** Se postula que la ausencia de lesiones sea debida a la baja dosis de irradiación aplicada (22 Gy) y/o al corto tiempo de observación post-irradiación (12 meses).
  
- 8.** Finalmente, del presente estudio se desprende que dosis de irradiación de aproximadamente 22 Gy parecen ser bien toleradas en la región lumbo-sacra de la médula espinal de ratas.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**



Abbatucci, J.S., Delozier, T., Quint, R., Roussel, A. y Brune, D. (1978) Radiation myelopathy of the cervical spinal cord: time, dose and volumen factors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*4: 239-248.

Adamus-Górka, M., Brahme, A., Mavroidis, P. y Lind, B. (2008) Variation in radiation sensitivity and repair kinetics in different parts of the spinal cord. *Acta Oncologica.* 47: 928-936.

Ahlbom H.E. (1941) The results of radiotherapy of hypopharyngeal cancer at the radium hemmet, Stockholm 1930-1939. *Acta Radiol.* 22: 155-171.

Alajouanine, Th., Castaigne, P. y Graveleau, J. (1959) Un cas de myélopathie cervicale post-radiotherapique. *Bull. Soc. Méd. Hop. Paris.* 1: 239-243.

Alajouanine, Th., Lhermitte, F., Cambier, J., y Gautier, J.C. (1961) Les lésions post-radiotherapiques tardives du systeme nerveux central. (A propos d'une observation anatomo-clinique de myélopathie cervicale). *Rev. Neurol.* 105: 9-21.

Alfonso, E.R., de Gregorio, M.A., Mateo, P., Escó, N., Bascón, F., Morales, F., Bellosta, P., López, M., Gimeno, M., Roca, M. y Villavieja, J.L.(1997) Radiation myelopathy in over-irradiated patients: MR imaging findings. *Eur. Radiol.* 7: 400-404.

Allison, T. y Hume, A.L. (1981) A comparative analysis of short-latency somatosensory evoked potentials in man, monkey, cat, and rat. *Exp. Neurol.* 72:592-611.

Ang, K.K., van der Kogel, A.J., van der Schueren, E. (1983) The effect of small radiation doses on the rat spinal cord: the concept of partial tolerance. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 9: 1487-1491

Asscher, A.W. y Anson, S.G. (1962) Arterial hypertension and irradiation damage to the nervous system. *The Lancet*. December 29:1343-1346.

Atkins, H.L. y Tretter, P. (1966) Time dose considerations in radiation myelopathy. *Acta radiol. Stockholm.* 4: 79-94.

Atkinson, S. Li, Y.Q. y Wong, C.S. (2003) Changes in oligodendrocytes and myelin gene expression after radiation in the rodent spinal cord. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 57: 1093-1100.

Bauduceau, O., Souleau, B., Le-Moulec, S., Houlgatte, A. y Bernard, O. (2003) Radiothérapie des séminomes testiculaires de stade I étude rétrospective et revue de la littérature. *Cancer/Radiothérapie.* 7: 386-394.

Berlit, P., Schwechheimer, K. (1987) Neuropathological findings in radiation myelopathy of the lumbosacral cord. *Eur. Neurol.* 27: 29-34.

Bijl, H.P., van Luijk, P., Coppes, R., Schippers, J., Konings, A. y van der Kogel A.J. (2002) Dose-volume effects in the rat cervical spinal cord after proton irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 52: 205-211.

Bijl, H.P., van Luijk, P., Coppes, R., Schippers, J., Konings, A. y van der Kogel A.J. (2005) Regional differences in radiosensitivity across the rat cervical spinal cord. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 61: 543-551.

Boden, G. (1948) Radiation myelitis of the cervical spinal cord. *Brit. J.*

Radiol. 21: 464-469.

Boden, G. (1950) Radiation myelitis of the brainstem. J. Fac. Radiol. 2: 79-94.

Bondeuelle, M., Bouygues, P. y el Ramy A. (1958) Myélopathie cervicale post-radiotherapique. Rev. Neurol. 99: 310-313.

Bowen, J., Gregory R., Squier, M., y Donaghy, M. (1996) The post-irradiation lower motor neuron syndrome: Neuropathy or radiculopathy? Brain. 119: 1429-1439.

Burns, R.J., Jones, A.N. y Robertson, J.S. (1972) Pathology of radiation myelopathy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 35: 888-898.

Bradley, W.G., Fewings, J.D., Cumming, W.J.K., Harrison, R.M. y Faulds, A.J. (1977) Delayed myeloradiculopathy produced by spinal X-radiation in the rat. J. Neurol. Sci. 31: 63-82.

Carsten, A. y Zeman, W. (1966) The control of variables in radiopathological studies on mammalian nervous tissue. Int. J. Radiat. Biol. 10: 65-74.

Castaigne, P., Cambier, J., Escourolle, R., Lechevalie, B. y Lhuiller, M. (1970) Myélopathie post-radioterapique au cours de la maladie de Hodgkin. Rev. Neurol. 6: 369-386.

Castilla Serna, L. y Cravioto, J. (1991) Estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud. Ed. Trillas. México, D.F. 1ª edición.

Cavanagh, J.B. (1968) Effects of previous X-irradiation on the cellular response of nervous tissue to injury. Nature. 219:626-627.

Coderre, J.A., Morris, G., Micca, P.L., Hopewell, H.W., Verhagen, I., Kleiboer, B.J. y van der Kogel, A.J. (2006) Late effects of radiation on the central nervous system: role of vascular endothelial damage and glial stem cell survival. *Radiat. Res.* 166: 495-503.

Combes, P.F., Daly, N., Schlienger, M. y Humeau, F. (1975) Late progressive radiation myelopathies: A study of 27 cases. *J. Radiol. Electrol. Med. Nucl.* 56:815-825.

Coveñas, R., Mangas, A., Bodet, D., Duleu, S., Marcos, P. y Geffard, M. (2010, en prensa) Vitamin C in the monkey brain. En: *Vitamin C: Nutrition, Side Effects and Supplements*. C.M. Jackson (ed.).

Coy, P., Baker, S. y Dolman, C.L. (1969) Progressive myelopathy due to radiation. *Canad. Med. Ass. J.* 100: 1129-1134.

Cusick, J.F., Myklebust, J.B., Larson, S.J. y Sances, A. Jr. (1979) Spinal cord evaluation by cortical evoked responses. *Arch. Neurol.* 36:140-143.

Charbonnel, A., Bonnard, J., Feve, J.R., y Charbonnel, B. (1970) Les myélopathies post-radiothérapeutiques. A propos de trois observations personnelles. *Immex.* 10: 1277-1272.

Chari, D.M., Huang, W.L., y Blakemore, W.F. (2003) Dysfunctional oligodendrocyte progenitor cell (OPC) populations may inhibit repopulation of OPC depleted tissue. *J. Neurosci. Res* 73: 787-793.

Cherubino, M. y Guccione (1968) Sindromi paralitiche piramidali da mielite da irradiazione del distretto cranio-cervicale. *Archi.Ital Otol.* 79: 157-170.

de Carolis, P., Montagna, P., Cipulli, M., Baldrati, A., d'Alessandro, R.

y Sacquegna, T. (1986) Isolated lower motoneuron involvement following radiotherapy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 49: 718-719.

Delattre, J.Y., Rosenblum, M.K., Thaler, H.T., Mandell, L., Shapiro, W.R. y Posner, J.B. (1988) A model of radiation myelopathy in the rat: pathology, regional capillary permeability changes and treatment with dexamethasone. *Brain.* 111:1319-1336.

de Scisciolo, G., Bartelli, M., Magrini, S., Biti, GP., Guidi, L. y Pinto, F. (1990) Long-term nervous system damage from radiation of the spinal cord: an electrophysiological study. *J. Neurol.* 238: 9-15.

Dorfman, L., Donaldson, S., Gupta, P., Bosley, T. (1982) Electrophysiological evidence of subclinical injury to the posterior columns of the human spinal cord after therapeutic radiation. *Cancer.* 50: 2815-2819.

Dynes, J.B., y Smedal, M.I. (1960) Radiation myelitis. *Amer. J. Röntgenol.* 83: 78-87.

Eisen, A. (1985) Electrodiagnosis of radiculopathies. *Neurol. Clin.* 3: 495-510.

Ellis, F. (1971) Nominal standard dose and the ret. *Br. J. Radiol.* 44:101-108.

Ésik, O. Emrib, M. Csornai, M., Kaslerd, M., Godeny, M. y Trón, L. (1999) Radiation myelopathy with partial functional recovery: PET evidence of long-term increased metabolic activity of the spinal cord. *J. Neurol. Sci.* 163: 39-43.



Fehlings, M., Tator, C., Linden, D. y Piper, I. (1988) Motor and somatosensory evoked potentials recorded from the rat. *Electroenceph.Clin. Neurophysiol.* 69:65-78.

Feistner, H., Weissenborn, K., Münte, T.F., Heinze, H.J. y Malin, J.P. (1989) Post-irradiation lesions of the caudal roots. *Acta Neurol. Scand.* 80: 277-278.

Ferrero, R.E.A., y Obarrio, J.M. (1965) Myelopathy following teletherapy with radioactive cobalt. *J. Neurol. Sci.* 2: 165-180.

Fisher, M. (2002) Electrophysiology of radiculopathies. *Clinical Neurophysiology.* 113: 317-335.

Fitzgerald, R., Marks, R. y Wallace, K. (1982). Chronic radiation myelitis. *Radiology.* 144: 609-612.

Fletcher, G.H., Barkley, H.T. Jr. y Shukovsky, U. (1974) Present status of the time factor in clinical radiotherapy. Part II: The nominal standard dose formula. *J. Radiol. Electrol. Med. Nucl.* 55:745-751.

Gallego, J., Delgado, G., Tunon, T. y Villanueva, J.A. (1986) Delayed post-irradiation lower motor neuron syndrome (letter). *Ann. Neurol.* 19: 308-9.

García-Serra, A.M., Zlotecki, R.A., Morris, C.G. y Amdur, R.J. (2005) Long-term results of radiotherapy for early-stage testicular seminoma. *Am. J. Clin. Oncol.* 28:119-124.

Geraci, JP, Mariano, MS (1994) Relationship between dose and the latent period for radiation myelopathy in rats. *Radiat. Res.* 140: 340-346.

Gibbs, I., Patil, C., Gerszten, P., Adler, J. y Burton, S. (2009) Delayed radiation-induced myelopathy after spinal surgery. *Neurosurgery*. 64: A67-A72.

Goffinet, D.R., Marsa, G.W. y Martin B.J. (1976) The effect of single and multifraction radiation courses on the mouse spinal cord. *Radiology*. 119: 709-713

Goldwein, J. (1987) Radiation myelopathy: A review. *Medical and pediatric oncology*. 15: 89-95.

Gómez Camello, Á. y García García, J. (2008) Mielopatía progresiva tardía por radiación. *Neurología*. 23: 179-180.

Greene, E.C. (1968) *Anatomy of the rat*. Hafner. New York, N.Y.

Greenfield, M.M. y Stark, F.M. (1948) Post-irradiation neuropathy. *Am. J. Roent*. 60: 617-622.

Grünewald, R.A., Chroni, E. y Panayotopoulos, C.P. (1992) Late onset radiation induced motor neuron syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 55: 741-742.

Harper, J. W. y Elledge, S. J.. (2007) The DNA Damage Response: Ten Years After. *Mol. Cell*. 28: 739-745.

Hendry, J.H., y West, C.M. (1997) Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal tissue and tumor radiation response. *Int. J. Radiat. Biol.* 72: 709-719.

Henry, P., Castaigns, G., Hoerni, B. y Touchard, J. (1971) La myélopathie progressive post-radiothérapeutique tardive. *J. Neurol. Sci*. 14: 325-340.

Higgins, R.V., Myers, V.T. y Hall, J. B. (1997) Radiation myelopathy after chemotherapy and radiation therapy for fallopian tube carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 64:285-287.

Holdorff, B. (1980) Dose effect relationships in cervical and thoracic radiation myelopathies. *Acta Radiologica Oncology.* 19: 271-277.

Hopewell, J.W., Morris, A.D. y Dixon-Brown, A. (1987) The influence of field size on the late tolerance of the rat spinal cord to single doses of X-rays. *Br. J. Radiol.* 60:1099-1108.

Hopewell, J.W. y Trott, K. (2000) Volume effects in radiobiology as applied to radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 56: 283-288.

Hopewell, J.W. y van der Kogel, A. J. (1999) Pathophysiological mechanisms leading to the development of late radiation-induced damage to the central nervous system. En: Wiegel, T., Brock, W., Hoell, T. (eds): *Controversies in Neuro-oncology.* *Front. Radiat. Ther. Oncol. Basel, Karger.* 33: 265-275.

Horowitz, S.L. y Stewart, J.D., (1983) Lower motor neuron syndrome following radiotherapy. *Can J. Neurol. Sci.* 10: 56-58.

Hubbard, B.M. y Hopewell, J.W. (1979) Changes in the neuroglial populations of the rat spinal cord after local X-irradiation. *Br. J. Radiol.* 52:816-821.

Hurlbert, J., Koyanagi, I. y Tator, C. (1993) Sensory evoked potentials for selective monitoring of the rat spinal cord: a cerebellar evoked potential to assess ventral cord integrity. *J. Neurotrauma.* 10:181-200.

Innes, J.R.M. y Carsten, A. (1961) Demyelinating or malacic myelopathy. Arch. Neurol. 4:190-199.

Itabashi, H.H., Bebin, J. y Dejong, N. (1957) Post-irradiation cervical myelopathy. Report of two cases. Neurology (Minneapolis). 7: 844-852.

Jeremic, B., Djuric, L. y Mijatovic, L. (1991) Incidence of radiation myelitis of the cervical spinal cord at doses of 5500 cGy or greater. Cancer. 68: 2138– 2141.

Jones, A.M. (1964) Transient radiation myelopathy (with reference to Lhermitte's sign of electrical paresthesia). Br. J. Radiol. 37: 727-744.

Katirji M.B.(1990) Delayed postradiation motor neuron syndrome. Letters to the editor. Muscle Nerve. 13:1185-1186.

Keime-Guibert, F., Napolitano, M. yDelattre, J. Y. (1998)Neurological complications of radiotherapy and chemotherapy. J. Neurol. 245: 695– 708.

Kirpatrick, J.P., van der Kogel, A.J. ySchultheiss, T.E. (2010)Radiation dose-volume effects in the spinal cord. Int. J. Radiat. Oncol.Biol. Phys. 76: Supplement S42-S49.

Komachi, H., Tsuchiya, K., Masayuki, Ikeda, M., Ryuji Koike, R., Matsunaga, T. e Ikeda, K. (1995)Radiation myelopathy: a clinicopathological study with special referenceto correlation between MRI findings and neuropathology. J. Neurol. Sci. 132: 228-232.

Kurokawa, K., de Almeida, D. F., Zhang, Y., Hébert,C. D., Page J. G., Schweikartc,K. M. y Oh,S. J. (2004) Sensory nerve conduction of the plantar nerve comparedwith other nerve conduction tests in rats. Clinical Neurophysiology. 115: 1677–1682.

Klana, M. (1974) Radiogenic peripheral neuropathies following telecobalt in abdominal cavity. *Radiobiol. Radiother.* 15: 459-649.

Knap, M., Bentzen, S.M. y Overgaard, J. (2007) Late neurological complications after irradiation of malignant tumors of the testis. *Acta Oncologica.* 46: 497-503.

Kristensen, O., Melgard, B. y Schiodt, AV. (1977) Radiation myelopathy of the lumbo-sacral spinal cord. *Acta Neurol. Scand.* 56: 217-222.

Kristensson, K., Molin, B., y Sourander, P. (1967) Delayed radiation lesions of the human cord. Report of five cases. *Acta Neuropath. (Berlin)* 9: 34-44.

Lagueny, A., Aupy, M., Aupy, P., Ferrer, X., Henry, P. y Julien, J. (1985) Syndrome de la corne anterieure post radiotherapique. Post-radiotherapy anterior horn cell syndrome. *Rev. Neurol. (Paris)* 141:22-227.

Lalu, T., Mercier, B., Birouk, N., Maisonobe, T., Catala, M. y Le Forestier, N. (1998) Pure motor neuropathy after radiation therapy: *Rev Neurol (Paris).* 154:40-44.

Lamy, C., Mas, J.L., Varet, B., Ziegler, M. y de Recondo, J. (1991) Postradiation lower motor syndrome presenting as monomelic amyotrophy. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 54:648-649.

Landuyt, W., Fowler, J., Ruifrok, A., Stüben G., van der Kogel A.J. y van der Scheren, E. (1997) Kinetics of repair in the spinal cord of the rat. *Radiother. and Oncol.* 45:55-62.

Latorre Travis, E. (1979) *Radiobiología Médica.* Madrid. Editorial AC.

32-51.

Lecky, B. R. F., Murray, N. M. F., y Berry, R. J. (1980) Transient radiation myelopathy: spinal somatosensory evoked responses following incidental cord exposure during radiotherapy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 43:747-750.

Leith, J.T., McDonald, M., Powers-Risius, P., Bliven, S.F. y Howard J. (1982) Response of rat spinal cord to single and fractionated doses of accelerated heavy ions. *Radiat.Res.*89: 176–193.

Leith, J.T., Woodruff, K.H., Lewinsky, B.S., Lyman, J.T. y Tobias, C.A. (1975) Tolerance of the spinal cord of rats to irradiation with neon ions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 28: 393-398.

Lengyel, Z. (2003) PET investigation of radiation induced sequelae of the spinal cord. Ph.D. thesis. University of Debrecen, Faculty of Medicine, Hungary.

Lengyel, Z., Réko, G., Majtény, K., Pisch, J., Csornai, M., Lesznyák, J., Trón, L. y Ésik, O. (2003) Autopsy verifies demyelination and lack of vascular damage in partially reversible radiation myelopathy. *Spinal Cord.* 41: 577-585.

Lo, Y.C., McBride, W. y Withers, H.R. (1992) The effect of single doses of radiation on mouse spinal cord. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 22: 57-63.

Locksmith, J.P. y Powers, E. (1968) Permanent radiation myelopathy. *Amer. J. Röntgenol.* 102: 916-926.

LópezAlburquerque, T. (2008a) Potenciales evocados somatosensoriales. En: Gutiérrez Rivas, E., Jiménez, M.D., Pardo, J. y

Romero, M. Manual de electromiografía clínica 2ª ed. Ergon, Madrid, pp.179-189.

López Alburquerque, T. (2008b)Radiculopatías. En: Gutiérrez Rivas, E., Jiménez, M.D., Pardo, J. y Romero, M. Manual de electromiografía clínica 2ª ed. Ergon, Madrid, pp.241-252.

Magrini, S.M., Biti, G.P., de Scisciolo, G., Bartelli, M., Pinto, F., Caramella, D., y Villari, N. (1990) Neurological damage in patients irradiated twice on the spinal cord: a morphologic and electrophysiological study. *Radiother. Oncol.* 17: 209-218.

Maier, J.G., Perry, R.H., Saylor, W., y Sulak M.H., (1969) Radiation myelitis of the dorsolumbar spinal cord. *Radiology.* 93: 153-160.

Malamud, N., Boldrey, E.B., Welch, W.K., Fadell, E.J. (1954) Necrosis of brain and spinal cord following X-ray therapy. *J. Neurosurg.* 11: 353-362.

Mangas, A., Coveñas, R., Bodet, D., Duleu, S., Marcos, P. y Geffard, M. (2009a) A new drug candidate (GEMSP) for multiple sclerosis. *Curr. Med. Chem.*16: 3203-3214.

Mangas, A., Coveñas, R., Bodet, D., Duleu, S., Marcos, P. y Geffard, M. (2009b) Vitamins in the monkey brain: an immunocytochemical study. *J. Chem. Neuroanat.* 38:1-8.

Mangas, A., Coveñas, R., Bodet, D., de León, M., Duleu, S. y Geffard, M. (2008) Evaluation of the effects of a new drug candidate (GEMSP) in a chronic EAE model. *Int. J. Biol. Sci.* 4:150-160.

Mangas, A., Coveñas, R., Bodet, D., Geffard, M., Aguilar, A. y Yajeya, J.(2007) Immunocytochemical visualization of D-Glutamate in the rat brain. *Neuroscience*. 144:654-664.

Mangas, A., Coveñas, R., Bodet, D., Dabadie, M.P., Glaize, G. y Geffard M.(2006) Evaluation of the effects of a new drug on brain leukocyte infiltration in an experimental model of autoimmune encephalomyelitis. *Lett. Drug Des. and Discov*. 3:138-148.

Marcus, R.R. y Million, R.G. (1990) The incidence of myelitis after irradiation of the cervical spinal cord. *Int. J.Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 19:3-8.

Mastaglia, F.L., McDonald, W.I., Watson, J.V. y Yogendran, K. (1976) Effect of X-radiation on the spinal cord: An experimental study of the morphological changes in central nerve fibers. *Brain*. 99:101-122.

Mathis, S., Dumas, P., Neau, J.P. y Gil, R.(2007)La neuropathie motrice pure, une complication rare de la radiothérapie: trois observations et une revue de la littérature. *Rev. Méd. Interne*. 28: 377–387.

Miyagawa, H., Yokofujita, J., Okeda, R. y Kuroiwa, T. (1996) Pathogenesis of delayed radiation injury in the rat spinal cord after X-ray irradiation. *Neuropathology*.16:126–132.

Morris, G., Coderre, J., Whitehouse, E. M. y Hopewell, J.W. (1994) Boron neutron capture therapy: a guide to the understanding of the pathogenesis of late radiation damage to the rat spinal cord. *Int. J. Radiat. Oncol.Biol. Phys*. 28: 1107-1112.

Morris, G.M., Coderre, J.A., Bywaters, E. yHopewell, J.W. (1996) Boron neuron capture irradiation of the rat spinal cord:



histopathological evidence of vascular-mediated pathogenesis. *Radiat. Res.* 146: 313-320.

Murakami, H., Kawahara, N., Yahata, T., Yokoyama, I., Komai, K. y Tomita, K. (2006) Radiation myelopathy after radioactive iodine therapy for spine metastasis. *Br. J. Radiol.* 79: e45–e49.

Oguzhanoglu, A. y Kurt, T. (2001) Findings of somatosensory evoked potentials to stimulation of the sciatic nerve in two different rat strains. *Exp. Anim.* 50: 361-364.

Okada, S., Okeda, R., Matsushita, S. y Kawano, A. (1998) Histopathological and morphometric study of the late effects of heavy-ion irradiation on the spinal cord of the rat. *Radiat. Res.* 150: 299–304.

Okada, S. y Okeda, R. (2001) Pathology of radiation myelopathy. *Neuropathology.* 21: 247-265.

Pallis, C.A., Louis, S., y Morgan R.L. (1961) A propos d'une observation de myélite cervicale post-cobalthérapique. *Rev. Oto-neuro-ophtal.* 33: 78-83.

Palmer, J. (1972) Radiation myelopathy. *Brain.* 95:109-122.

Paxinos, G. y Watson, C. (1982) The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney, Academic Press.

Pech, A.R., Clement, A., Boudouresques, A. y Averianos, R. (1961) A propos d'une observation de myélite cervicale post-cobalthérapique. *Rev. Oto-neuro-ophtal.* 33:78-83.

Phillipens, M., Pop, L. A.M., Visser, A.M.W., Schellekens, S. y van der Kogel, A.J. (2004) Dose-volume effects in rat thoracolumbar spinal

cord: an evaluation of NTCP models. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 60: 578-590.

Philippens, M.E.P., Pop, L.A.M., Vissier, A. y van der Kogel, A.J. (2007) Dose-volume effects in rat thoracolumbar spinal cord: the effects of nonuniform dose distribution. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 69: 204-213.

Phillips, T.L. y Buschke, F. (1969) Radiation of the thoracic spinal cord. *Amer. J. Röntgenol.* 105: 659-664.

Ponsford, S.N. (1988) Sensory conduction in medial and lateral plantar nerves. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 51:188-191.

Rampling, R. y Symonds, P. (1998) Radiation myelopathy. *Curr. Opin. Neurol.* 11:627-632.

Reagan, T.J., Thomas, J.E. y Coley, M.Y. Jr. (1968) Chronic progressive radiation myelopathy. It's clinical aspects and differential diagnosis. *J. Amer. Med. Ass.* 201: 106-110.

Rheinhold, H.S., Kaalen, J.G.H. y Unger-Gils, K. (1976) Radiation myelopathy of the thoracic spinal cord. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1: 651-657.

Ruifrok, A.C., Kleiboer, B.J. y van der Kogel, A.J. (1992) Reirradiation tolerance of the immature rat spinal cord. *Radiother. Oncol.* 23:249-256.

Sadowsky, C., Sachs, E. y Ochoa, J. (1976) Postradiation motor neuron syndrome. *Arch. Neurol.* 33: 788-787.

Sanyal, B., Pant, G.C. y Subrahmaniyam, K. (1979) Radiation Myelopathy. *J. Neurol. Neurosurg. and Psychiatry.* 42: 413-418.

Siegal, T. y Pfeffer, M.R. (1995) Radiation-induced changes in the profile of spinal cord serotonin, prostaglandin synthesis, and vascular permeability. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 31: 57-64.

Schiødt, A.V. y Kristensen, O. (1978) Neurologic complications after irradiation of malignant tumors of the testis. *Acta Radiol. Oncol.* 17: 369-378.

Schultheiss, T.E. (1990) Spinal cord radiation 'tolerance'. Doctrine versus data. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 19: 219-221.

Schultheiss, T.E., Higgins, E.M. y El-Mahidi, A.M. (1984) The latent period in clinical radiation myelopathy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 10:1109-1115

Schultheiss, T. E., Kun, L. E., Ang, K. K. y Stephens, L.C. (1995) Radiation response of the central nervous system. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 31:1093-1112.

Schultheiss, T.E. y Stephens, L.C. (1992) Invited review: Permanent radiation myelopathy. *Br. J. Radiol.* 65: 737-753.

Schultheiss, T.E., Stephens, L. C., Jiang, G. L., Ang, K. K. y Peters, L. J. (1990) Radiation myelopathy in primates treated with conventional fractionation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 19:935-940.

Schultheiss, T.E., Stephens, L.C., Kian-Ang, K., Price, R.E. y Peters, L.J. (1994) Volume effect in rhesus monkey spinal cord. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 29:67-72.

Schultheiss, T.E., Stephens, L.C. y Maor, M.H. (1988) Analysis of the histopathology of radiation myelopathy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 14: 27-32.

Schultheiss, T.E., Stephens, L.C. y Peters, L.J. (1986) Survival in radiation myelopathy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 12: 1765-1769.

Smithers, D.W., Clarkson, J.R. y Strong, J.A. (1943) The röntgen treatment of the oesophagus. *Amer. J. Röntgenol.* 49: 606-634.

Snooks, S.J. y Swash, M. (1985) Motor conduction velocity in the human spinal cord: slowed conduction in multiple sclerosis and radiation myelopathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 48: 1135-1139.

Stevenson, L.D. y Eckhardt, E. (1945) Myelomalacia of the cervical portion of the spinal cord, probably the result of röntgenotherapy. *Arch. Path.* 39: 109-112.

Stewart, P.A., Vlinters, H.V. y Wong, C. S. (1995) Blood-spinal cord barrier function and morphometry after single doses of X-rays in rat spinal cord. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 32:703-711.

Stienen, P., Zainal, L., Haberham, Z.L., van den Brom, W.E., de Groot H.N.M., Venker-Van, A.J. y Hellebrekers, L.J. (2003) Evaluation of methods for eliciting somatosensory-evoked potentials in the awake, freely moving rat. *J. Neurosci. Methods.* 126:79-90.

Stoll, B. y Andrews, J. (1966) Radiation-induced peripheral neuropathy. *Brit. Med. J.* 1: 834-837.

Tallaksen, C.M.E., Jetne, V. y Fossa, S. (1997) Postradiation lower motor neuron syndrome. A case report and brief literature review. *Acta Oncol.* 36: 345-347.

Valls, A. y Algara, M. (1994) *Radiobiología*. Ediciones Eurobook, Madrid. pp. 51-63.

van den Aardweg, G.J.M.J. y Hopewell, J.W. (1992) The kinetics of repair for sublethal radiation damage in the pig epidermis: an interpretation based on a fast and slow component of repair. *Radiother. Oncol.* 23: 94-104.

van den Aardweg, G.J.M.J., Hopewell, J.W. y Whitehouse, E. (1994) The radiation response of the cervical spinal cord of the pig: effects of changing the irradiated volume. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 31: 51-55.

van den Brenk, H.A., Richter, S.W. y Hurley, R.H. (1968) Radiosensitivity of the human oxygenated cervical spinal cord based on analysis of 357 cases receiving 4 MeV X-rays in hyperbaric oxygen. *Brit. J. Radiol.* 41: 205-214.

van der Kogel, A.J. y Barendsen, G.W. (1974) Late effects of spinal cord irradiation with 300kV X rays and 15 MeV neutrons. *Br. J. Radiol.* 47:393-398.

van der Kogel, A.J. (1977a) Radiation-induced nerve root degeneration and hypertrophic neuropathy in the lumbosacral spinal cord of rats: the relation with changes in aging rats. *Acta Neuropathol.* 39:139-145.

van der Kogel, A.J. (1977b) Radiation tolerance of the rat spinal cord: time dose relationships. *Radiology.* 122: 505-509.

van der Kogel, A.J. (1979) Late effects of radiation on the spinal cord: dose-effect relationships and pathogenesis. Publication of the Radiobiological Institute TNO, Rijswijk. The Netherlands. En: Medical Radiology. Radiopathology of organs and tissues. Editado por: E. Scherer, Ch. Streffer, and K.R. Trott. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. 191-212.

van der Kogel, A.J. (1983) The cellular basis of radiation induced damage in the CNS. En: Potten, C.S., Hendry, J.H. (eds) Cytotoxic insult to tissues: effects on cell lineages. Churchill-Livingstone, Edinburgh. 329-352.

van der Kogel, A.J. (1985) Chronic effect of neutrons and changed particles on spinal cord, lung, and rectum. Radiat. Res. 104:S208-S216.

van der Kogel, A.J. (1991) The nervous system: Radiobiology and experimental pathology. En: Scherer, E., Streffer, Ch. y Trott K-R (eds). Medical Radiology. Radiopathology of Organs and Tissues. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. 191-212.

van der Kogel, A.J. (1993) Dose-volume effects in the spinal cord. Radiother.Oncol. 29:105-109.

van der Sluis, R.W., Wolfe, G.I., Nations, S.P., Bryan, W.W., Krampitz, D.E., Kissel, J.T. y Barohn, R.J. (2000) Post-radiation lower motor neuron syndrome. J. Clin. Neuromusc. Dis. 2:10-17.

van Luijk, P. (2003) Dose-volume effects in rat spinal cord irradiated with protons. Tesis de doctorado. Universidad de Groningen.

van Luijk, P., Navakova-Jiresova, A., Faber, H., Schippers, J.M.,

Kampinga, H.H., Meertens, H. y Coppes, R.P. (2005a) Radiation damage to the heart enhances early radiation-induced lung function loss. *Cancer Res.* 65:6509-6511.

van Luijk, P., Bijl, H., Konings, A.W.T., van der Kogel, A.J. y Schippers, J.M. (2005b) Data on dose volume effects in the rat spinal cord do not support existing NTCP models. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 61: 892-900.

Wara, W.M., Phillips, T.L., Sheline, G.E. y Schwade, J.G. (1975) Radiation tolerance of the spinal cord. *Cancer.* 35:1558-1562.

Warters, R.L. y Hofer, K.G. (1977) Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells. Elucidation of the primary site for radiation induced division delay. *Radiat.Res.*69:348-358.

Wong, S.C., van Dyk, J., Milosevic, M. y Laperriere, N. (1994) Radiation myelopathy following single courses of radiotherapy and retreatment. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 30: 575-581.

White, A. y Hornsey, S. (1978) Radiation damage to the rat spinal cord: the effect of single and fractionated doses of X-rays. *Br. J. Radiol.*51: 515-523.

## **9. ANEXOS**

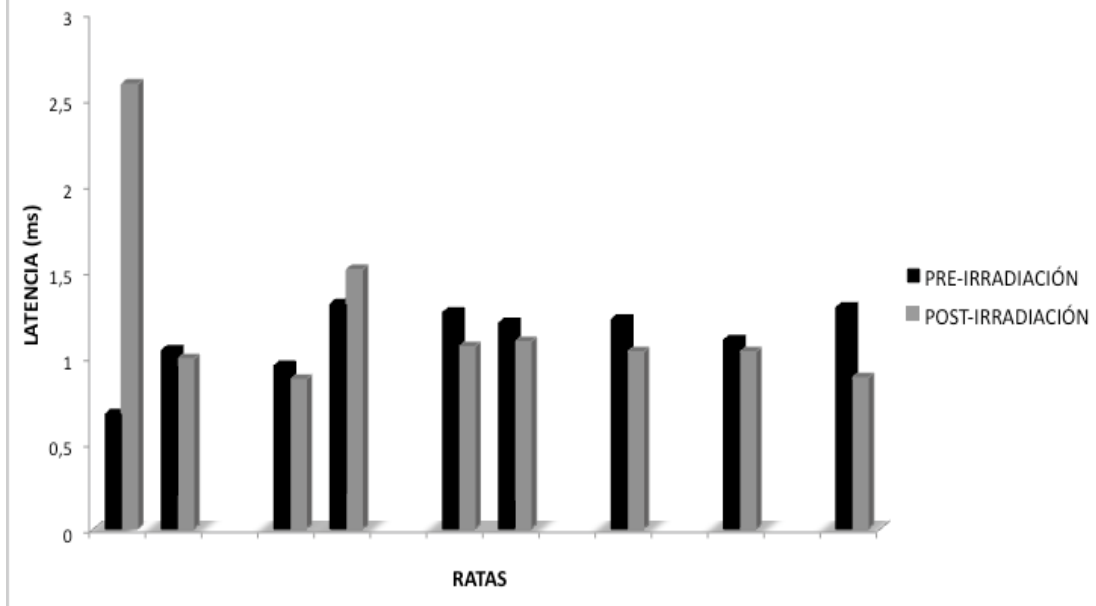




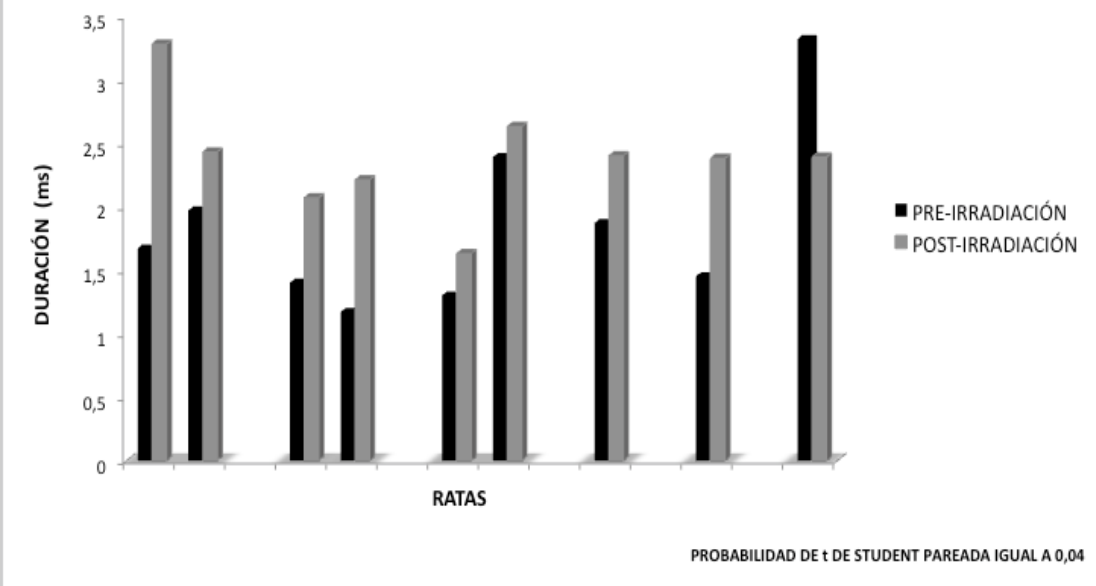
## 9.1 Gráficas



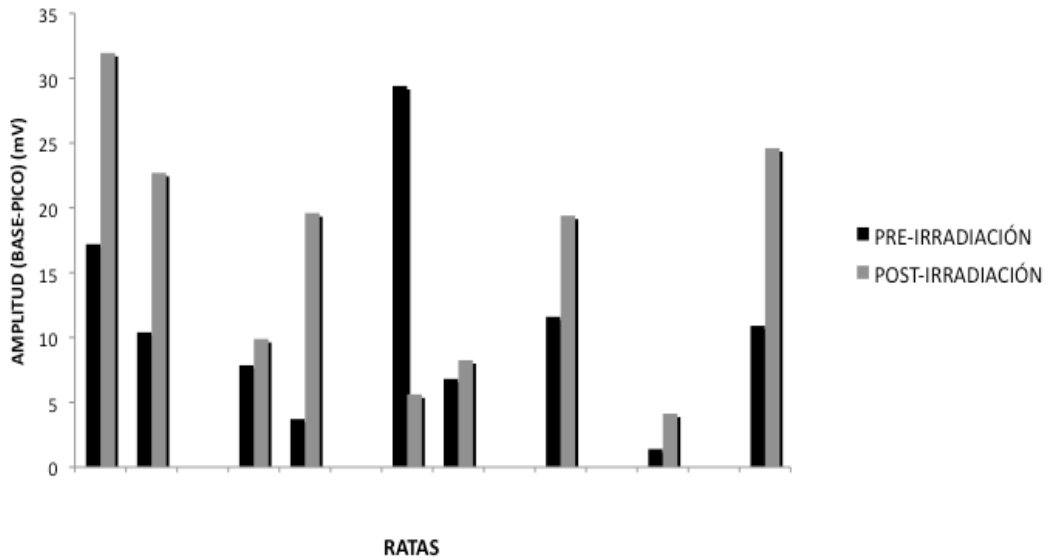
**GRÁFICA 1. VALORES DE LATENCIA EN EL POTENCIAL ELECTROMIOGRÁFICO POR LA ESTIMULACIÓN DEL NERVIÓ CIÁTICO Y REGISTRO EN MÚSCULO GEMELO EN RATAS PRE Y POST-IRRADIACIÓN DE LA ZONA LUMBO-SACRA DE LA MÉDULA ESPINAL**



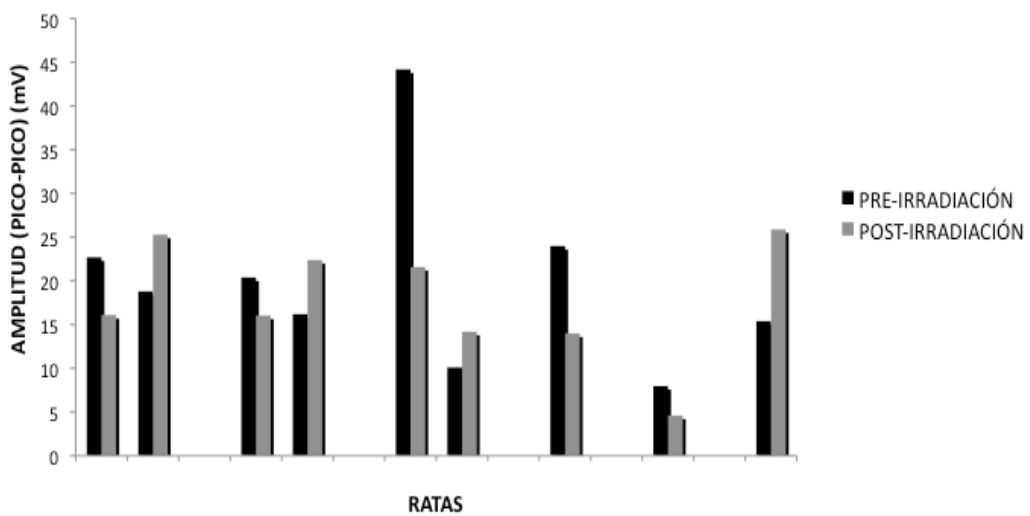
**GRÁFICA 2. VALORES DE DURACIÓN DEL POTENCIAL ELECTROMIOGRÁFICO POR LA ESTIMULACIÓN DEL NERVIÓ CIÁTICO Y REGISTRO EN MÚSCULO GEMELO EN RATAS PRE Y POST-IRRADIACIÓN DE LA ZONA LUMBO-SACRA DE LA MÉDULA ESPINAL**



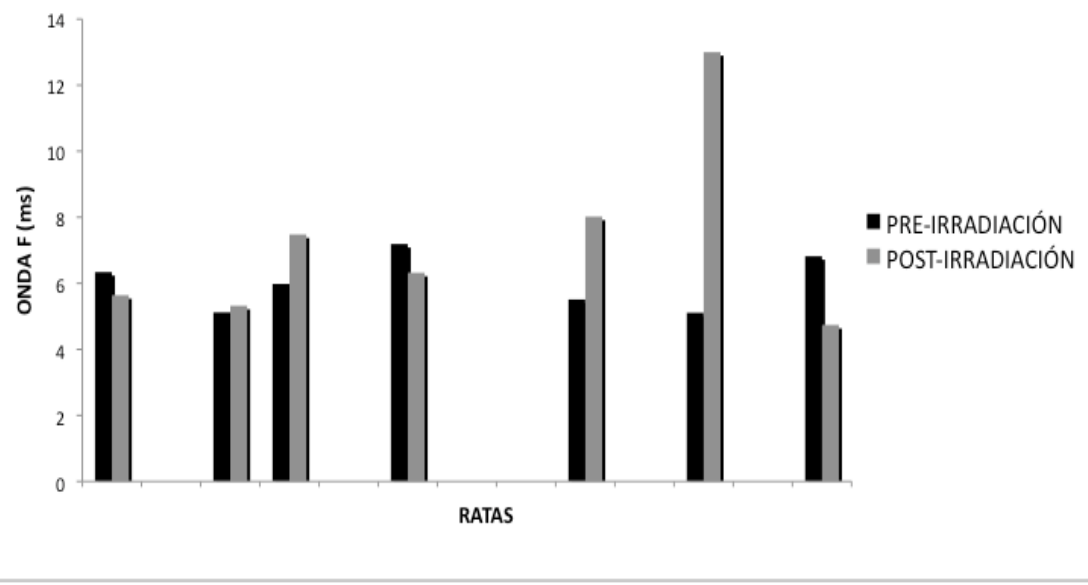
**GRÁFICA 3. VALORES DE AMPLITUD (BASE-PICO) DEL POTENCIAL ELECTROMIOGRÁFICO POR LA ESTIMULACIÓN DEL NERVIÓ CIÁTICO Y REGISTRO EN MÚSCULO GEMELO EN RATAS PRE Y POST-IRRADIACIÓN EN LA REGIÓN LUMBO-SACRA DE LA MÉDULA ESPINAL**



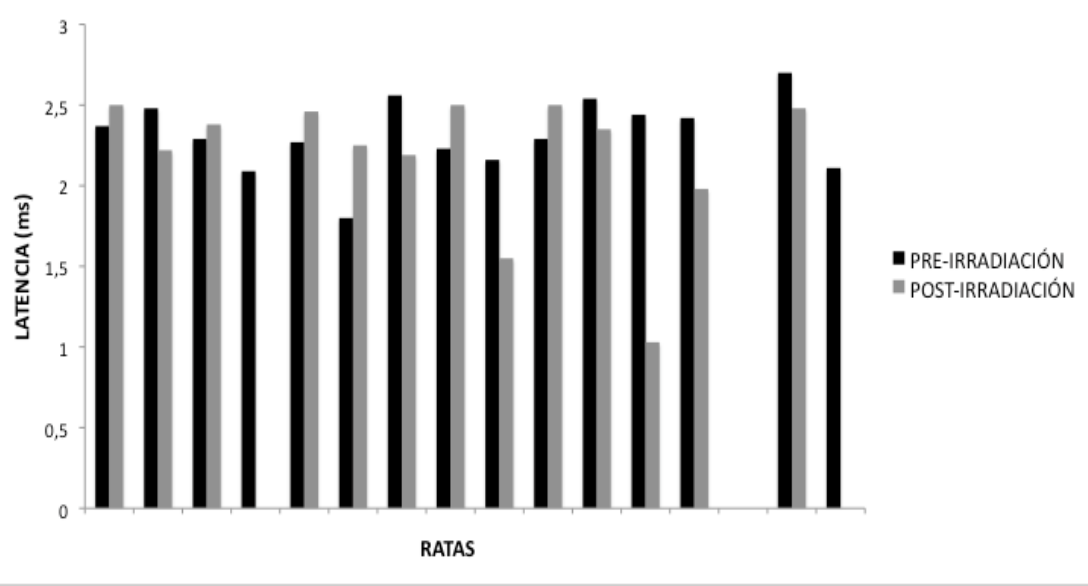
**GRÁFICA 4. VALORES DE AMPLITUD (PICO-PICO) DEL POTENCIAL ELECTROMIOGRÁFICO POR LA ESTIMULACIÓN DEL NERVIÓ CIÁTICO Y REGISTRO EN MÚSCULO GEMELO EN RATAS PRE Y POST-IRRADIACIÓN DE LA REGIÓN LUMBO-SACRA DE LA MÉDULA ESPINAL**



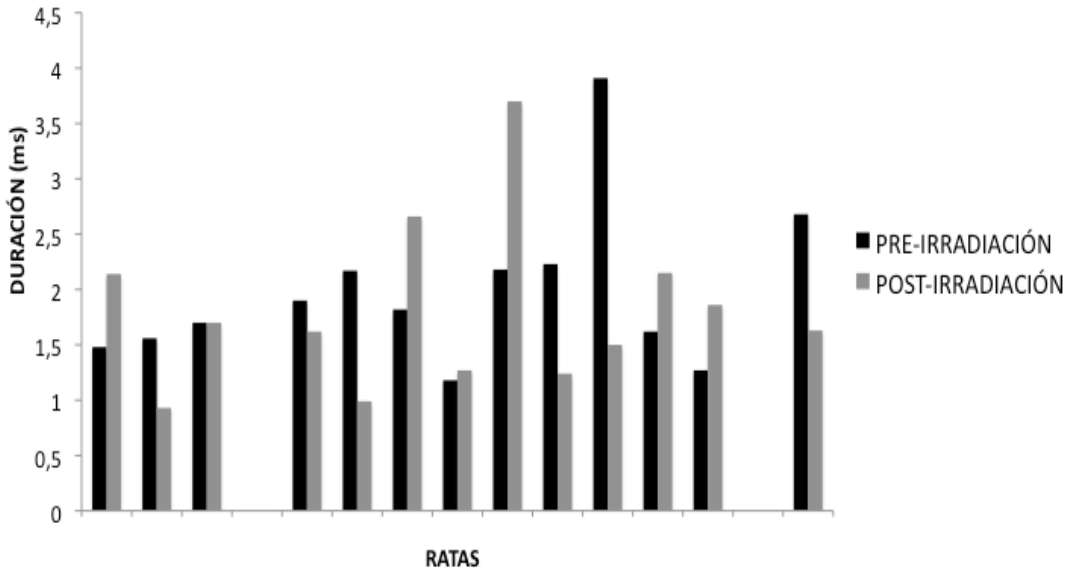
**GRÁFICA 5. VALORES DE LA ONDA F DEL POTENCIAL ELECTROMIOGRÁFICO POR LA ESTIMULACIÓN DEL NERVIÓ CIÁTICO Y REGISTRO EN MÚSCULO GEMELO DE RATAS PRE Y POST-IRRADIACIÓN DE LA REGIÓN LUMBO-SACRA DE LA MÉDULA ESPINAL**



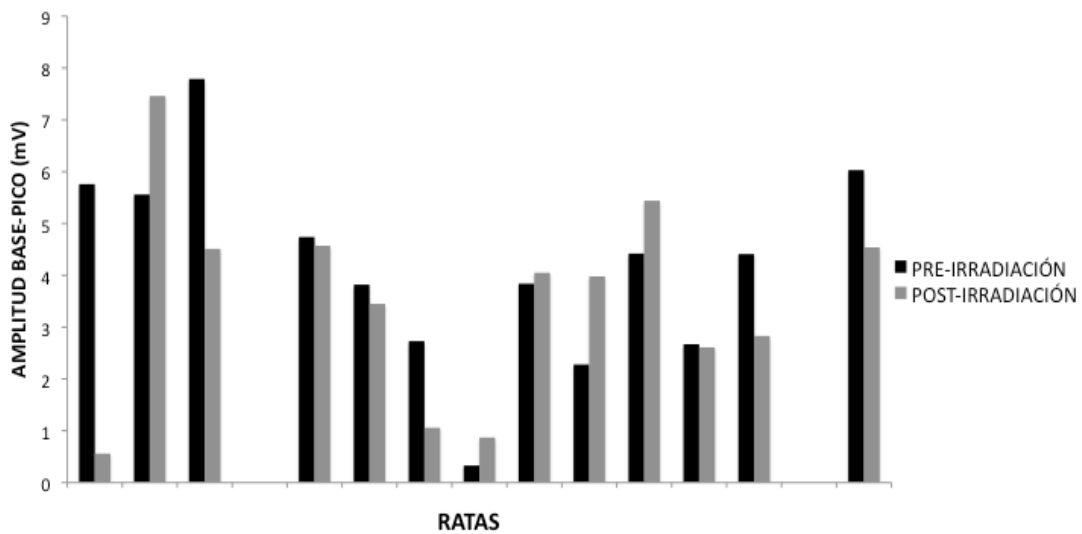
**GRÁFICA 6. VALORES DE LATENCIA DEL POTENCIAL ELECTROMIOGRÁFICO POR LA ESTIMULACIÓN DEL NERVIÓ CIÁTICO Y REGISTRO EN MÚSCULOS PLANTARES EN RATAS PRE Y POST-IRRADIACIÓN EN LA REGIÓN LUMBO-SACRA DE LA MÉDULA ESPINAL**



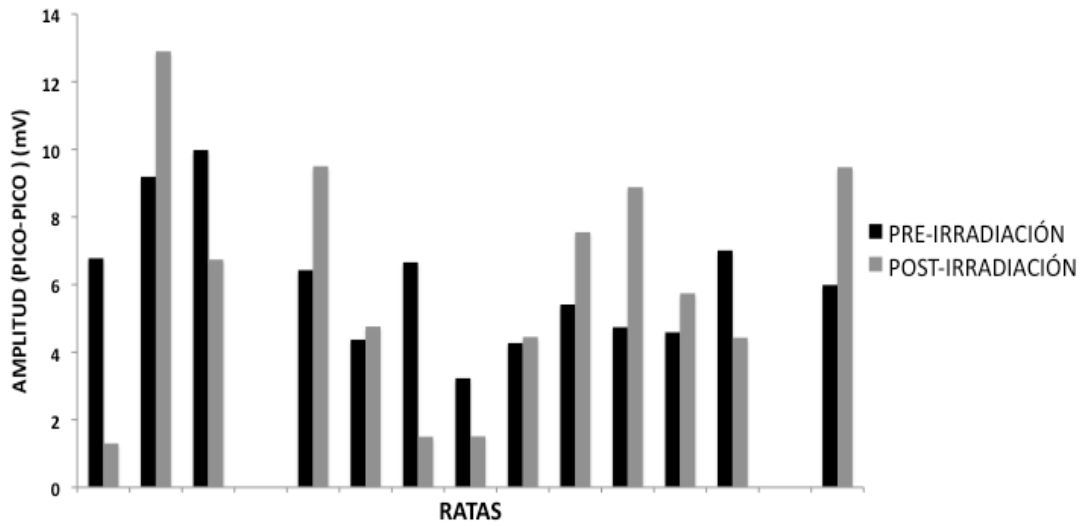
**GRÁFICA 7. VALORES DE LA DURACIÓN DEL INTERVALO L1-L4 POR LA ESTIMULACIÓN DEL NERVI  
CIÁTICO Y REGISTRO EN MÚSCULOS PLANTARES EN RATAS PRE Y POST-IRRADIACIÓN DE LA REGIÓN  
LUMBO-SACRA DE LA MÉDULA ESPINAL**



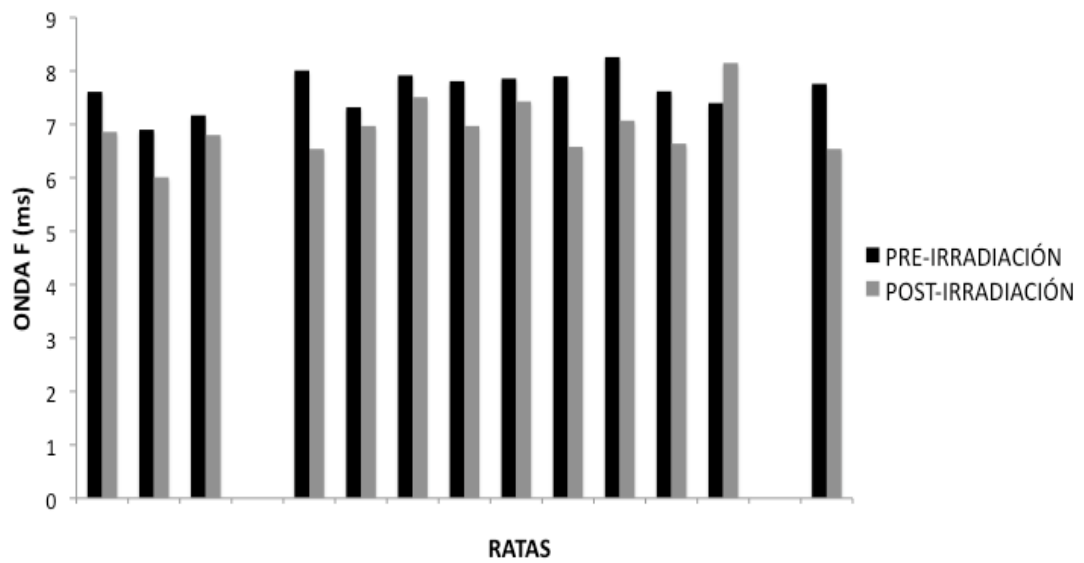
**GRÁFICA 8. VALORES DE AMPLITUD BASE-PICO DEL POTENCIAL ELECTROMIOGRÁFICO POR LA  
ESTIMULACIÓN DEL NERVI CIÁTICO Y REGISTRO EN MÚSCULOS PLANTARES EN RATAS PRE Y  
POST-IRRADIACIÓN DE LA REGIÓN LUMBO-SACRA DE LA MÉDULA ESPINAL**



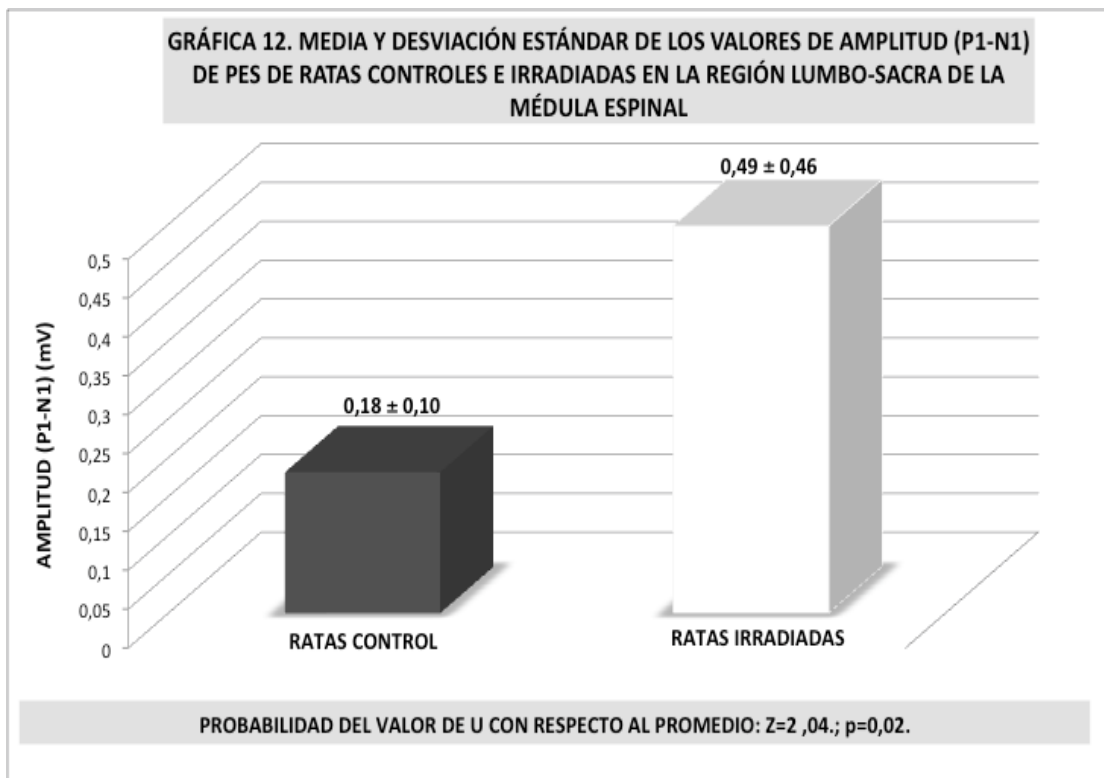
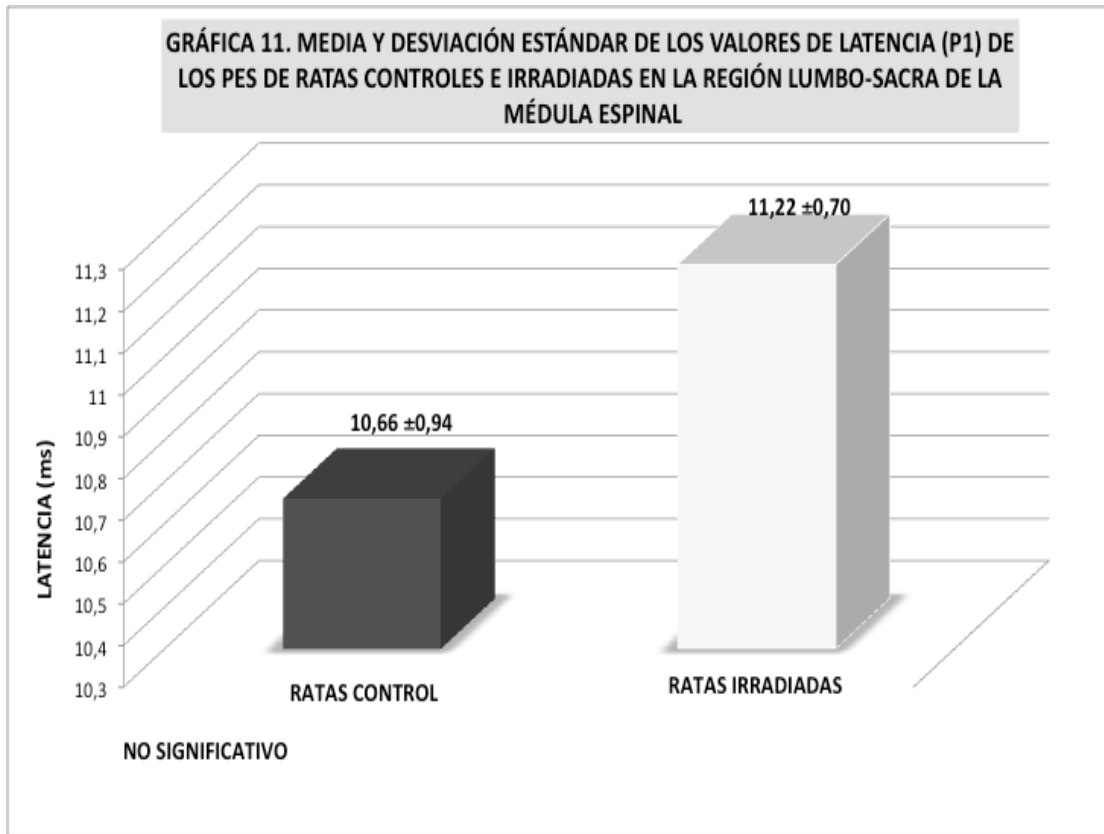
**GRÁFICA 9. VALORES DE AMPLITUD PICO-PICO DEL POTENCIAL ELECTROMIOGRÁFICO POR LA ESTIMULACIÓN DEL NERVIU CIÁTICO Y REGISTRO EN MÚSCULOS PLANTARES EN RATAS PRE Y POST-IRRADIACIÓN DE LA REGIÓN LUMBO-SACRA DE LA MÉDULA ESPINAL**



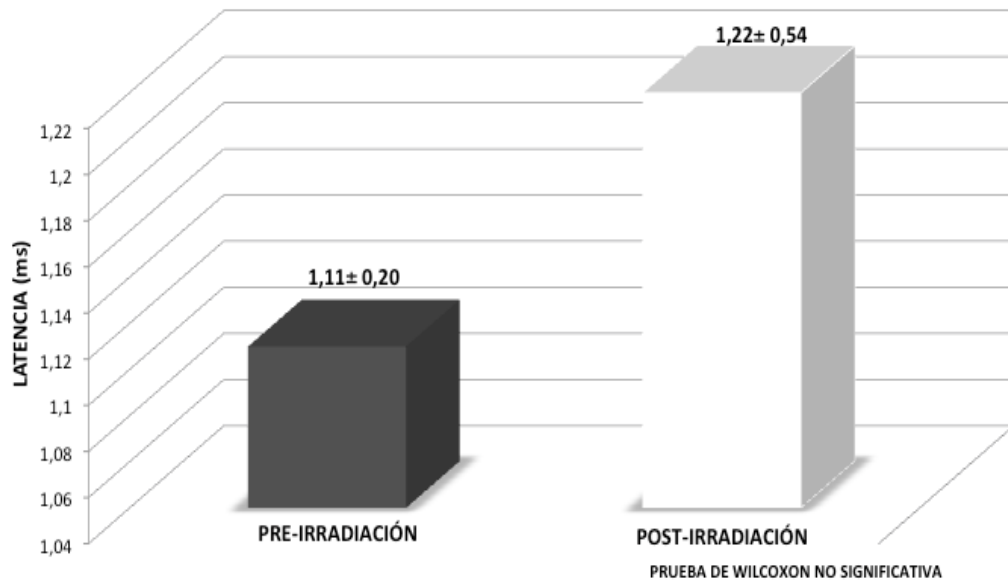
**GRÁFICA 10. VALORES DE LA ONDA F DEL POTENCIAL ELECTROMIOGRÁFICO POR LA ESTIMULACIÓN DEL NERVIU CIÁTICO Y REGISTRO EN MÚSCULOS PLANTARES EN RATAS EN PRE Y POST-IRRADIACIÓN DE LA REGIÓN LUMBO-SACRA DE LA MÉDULA ESPINAL**



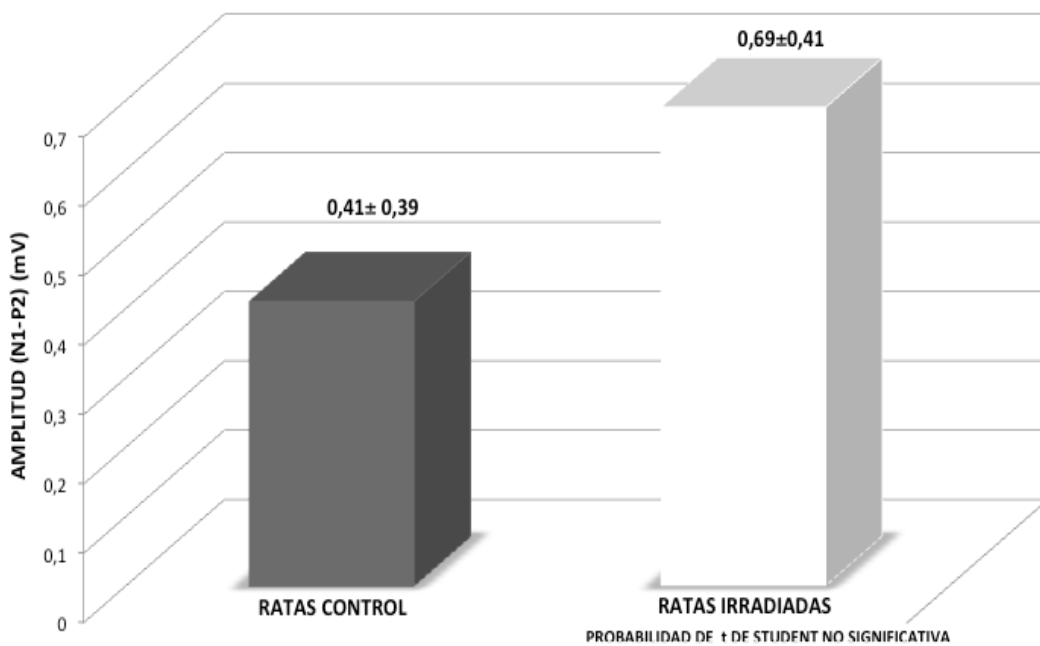




**GRÁFICA 13. MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS VALORES DE LATENCIA EN EL POTENCIAL ELECTROMIOGRÁFICO POR LA ESTIMULACIÓN DEL NERVO CIÁTICO Y REGISTRO EN MÚSCULO GEMELO EN RATAS PRE Y POST-IRRADIACIÓN DE LA ZONA LUMBO-SACRA DE LA MÉDULA ESPINAL**



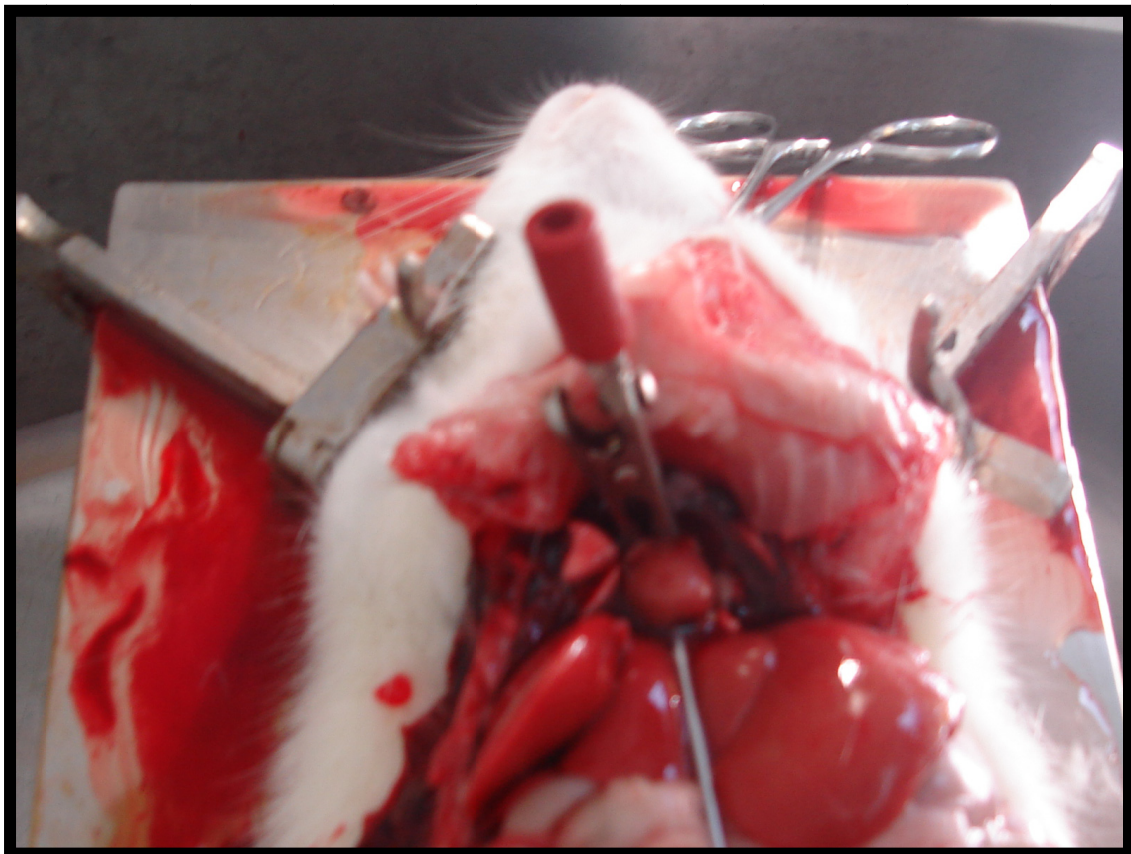
**GRÁFICA 14. MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS VALORES DE AMPLITUD N1-P2 DE PES DE RATAS CONTROL E IRRADIADAS EN LA REGIÓN LUMBO-SACRA DE LA MÉDULA ESPINAL**





## **9.2Fotos**





**FOTO ANEXO 1.**Perfusión de una de las ratas del estudio que fue sometida a radiación ionizante en la región lumbo-sacra de la médula espinal.

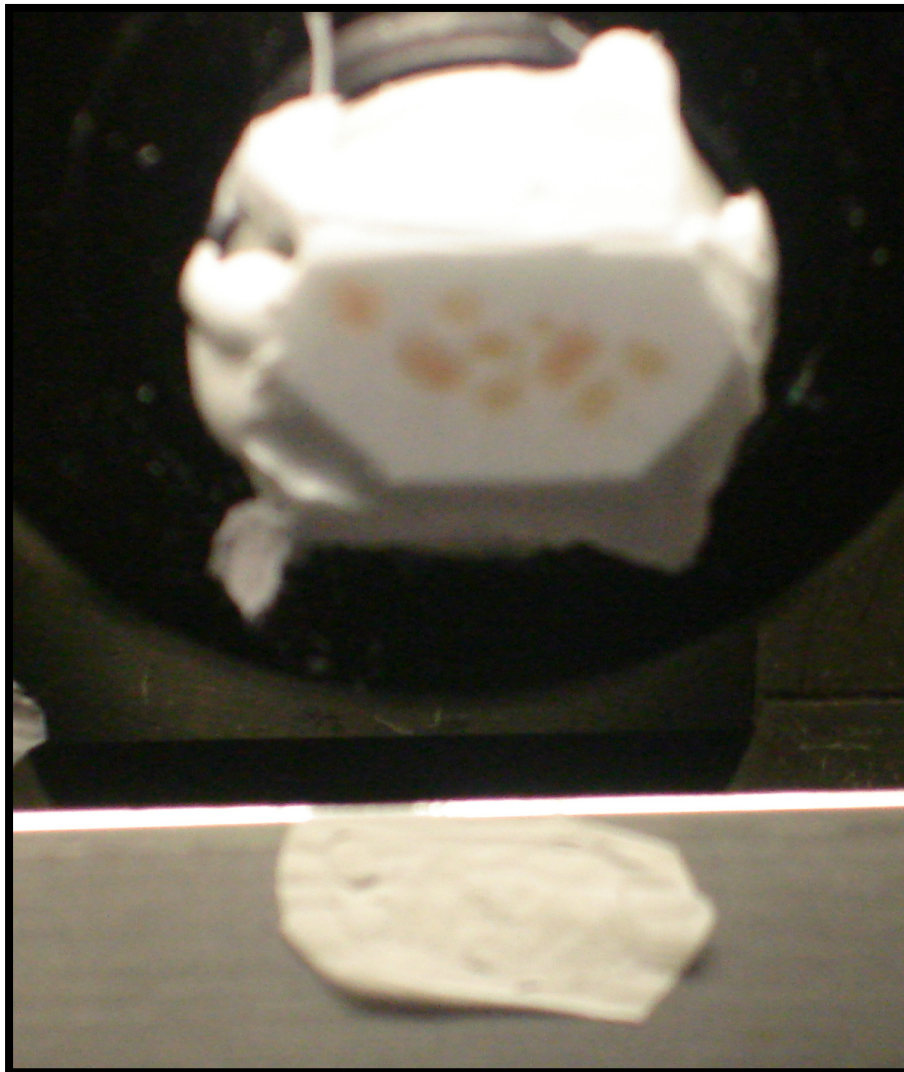




**FOTO ANEXO 2:**Proceso de extracción de la médula espinal de una de las ratas sometidas a radiación ionizante en la región lumbosacra.







**FOTO ANEXO 3:**Sección de tejido medular de una rata sometida a radiación ionizante en la región lumbo-sacra de la médula espinal.



## **9.3 Tablas de Resultados**







**TABLA ANEXO 2. VALORES DE LATENCIA, DURACIÓN, AMPLITUDES (B-P) Y (P-P) Y DE LA ONDA F DEL ESTUDIO ELECTROMIOGRÁFICO POR ESTIMULACIÓN DEL NERVIPO CIÁTICO Y REGISTRO EN MÚSCULO PLANTAR INTERNO EN RATAS ANTES (A) Y DESPUÉS (B) DE LA IRRADIACIÓN A LA REGIÓN LUMBO-SACRA DE LA MÉDULA ESPINAL**

ESTIMULACIÓN CIÁTICO-PLANTARES										
RATA	LATENCIA		DURACIÓN (ms)		AMPLITUD		AMPLITUD		ONDA F (ms)	
	(ms) (L1)		INTERVALO L1-L4		(B-P) (mV) L1-L3		(P-P) L3-L4			
ESTUDIO										
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<b>1</b>	2,37	2,5	1,48	2,14	5,76	0,56	6,78	1,3	7,61	6,86
<b>2</b>	2,48	2,22	1,56	0,93	5,56	7,46	9,19	12,9	6,9	6,01
<b>3</b>	2,29	2,38	1,7	1,7	7,79	4,51	9,98	6,74	7,17	6,8
<b>4</b>	2,09		1,78		0,51		1,22		6,91	
<b>5</b>	2,27	2,46	1,9	1,62	4,74	4,57	6,43	9,5	8,01	6,54
<b>6</b>	1,8	2,25	2,17	0,99	3,82	3,45	4,37	4,76	7,32	6,97
<b>7</b>	2,56	2,19	1,82	2,66	2,73	1,06	6,66	1,5	7,92	7,51
<b>8</b>	2,23	2,5	1,18	1,27	0,33	0,87	3,23	1,51	7,81	6,97
<b>9</b>	2,16	1,55	2,18	3,7	3,84	4,05	4,27	4,45	7,86	7,43
<b>10</b>	2,29	2,5	2,23	1,24	2,28	3,98	5,41	7,55	7,9	6,58
<b>11</b>	2,54	2,35	3,91	1,5	4,42	5,44	4,74	8,88	8,26	7,07
<b>12</b>	2,44	1,03	1,62	2,15	2,67	2,61	4,59	5,74	7,62	6,64
<b>13</b>	2,42	1,98	1,27	1,86	4,41	2,83	7,01	4,43	7,4	8,15
<b>14</b>	2,54		1,66		6,54		8,41		7,7	
<b>15</b>	2,7	2,48	2,68	1,63	6,03	4,54	5,99	9,47	7,76	6,54
<b>16</b>	2,11		1,68		1,34		4,06		6,94	