



EL CEREBRO EN REPOSO

A TRAVÉS DE LA ÓPTICA

Edgar Guevara

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA
[ESCUELA DE INGENIERÍA]

**COLECCIÓN
SAPIENTIA UDLAP**



[ESCUELA DE INGENIERÍA]

EL CEREBRO EN REPOSO

A TRAVÉS DE LA ÓPTICA





EL CEREBRO EN REPOSO

A TRAVÉS DE LA ÓPTICA



Edgar Guevara

UDLAP®

D.R. © 2019 Fundación Universidad de las Américas, Puebla
Ex hacienda Santa Catarina Mártir, 72810
San Andrés Cholula, Puebla, México.
Tel.: +52 222 229 21 09 • www.udlap.mx • editorial.udlap@udlap.mx

Primera edición: septiembre de 2016
Primera edición electrónica: diciembre de 2019

Queda prohibida la reproducción parcial o total, por cualquier medio, del contenido de la presente obra, sin contar con autorización por escrito del titular de los derechos de autor. El contenido de este libro, así como su estilo y las opiniones expresadas en él son responsabilidad de los autores y no necesariamente reflejan la opinión de la UDLAP.

Impreso en México.

DIRECTORIO UDLAP

Luis Ernesto Derbez Bautista

Rector

Cecilia Anaya Berríos

Vicerrectora académica

Martín Alejandro Serrano Meneses

Decano de Investigación y Posgrado

Luis Ricardo Hernández Molina

Director de Investigación y Posgrado

René Alejandro Lara Díaz

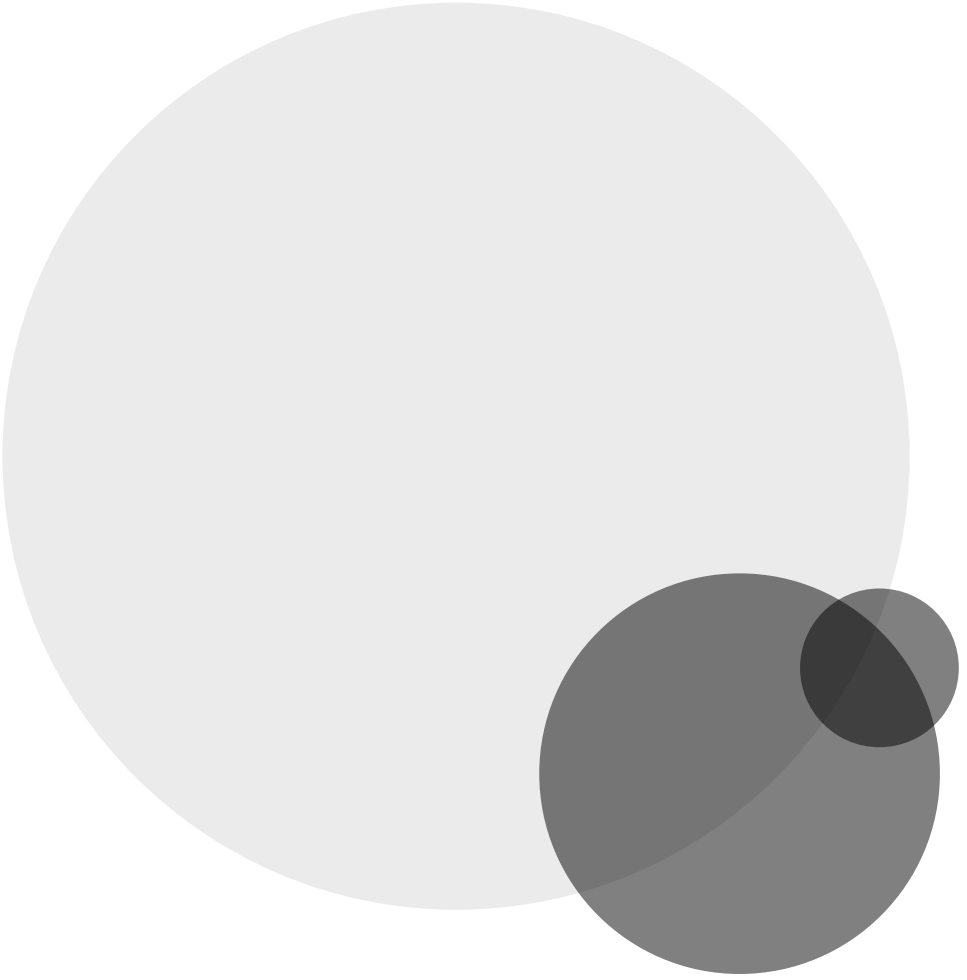
Decano de la Escuela de Ingeniería

Mayra Ortiz Prida

Directora general de la Oficina de Rectoría

Izraim Marrufo Fernández

Director de Comunicación



Índice

Introducción / 17

Breve reseña bibliográfica / 20

- ▶ Mediciones indirectas de la actividad neuronal / 20
- ▶ Conectividad funcional / 22
- ▶ Técnicas de imagenología / 23

1 Imagenología óptica intrínseca / 31

- ▶ Descripción de un sistema de imagenología óptica intrínseca (OIS) / 31
- ▶ Teoría de la OIS / 32
- ▶ Caracterización de un sistema OIS / 34
- ▶ Imagenología por contraste de granularidad / 34
- ▶ Consumo metabólico cerebral de oxígeno / 36
- ▶ Conclusiones / 37

2 Tomografía laminar óptica / 39

- ▶ Teoría de la LOT / 40
- ▶ Descripción del sistema LOT / 46
- ▶ Resultados de la simulación / 48
- ▶ Resultados experimentales / 50
 - » Imágenes del fantoma / 51

»Imágenes *in vivo* / 51

▶ Conclusiones / 55

3 Tomografía por coherencia óptica / 57

▶ Teoría de la OCT / 59

▶ Diseño de un sistema OCT / 60

»Brazo de muestra / 61

»Brazo de referencia / 62

▶ Programa de adquisición de datos / 63

▶ Caracterización del sistema / 63

»Resolución / 63

»Profundidad de penetración,
sensibilidad y rango dinámico / 65

▶ OCT Doppler / 67

▶ Métodos experimentales / 68

▶ Resultados experimentales / 69

▶ Conclusiones / 70

4 Conectividad funcional / 73

▶ Descripción de los algoritmos / 74

»Conectividad funcional basada en
regiones de interés / 74

»Análisis de componentes
independientes (ICA) / 76

»Agrupamiento jerárquico / 78

»Teoría de grafos / 78

5 Imagenología óptica de redes

epilépticas en ratones / 83

▶ **Métodos / 87**

»Preparación animal / 87

»Modelo de epilepsia y electrofisiología / 88

»Sistema óptico / 88

»Imagenología por señales ópticas intrínsecas (OIS) / 89

»Imagenología de contraste
por granularidad láser (LSCI) / 90

»Consumo metabólico cerebral de oxígeno ($CMRO_2$) / 91

»Conectividad funcional (fc) / 91

▶ **Resultados / 93**

»Identificación de redes funcionales / 93

»Cambios en la conectividad
después de la inyección de 4-AP / 93

»Correlación entre fc y duración de la crisis epiléptica / 95

▶ **Discusión / 96**

»La actividad epiléptica conduce a un aumento
y a un decremento de conectividad funcional / 97

»La correlación entre la actividad electrofisiológica
y la conectividad en reposo / 98

»El consumo metabólico refleja cambios
hemodinámicos / 99

▶ **Conclusión / 99**

6 Imagenología óptica de la conectividad funcional en estado de reposo en un nuevo modelo de rigidez arterial / 103

▶ **Materiales y métodos / 106**

- »Modelo animal / 106
- »Aplicación del cloruro de calcio / 106
- »Imagenología OIS / 107
- »Análisis de redes en reposo / 107
- Mediciones de teoría de grafos / 108
- ▶ **Resultados / 109**
 - »Conectividad funcional basada en regiones de interés / 109
 - »Mediciones de teoría de grafos / 110
- ▶ **Discusión / 112**
 - »Cambios hemodinámicos / 113
 - »CMRO₂ / 114
 - »Mediciones de teoría de grafos / 114
 - »Impacto para BOLD-fMRI / 115
- ▶ **Conclusión / 116**

7 Imágenes de una lesión inflamatoria en el cerebro neonato de la rata usando tomografía fotoacústica / 119

- ▶ **Materiales y métodos / 122**
 - »Declaración ética / 122
 - »Lesión inflamatoria neonatal / 122
 - »Imagenología PAT / 123
 - »Análisis de conectividad funcional basado en regiones de interés / 124
 - »Limpieza / 125
 - »Histología / 127
 - »Conteo de vasos sanguíneos / 127

»Análisis estadístico / 128

▶ **Resultados / 128**

»Saturación cortical local / 128

»Cuantificación microvascular / 129

»Conectividad basada en regiones de interés / 129

▶ **Discusión / 129**

»Saturación cortical local / 129

»Conectividad basada en regiones de interés / 130

▶ **Conclusiones / 131**

8 **Discusión general / 133**

▶ **Aplicación de la fc a la epilepsia / 134**

»La conectividad regional bilateral se altera con la inyección de un agente epileptogénico local / 134

»Los cambios en fc se correlacionan con la duración de la crisis / 135

▶ **Aplicación de la fc a la rigidez arterial / 136**

»Hay un desacople entre las mediciones hemodinámicas y la actividad metabólica en las correlaciones bilaterales funcionales / 136

»Las redes funcionales en estado de reposo derivadas de señales hemodinámicas se alteran después de la calcificación unilateral de la arteria carótida / 136

▶ **Aplicación de la fc a lesiones de materia blanca / 137**

»Los valores locales de SO_2 son significativamente más bajos en el grupo lesionado, a comparación de los controles / 137

»La fc bilateral disminuye de manera significativa con la leucomalacia periventricular / 138

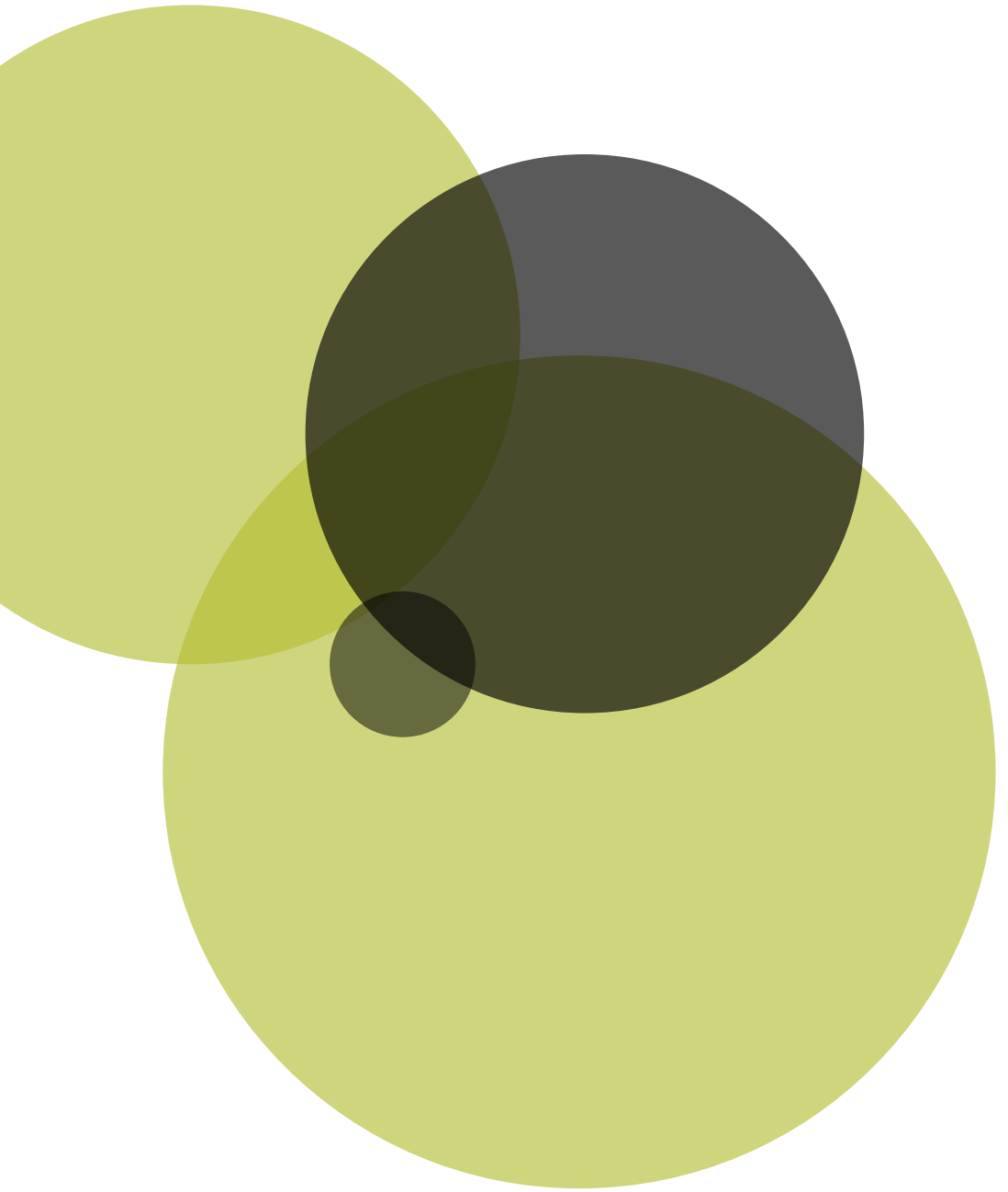
Conclusión y recomendaciones / 141

- ▶ **Limitaciones de las aplicaciones propuestas / 141**
 - » Frecuencia de muestreo de las imágenes / 141
 - » Filtrado temporal / 142
 - » Escala temporal / 142
 - » Movimiento de la cabeza / 143
 - » Remover factores fisiológicos de confusión: ¿cuántos regresores son demasiados? / 143
 - » Ruido en las mediciones / 144
 - » Efectos de la anestesia en las redes en reposo / 144
- ▶ **Mejoras y perspectivas a futuro / 145**
 - » Incrementar la frecuencia de muestreo de imágenes / 145
 - » Optimizar las mediciones de CBF / 145
 - » Limitar el movimiento de la cabeza de los neonatos / 146
 - » Técnicas adicionales de limpieza / 146
 - » Reducir la variabilidad en la colocación de ROI / 146
 - » Explorar diversas técnicas de conectividad funcional / 147

Apéndice I Lista de acrónimos y abreviaciones / 149

Apéndice II / 153

Referencias / 181



INTRODUCCIÓN

El funcionamiento del cerebro se ha estudiado tradicionalmente en términos de las respuestas fisiológicas a la administración de estímulos externos o tareas. Desde el estudio temprano de la fisiología (Hubel y Wiesel, 1962) hasta los paradigmas de activación cognitiva en humanos (Raichle, 1998), este enfoque ha sido sumamente valioso para establecer vínculos entre la topografía cerebral y las funciones del cerebro; esta perspectiva considera que el cerebro es conducido -principalmente- por estímulos externos, ignorando el hecho de que el cerebro humano consume 20% de la energía total del cuerpo en reposo, aún y cuando sólo constituye menos del 2% de la masa corporal total (Raichle, 1998, 2010).

En los últimos años se han desarrollado una gran variedad de técnicas de imagenología funcional para registrar de manera indirecta las señales metabólicas de la actividad neuronal en el sistema nervioso central. Hace poco más de un cuarto de siglo apareció una de las modalidades más prometedoras, llamada imagenología por resonancia magnética funcional (fMRI). Dicha técnica usa un método no invasivo que se base en el contraste de nivel de oxigenación sanguínea (BOLD), aprovechando las propiedades paramagnéticas de la hemoglobina desoxigenada HbR (Ogawa *et al.*, 1990).

La motivación empírica para el estudio de la actividad neuronal espontánea surgió de la primera observación de este tipo, cuando se detectó actividad espacialmente coherente en la señal BOLD de la fMRI (Biswal *et al.*, 1995). En su artículo transcendental, Biswal y sus colegas observaron fluctuaciones espontáneas de actividad en la corteza motriz derecha, las cuales estaban correlacionadas con las fluctuaciones

espontáneas de su parte homóloga contralateral; esto ocurría incluso cuando no se efectuaba ninguna actividad motriz explícita. Este resultado ha sido replicado por varios grupos de investigación desde entonces. Estos estudios se han extendido a otras regiones del cerebro, como la corteza visual, auditora y las zonas encargadas de procesar el lenguaje (Cordes *et al.*, 2001; De Luca *et al.*, 2006; Fox *et al.*, 2006; Greicius *et al.*, 2003; Lowe *et al.*, 2000). Existen regiones cerebrales que muestran un incremento en su actividad BOLD cuando se encuentran en reposo, respecto a cuando desempeñan una acción; estas regiones que muestran un decremento en su actividad al efectuar tareas experimentales se les denominó la red neuronal por defecto (DMN) (Raichle *et al.*, 2001). La conectividad funcional (fc) es un método que describe la correlación temporal entre áreas espacialmente remotas (Friston, 2011); las regiones de actividad coherente que resultan de aplicar métodos de conectividad funcional se denominan redes en estado de reposo (RSN) (Fox y Raichle, 2007; la Iglesia-Vaya *et al.*, 2013). Lejos de ser sólo ruido bonito, estas fluctuaciones espontáneas se encuentran correlacionadas con zonas cerebrales funcionalmente conectadas (Deco y Corbetta, 2011). A pesar de que la fMRI se usa ampliamente en humanos, su aplicación en animales pequeños sigue siendo difícil, ya que el tamaño del cerebro del roedor requiere de una imagen por resonancia magnética (MRI) con una razón señal a ruido (SNR) y una resolución espacial excepcionalmente buenas (Benveniste y Blackband, 2002; Jonckers *et al.*, 2011); esto complica y hace ardua la tarea de relacionar los estudios en humanos con modelos murinos de diversas enfermedades, donde los mecanismos moleculares y genéticos de la propia enfermedad se encuentran bien caracterizados. La fMRI con contraste BOLD se emplea ampliamente en imagenología funcional, y es una técnica sujeta a factores de confusión debido a los efectos en competencia de los cambios en el flujo sanguíneo cerebral (CBF) y el metabolismo del oxígeno. Una alternativa que puede resultar atractiva, para circundar las limitaciones inherentes a la fMRI, es el uso de la imagenología óptica en el animal pequeño. Primeramente, puede presentar la posibilidad de revelar redes funcionales de manera consistente, con aquellas encontradas en el estado de reposo; segundo,

al usar múltiples longitudes de onda se puede obtener un conjunto completo de parámetros hemodinámicos, los cuales se pueden emplear para desambiguar los factores de confusión presentes en la señal BOLD. Finalmente, al trasladar los avances en las técnicas de conectividad funcional obtenidos con fMRI, en humanos, hacia las técnicas ópticas en modelos murinos de enfermedad, se amplían las perspectivas de estudio en una multitud de modelos animales, los cuales son rentables y eficientes, además de poseer alta similitud genética con el humano (European Commission Workshop, 2010). Por consiguiente, el objetivo de este libro es presentar cómo se logra la combinación de varias modalidades de imagenología óptica con la cartografía de la conectividad funcional en el estado de reposo.

Los estudios que se presentan en este libro tienen como meta establecer la utilidad de diferentes técnicas de imagenología óptica, como la imagenología óptica intrínseca (OIS) multi-espectral, la imagenología de contraste por granularidad láser (LSCI) y la tomografía fotoacústica (PAT) para evaluar la conectividad en reposo en varios modelos de pequeño animal. Al usar varias longitudes de onda diferentes para la iluminación, se pueden estimar cambios relativos en la concentración de hemoglobina oxigenada (HbO_2) y desoxigenada (HbR), a la vez que la imagenología por granularidad da acceso al flujo sanguíneo cerebral (CBF) relativo. La combinación de dichas variables fisiológicas en un modelo matemático permite la estimación del consumo metabólico de oxígeno (CMRO_2), el cual es una medición más estrechamente relacionada con la actividad cerebral que las mediciones de hemoglobina por sí solas (Brieu *et al.*, 2010; Zappe *et al.*, 2008). Así que, debido al acceso a componentes hemodinámicos distintos, la conectividad funcional (fc) basada en la imagenología óptica de señales intrínsecas (fcOIS) puede proporcionar información adicional que complementa los estudios en estado de reposo que se han hecho con la fMRI en el contexto de enfermedades neurológicas y vasculares. La PAT es una técnica que combina lo mejor de dos mundos: el contraste intrínseco de la imagenología óptica, con la resolución espacial y profundidad de detección del ultrasonido (Wang y Hu, 2012). El principio de funcionamiento es como sigue: un pulso corto de láser es absorbido

por las moléculas presentes en el tejido vivo, lo cual genera una onda de presión ultrasónica, la cual puede ser detectada con un transductor piezoeléctrico para formar imágenes de ultrasonido (Wang *et al.*, 2003). Es una técnica no invasiva y se presta naturalmente para aplicaciones en modelos neonatos, otorgando acceso a las capas más profundas del cerebro.

Las técnicas presentadas en esta obra son un intento de desciframiento de los correlatos funcionales en varios modelos de enfermedades, que pretenden conducirnos a un mejor entendimiento de los cambios en conectividad en modelos roedores.

BREVE RESEÑA BIBLIOGRÁFICA

► Mediciones indirectas de la actividad neuronal

La imagenología del cerebro depende ampliamente de las señales hemodinámicas evocadas. En 1878, un científico italiano llamado Mosso puso a prueba la hipótesis de que el flujo sanguíneo está relacionado con la actividad cerebral, registrando cambios en el volumen sanguíneo del cerebro (CBV) relacionados con variaciones en el flujo sanguíneo cerebral (CBF) de la duramadre expuesta en la región frontal de un sujeto de 37 años (Mosso, 1884; Sandrone *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2010; Zago *et al.*, 2012). El científico observó que las pulsaciones en la corteza frontal se incrementaban durante la ejecución de una tarea de cálculo. Aunque las técnicas modernas no se basan en los mismos principios que el experimento de Mosso, su idea de mediciones indirectas de la actividad neuronal puede considerarse como la precursora de la neuroimagenología funcional moderna.

Cuando una neurona se despolariza, hay un consumo de oxígeno local indicado por un incremento inicial en HbR. Unos cuantos segundos después (1-2 s), hay un gran incremento, tanto en el CBF, como en el CBV, debido a un mecanismo compensatorio al consumo inicial de oxígeno. Esta amplia discordancia entre el suministro y el consumo de oxígeno provoca un aumento atrasado en la concentración local de HbO₂ y, por consiguiente, la subsecuente disolución de HbR (Maloney y

Grinvald, 1996). Estas respuestas fisiológicas tienen una anchura temporal de 4-6 s, incluso cuando son producto de un muy breve estímulo; este retraso depende del filtro metabólico de cada región cerebral, de la elección del estimador y de la duración del estímulo (tiempo de actividad) (Liao *et al.*, 2002; Saad *et al.*, 2003). Así, la actividad de las neuronas se puede localizar y cuantificar indirectamente a través de la medición de cambios hemodinámicos en respuesta a la activación eléctrica: esto es lo que se denomina respuesta hemodinámica (HDR).

No obstante, la relación entre la actividad neural y la HDR sigue siendo una relación compleja, incluso no lineal (Devor *et al.*, 2003). Esta no-linealidad se vuelve aún más pronunciada cuando se compara la HDR contra un amplio rango de estímulos (Buxton *et al.*, 2004). Existe otro resultado sujeto a controversia en la literatura (Chen y Pike, 2009), el llamado «caída inicial»: un decremento en la señal de la HDR (debido a un aumento en la HbR) que dura 1-2 s, antes del aumento estándar de la HbO₂; esta caída inicial se ha reportado en imagenología óptica (Malonek y Grinvald, 1996) pero su efecto es pequeño y no siempre está presente (Buxton, 2001); en algunos estudios incluso se ha demostrado que el aumento inicial de la HbR se balancea por una disminución igual de la HbO₂ (Devor *et al.*, 2003).

Una noción comúnmente aceptada es que la regulación precisa del flujo sanguíneo involucra la dilatación de las arteriolas (Cox *et al.*, 1993), pero no hay explicación satisfactoria al mecanismo de transferencia de señal de las neuronas hacia la vascularización circundante. Una hipótesis sostiene que la activación de conjuntos específicos de interneuronas vasomotoras puede evocar de manera directa la dilatación o la constricción de los vasos sanguíneos adyacentes, transmutando así las señales neuronales en respuestas vasculares (Cauli *et al.*, 2004). Otra hipótesis manifiesta que el glutamato liberado por las neuronas que se disparan inicia ondas de calcio en los astrocitos; este calcio postsináptico a su vez induce la liberación de varios agentes vaso-activos que son fundamentales en el aumento de CBF (Iadecola, 2004). Es más, existe evidencia creciente que los astrocitos pueden ser un componente crítico en el acoplamiento neuro-vascular y la HDR (Petzold y Murthy, 2011; Yu *et al.*, 2010).

Este acoplamiento neurovascular complejo hace que la interpretación de la imagenología óptica resulte difícil. Sin embargo, la actividad neuronal se ve reflejada sin duda alguna en los cambios hemodinámicos, los cuales son detectables por medio de las técnicas de imagenología óptica utilizadas en esta obra.

► Conectividad funcional

El término conectividad funcional (fc) se aplica a una gran variedad de estudios que examinan las correlaciones coherentes entre regiones de actividad neuronal, tanto durante actividades cognitivas, como durante el reposo (Fox y Raichle, 2007). En el presente trabajo, se exploró la fc en ausencia de estímulos externos. Es una técnica sensible a la sincronía espacio-temporal de las fluctuaciones en la actividad neural de diferentes áreas del cerebro, las cuales pueden estar espacialmente remotas (Waites *et al.*, 2006). En el contexto de neuro-imagenología funcional, la fc se emplea para describir las relaciones entre los patrones de activación neuro-vascular de regiones anatómicamente distantes. El grado de sincronización se ha medido a través de diferentes métodos, que van desde mediciones directas de actividad neuronal como potencial de campo local (LFP) (Bressler *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2000; Magill *et al.*, 2006; Nir *et al.*, 2008; Shmuel *et al.*, 2006), electroencefalografía (EEG) (Aarabi *et al.*, 2008; Green *et al.*, 1998; Mormann *et al.*, 2003; Stam *et al.*, 2007; Thatcher *et al.*, 1986) y magnetoencefalografía (MEG) (Brookes *et al.*, 2011; Douw *et al.*, 2013; Douw *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Pasquale *et al.*, 2010), hasta las mediciones indirectas de fluctuaciones de señales fisiológicas relacionadas con la acción neuronal como la imagenología por resonancia magnética funcional (fMRI) (Beckmann, DeLuca *et al.*, 2005; Biswal *et al.*, 1995; Damoiseaux *et al.*, 2006; De Luca *et al.*, 2006; Fox y Raichle, 2007; Greicius *et al.*, 2003) y una gran variedad de técnicas de imagenología óptica: la espectroscopía en el cercano infrarrojo (NIRS) (Lu *et al.*, 2010; Mesquita *et al.*, 2010; Sasai *et al.*, 2011; Wolf *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010), la tomografía óptica difusa (DOT) (Liao *et al.*, 2012; Niu *et al.*, 2011; White *et al.*, 2009; White *et al.*, 2012), la imagenología óptica de señales intrínsecas

(OIS) (Bero *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; White *et al.*, 2011) y la tomografía fotoacústica (PAT) (Xiang *et al.*, 2012). Mencionaré la aplicación de las técnicas anteriormente mencionadas en la siguiente sección.

► Técnicas de imagenología

EEG y MEG en humanos

El EEG es una técnica tradicional que hace uso de electrodos para capturar la actividad eléctrica espontánea del cerebro (Gibbs *et al.*, 1937). Se puede inferir la fc entre redes de neuronas midiendo la sincronización de sus actividades respectivas (Thatcher *et al.*, 1986), dicha técnica ha sido ampliamente estudiada con mediciones de EEG en varios estudios, que van desde la enfermedad de Alzheimer (Stam *et al.*, 2007), pasando por lesiones en la médula espinal (Green *et al.*, 1998) hasta epilepsia (Aarabi *et al.*, 2008; Mormann *et al.*, 2003; Ponten *et al.*, 2007; Schindler *et al.*, 2007; Wendling *et al.*, 2005). A pesar de que las mediciones invasivas con LFP se han usado para investigar la conectividad relacionada con la actividad en la corteza cerebral del macaco (Bressler *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2000; Shmuel *et al.*, 2006; Stevenson y Körding, 2010), y en el cerebro del roedor (Magill *et al.*, 2006), su aplicación a estudios en humanos se limita a condiciones intra-operatorias donde la cirugía es obligatoria, por ejemplo en casos de epilepsia resistente a fármacos (He *et al.*, 2008; Nir *et al.*, 2008). El MEG es una tecnología no invasiva en la cual los campos magnéticos inducidos por el flujo de corriente en el cerebro se miden por encima del cuero cabelludo (Cohen, 1972). La exploración de la fc mediante MEG le ha añadido peso a las bases neuronales de la fMRI (Liu *et al.*, 2010); esta técnica se ha aplicado al cerebro de sujetos sanos (Brookes *et al.*, 2011; Pasquale *et al.*, 2010), a pacientes epilépticos (Douw *et al.*, 2013; Horstmann *et al.*, 2010) y a casos de esquizofrenia (Hinkley *et al.*, 2010).

fMRI en humanos

Varios estudios han demostrado que la fMRI puede utilizar la sangre como contraste indirecto para medir la respuesta de las neuronas a la estimulación sensorial (Kwong *et al.*, 1992; Ogawa *et al.*, 1992). Una téc-

nica similar que usaba MRI para cartografiar la corteza visual humana apareció unos meses antes (Belliveau *et al.*, 1991), empero, con el inconveniente de usar un agente de contraste que tenía que ser inyectado al sujeto de prueba. La fMRI se considera una alternativa más segura y cómoda a la tomografía por emisión de positrones (PET), la cual emplea glucosa modificada radioactivamente, llamada fluorodesoxiglucosa (FDG); se traza su curso al fluir dentro del cuerpo humano y su consumo indica las áreas concretas del cerebro con un metabolismo elevado, signo de actividad neural elevada (Alavi *et al.*, 1986). La PET se ha aplicado ampliamente, tanto en sujetos sanos, como en aquellos que sufren de alguna enfermedad (Friston *et al.*, 1993), a pesar de su pobre resolución espacial, la cual es una seria limitante en la imagenología del cerebro humano (Dharmarajan y Schuster, 2012).

La fc se demostró por primera vez empleando fMRI para detectar variaciones de baja frecuencia ($< 0.1\text{Hz}$) en la corteza motriz, sin ningún estímulo externo, es decir, en «estado de reposo» (Biswal *et al.*, 1995). El descubrimiento fundamental de Biswal y sus colegas fue que las regiones hemisféricas izquierda y derecha de la corteza motriz primaria no permanecen en silencio, sino que muestran una alta correlación entre sus series de tiempo BOLD; las correlaciones espaciales resultantes corresponden a los mapas de activación funcional obtenidos mediante respuestas evocadas.

La comunicación funcional entre regiones cerebrales distantes y separadas desempeña un papel importante en procesos complejos. Estas correlaciones producen mapas detallados de sistemas neuronales complejos (Biswal *et al.*, 2010). Dichas RSN son consistentes, tanto al interior de los grupos, como en diferentes sujetos (Damoiseaux *et al.*, 2006; De Luca *et al.*, 2006). Por consiguiente, analizar la conectividad funcional podría ser de relevante importancia porque podría aportar perspectivas en la organización cerebral intrínseca y su reorganización con los procesos cognitivos, patologías y efectos de los fármacos (Gusnard *et al.*, 2001; Raichle, 2011; Raichle *et al.*, 2001; van den Heuvel y Hulshoff Pol, 2010). Varios estudios interesantes han surgido a partir de estas observaciones, descubriendo una disminución en la conectividad conforme al envejecimiento (Damoiseaux *et al.*, 2008; Sun *et al.*,

2011), en casos de demencia (Gili *et al.*, 2011; Greicius *et al.*, 2004; He *et al.*, 2009; Rombouts *et al.*, 2009; Sanz-Arigita *et al.*, 2010), en patologías epilépticas (Liao *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012; Mankinen *et al.*, 2012; Waites *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009), en enfermedades cardiovasculares (Cheng *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2011; van Norden *et al.*, 2011), esquizofrenia (Lawrie *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2008; Whitfield-Gabrieli *et al.*, 2009) así también como en la depresión (Greicius *et al.*, 2007).

El descubrimiento de la conectividad funcional basada en MRI ha conllevado a amplias y variadas aplicaciones en investigación y neuroimagenología (Biswal *et al.*, 2010; Fox y Raichle, 2007; van den Heuvel y Hulshoff Pol, 2010), incluyendo avances en el conocimiento del desarrollo cerebral infantil (Fair *et al.*, 2007, 2008; Fransson *et al.*, 2007), en el cerebro del infante prematuro (Damaraju *et al.*, 2010; Doria *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2008; Smyser *et al.*, 2010) y en el síndrome de Tourette pediátrico (Church *et al.*, 2009).

Imagenología óptica en humanos

La óptica biomédica promete un fuerte potencial clínico, debido a su habilidad para monitorear el funcionamiento del cerebro de forma no invasiva y en estudios longitudinales, de manera similar a la fMRI, sólo con la diferencia que la óptica ofrece mejor resolución temporal y alta sensibilidad a dos fuentes de contraste endógeno HBO₂ y HbR. La transferencia de técnicas de fMRI en estado de reposo hacia técnicas ópticas, tales como la NIRS, ha permitido nuevos estudios sobre el desarrollo infantil. Aun así, su aplicación en clínica presenta retos significativos debido a la influencia de la fisiología sistémica y las señales hemodinámicas superficiales. Las fluctuaciones lentas espontáneas de la hemodinámica cerebral se han estudiado con la NIRS desde hace más de una década y media (Elwell *et al.*, 1999; Mesquita *et al.*, 2010; Obrig *et al.*, 2000). Mediante el uso de la NIRS se han encontrado diferentes correlaciones en adultos en estado de reposo (Toronov *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 2011), en personas mayores (Schroeter *et al.*, 2004) y en infantes durmiendo (Taga *et al.*, 2000). Los avances anteriormente mencionados han motivado diferentes estudios que hacen uso de la tecnología NIRS, demostrando con éxito la conectividad funcional (Lu

et al., 2010; Zhang *et al.*, 2010), algunos de ellos destacando características específicas a la frecuencia de las señales estudiadas o particulares a ciertas regiones cerebrales (Sasai *et al.*, 2011). A pesar de los resultados interesantes que muestran dichos estudios, existen limitaciones importantes en su desempeño, como una baja resolución espacial (...3 cm, apenas suficiente para distinguir la extensión espacial de la respuesta BOLD la cual es de ...4 cm³ [Saad *et al.*, 2003]); esta pobre resolución puede promediar correlaciones espaciales y se requiere un amplio campo de visión (FOV) para cubrir las regiones, tanto correlacionadas, como anticorrelacionadas (White, 2012). Estas limitantes han motivado el uso de sistemas DOT con una alta densidad de fuentes y detectores; este enfoque presenta la capacidad de proporcionar reconstrucciones tridimensionales de mapas de hemoglobina, todo ello mediante la resolución del problema inverso. La conectividad funcional en estado de reposo ha sido encontrada tanto en el cerebro de adultos (Niu *et al.*, 2011; White *et al.*, 2009) como en el de neonatos (White *et al.*, 2012).

fMRI en animales

La aplicación de la fMRI en el cerebro animal no ha sido sumamente extendida, debido a que se requiere un campo magnético de alta intensidad para obtener una SNR suficientemente alta para conseguir una resolución espacial adecuada para los animales pequeños (Benveniste y Blackband, 2002; Jonckers *et al.*, 2011); hasta unas recientes demostraciones, la conectividad funcional basada en MRI (fcMRI) se ha visto limitada al cerebro de la rata (Bifone *et al.*, 2010; Biswal y Kannurpatti, 2009; Hutchison *et al.*, 2010; Kalthoff *et al.*, 2011; Kannurpatti *et al.*, 2008; Magnuson *et al.*, 2010; Pawela *et al.*, 2008, 2009, 2010; van Meer *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2008) o al cerebro del simio (Moe-ller *et al.*, 2009; Shmuel y Leopold, 2008; Teichert *et al.*, 2010; Vincent *et al.*, 2007). El extender estos estudios a un modelo bien establecido y ampliamente utilizado en investigación clínica, tal como el ratón, nos permitiría emplear esta herramienta en múltiples modelos robustos de enfermedades. Cabe mencionar, dentro de este contexto, el reciente esfuerzo para establecer una comparación de mapas funcionales en estado de reposo entre la rata y el ratón (Jonckers *et al.*, 2011).

Imagenología óptica en animales

A pesar de las múltiples ventajas que ofrece la naturaleza no invasiva de la fMRI, ha existido un intenso debate en el origen de la señal que se mide, especialmente porque el efecto BOLD que es medido resulta de la combinación de varios subproductos metabólicos: concentración de HbR, la cantidad de CBF y de CBV que se encuentran dentro de un voxel de alrededor de un milímetro cúbico y dentro de la resolución temporal (tiempo de repetición, TR) de 2-3 segundos, para una adquisición fMRI típica (De Luca *et al.*, 2006). Por consiguiente, la capacidad de obtener medidas independientes de HbR, HbO₂, CBV y CBF con alta resolución espacial (~50 μm) y temporal (~5 Hz) es un factor clave para caracterizar mejor la dinámica vascular al nivel de la corteza cerebral.

La imagenología óptica de señales intrínsecas (OIS) es una técnica que puede utilizarse para efectuar mediciones de la oxigenación de la sangre, se basa en el hecho que la HbO₂ y la HbR tienen distintos espectros de absorción óptica. El montaje es relativamente sencillo: se hace incidir luz de las longitudes de onda adecuadas en el tejido nervioso expuesto y se captura una serie de imágenes con una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD). La actividad neuronal induce cambios en la concentración local de HbO₂ y HbR. Por consiguiente, las propiedades de absorción de la luz por parte del tejido nervioso se modifican debido a fluctuaciones en estos componentes de la sangre, lo cual significa que la proporción de luz reflejada también cambia. La OIS se ha aplicado ampliamente en investigación en neurociencias (Frostig *et al.*, 1990; Grinvald *et al.*, 1986; Ts'o *et al.*, 1990) y, desde entonces, se ha convertido en un método bien establecido para obtener imágenes de la actividad neuronal en la corteza cerebral expuesta del animal (Cang *et al.*, 2005; Dunn *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2007).

Aunque la OIS proporciona mediciones sobre la oxigenación de la sangre, no mide el flujo sanguíneo de manera explícita. En este caso se utiliza imagenología de contraste por granularidad láser (LSCI), la cual proporciona variaciones relativas en CBF. LSCI utiliza un montaje experimental similar al de la OIS, pero la iluminación se reemplaza por un diodo láser divergente (Hillman, 2007). Cuando esta luz coherente se hace incidir en un medio turbio, como lo es el tejido biológico, se

esparce produciendo un patrón de interferencia llamado granularidad (*speckle* en inglés) (Boas y Dunn, 2010). El contraste por granularidad se puede cuantificar de las imágenes borrosas en cada punto temporal, mediante la razón de la desviación estándar y la intensidad promedio. Si existen dispersores en movimiento en el tejido, como los glóbulos rojos, cada punto de la imagen fluctuará en intensidad. Estas fluctuaciones causan una especie de suavizado de la granularidad, lo cual reduce su contraste. Por lo tanto, las variaciones en el flujo sanguíneo pueden determinarse mediante variaciones en el contraste por granularidad (Boas y Dunn, 2010; Dunn *et al.*, 2001).

El $CMRO_2$ puede estimarse a partir de mediciones de volumen y flujo sanguíneos (Dunn *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2001; Mayhew *et al.*, 2000). Haciendo la suposición que los cambios en CBV son proporcionales a los cambios en HbT, podemos emplear la ecuación de Grubb para explorar la relación entre HbT y CBF (Grubb *et al.*, 1974). La medición simultánea de múltiples parámetros hemodinámicos nos permite describir un panorama más completo de la respuesta hemodinámica a la activación funcional (Dunn *et al.*, 2005). Se ha hecho uso de esta técnica para evaluar lesiones de la médula espinal (Brieu *et al.*, 2010) así también como en la evaluación de los efectos de la isquemia cerebral en la corteza del cerebro (Jones *et al.*, 2008; Luckl *et al.*, 2010).

Tomografía fotoacústica en animales

La tomografía fotoacústica (PAT) es una técnica no invasiva que combina las capacidades de contraste intrínseco de la imagenología óptica con la ventaja de la alta resolución espacial y el leve esparcimiento del ultrasonido (Wang y Hu, 2012). Un pulso ultra corto de láser se absorbe por las moléculas del tejido vivo, lo cual genera una onda de presión ultrasónica, la cual se detecta mediante un transductor ultrasónico para formar imágenes (Wang *et al.*, 2003). La aplicación de la PAT al estudio de la conectividad funcional no es un procedimiento común. Recientemente se mostró una aplicación (Xiang *et al.*, 2012), donde las redes cerebrales epilépticas se analizaron a través del método de causalidad de Granger (Granger, 1969).

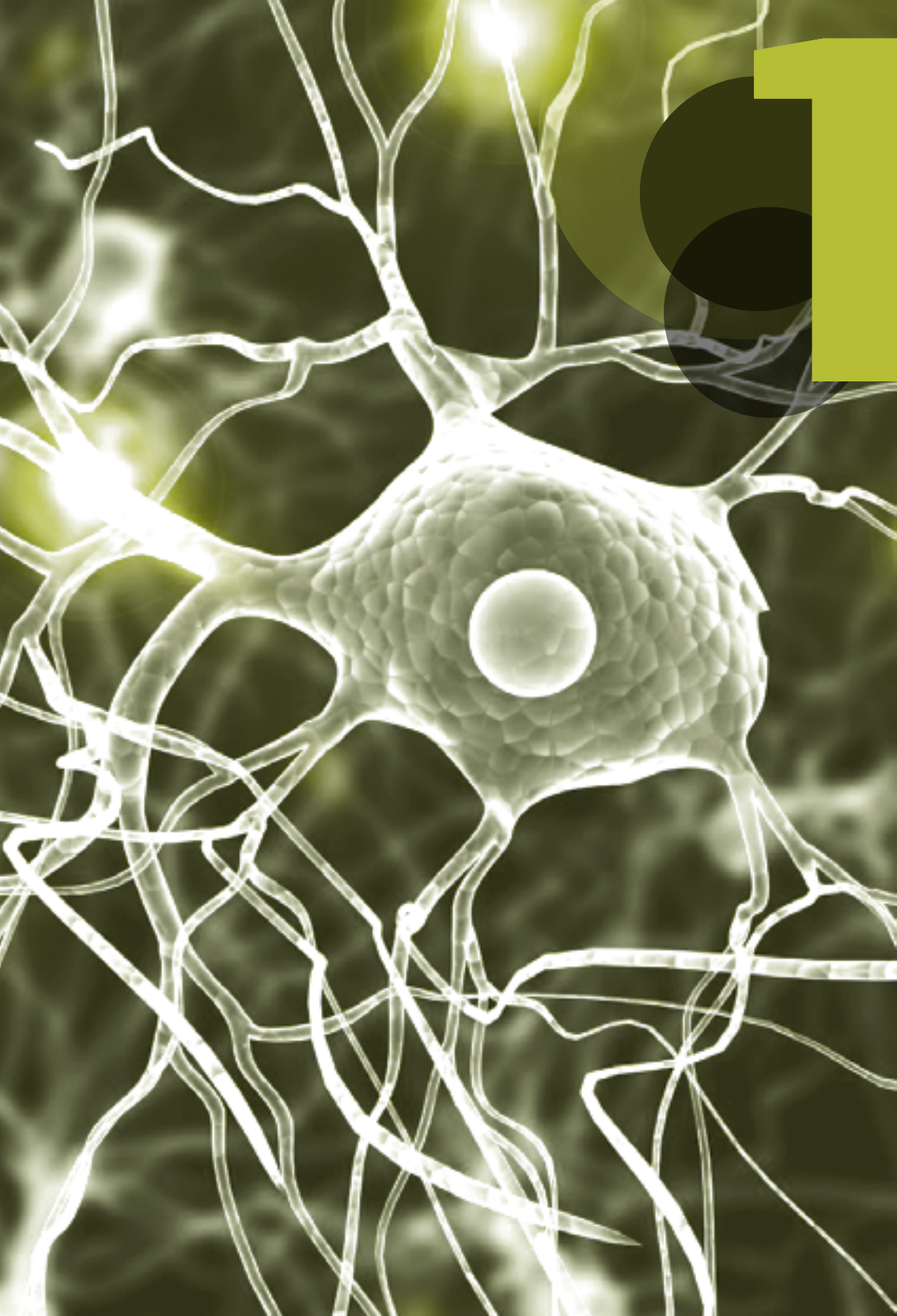
► Aplicaciones

La primera aplicación descrita en esta obra se desarrolló para el análisis de conectividad funcional mediante técnicas de imagen óptica. Posteriormente, se validaron estas herramientas en un modelo murino de epilepsia. En este primer trabajo se pusieron a prueba un par de hipótesis: la primera establece que la fc se ve afectada por la inyección de un agente epileptogénico local, mientras que la segunda menciona que existe una correlación entre cambio de fc y la duración de la crisis epiléptica (Guevara *et al.*, 2013).

La segunda aplicación trata sobre el uso de métodos de conectividad funcional para investigar cambios en un nuevo modelo murino de rigidez de la carótida. Así, se probaron otras dos hipótesis: primeramente que existe un desacoplamiento entre las medidas hemodinámicas y la actividad metabólica en las correlaciones funcionales bilaterales y, finalmente, que las redes en estado de reposo derivadas de señales hemodinámicas se ven afectadas por la calcificación unilateral de la carótida (Guevara *et al.*, 2013).

Finalmente, la tercera aplicación consistió en el empleo de la PAT en estado de reposo para evaluar el impacto de una lesión inflamatoria aguda en el cerebro neonatal de ratas. De manera similar, se sometieron a prueba otra pareja de hipótesis: la primera sugiere que los valores locales de saturación de oxígeno (SO_2) son significativamente más bajos en el grupo con la lesión, en comparación con la muestra control falso; mientras que la segunda establece que la fc bilateral disminuye de manera significativa en los cachorros con lesión cerebral inflamatoria (Guevara, Berti *et al.*, 2013).

Las aplicaciones aquí mostradas fueron posibles por los fondos NSERC proporcionados a F. Lesage. La beca No. 304501 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología al autor. También quisiera agradecer a Tri Truong Van por su asistencia en la preparación animal, N. Sadekova por su trabajo en la calcificación de la carótida. Finalmente el autor expresa su gratitud a P. Pouliot, H. Girouard, G. Lodygensky por las fructíferas discusiones.



Imagenología óptica intrínseca

Los métodos basados en la óptica, tales como la imagenología intrínseca y por granularidad han demostrado su utilidad para estudiar el funcionamiento neuronal del pequeño animal. Estas técnicas ópticas pueden distinguir diferentes tipos de hemoglobina (HbO_2 y HbR) así como también CBF, proporcionando un conjunto completo de parámetros hemodinámicos. Ambas técnicas se han aplicado con éxito para evaluar la actividad neural en la corteza expuesta del pequeño animal (Dunn *et al.*, 2003, 2005; Jones *et al.*, 2001).

DESCRIPCIÓN DE UN SISTEMA DE IMAGENOLOGÍA ÓPTICA INTRÍNSECA (OIS)

Las imágenes ópticas basadas en imagen intrínseca se capturaron con una cámara CCD de 12 bits CCD (Pantera 1M60, DS-21-01M60-12E, Teledyne Dalsa, Waterloo, ON), la cual posee un tamaño de pixel de $12\ \mu\text{m}$ y una resolución plena de 1024×1024 pixeles. El montaje utilizado en este trabajo se describe en la figura 1A del apéndice II.

Una interfaz personalizada, programada en LabView, nos permite controlar la cámara, capturar las imágenes y signos vitales, a la vez que sincroniza la adquisición de datos con la secuencia de iluminación. Una lente macro (105 mm f/2.8 max, Sigma Corp., Ronkonkoma, NY) con pequeña profundidad focal ($350\ \mu\text{m}$) se utiliza en la cámara. Se registran imágenes de reflectancia de la corteza cerebral utilizando un esquema de iluminación multiplexada en el tiempo (525, 590, 625

nm), la cual es producida por LED de 10W de potencia (LZ4-00MA00, Led Engin, San Diego, CA). La fuente de iluminación para la imagenología por contraste de granularidad es un diodo láser de 90 mW de potencia y una longitud de onda de 785 nm (L785P090, Thorlabs, Newton, NJ); la apertura de la cámara se ajustó a $f/8$, de modo tal que el tamaño del pixel y el tamaño de la granularidad fueran iguales (Briers, 2001). El ajuste de la apertura es importante para asegurarnos de muestrear adecuadamente el patrón de granularidad: el tamaño de un gránulo debe ser igual al ancho del tamaño, del punto limitado por la difracción y viene dado por $2.44 \lambda (f/\#)$, donde λ es la longitud de onda y $f/\#$ es el número-f del sistema (Dunn *et al.*, 2001). Los cuatro diodos de iluminación se encienden de manera intercalada, lo cual produce imágenes a cuadro completo a una tasa de 5 Hz. Se realiza un promediado de pixeles de 2×2 en la cámara para permitir una transmisión continua de datos al disco duro. Se debe ajustar la iluminación de modo tal que no haya partes del cerebro hipersaturadas ni hiposaturadas, en cualquiera de las longitudes de onda. El tiempo de exposición de la cámara se ajustó a 10 ms. Todo el ensamble óptico se monta en una mesa óptica con amortiguamiento activo (RS 2000, Newport, Irvine, CA) para evitar señales espurias debido a las vibraciones.

TEORÍA DE LA OIS

La absorción óptica, en el espectro visible, por parte del cerebro, tiene su origen principalmente en dos tipos de hemoglobina: HbO_2 y HbR . Al conocer sus coeficientes de extinción molar $\epsilon_i(\lambda)$, sus factores de longitud de camino diferencial $D(\lambda)$ y haciendo la suposición sobre una concentración molar de base C_i , podemos estimar los cambios locales en la concentración de la hemoglobina mediante mediciones de, al menos, dos longitudes de onda. La figura 12 muestra los coeficientes de extinción molar para ambos tipos de hemoglobina en función de la longitud de onda, junto con los perfiles espectrales de los LED utilizados en el montaje OIS.

El análisis de imágenes espectroscópicas se basa en trabajos previamente publicados (Dubeau *et al.*, 2011; Dunn *et al.*, 2003). De ma-

nera breve se describe en esta sección: se toma una serie de imágenes de reflectancia para cada longitud de onda de los LED con la cámara CCD. Esta serie de imágenes se interpreta como cambios en la atenuación (densidad óptica) $\Delta OD = \log(I_0/I)$, donde I es la intensidad de la luz reflejada e I_0 es la intensidad de luz incidente. Después se calculan los cambios relativos en oxi- y desoxihemoglobina a través de la ley de Beer-Lambert modificada (Delpy *et al.*, 1988) y una pseudo inversa de Moore-Penrose:

$$\Delta OD(\lambda, t) = \sum_i \epsilon_i(\lambda) C_i(t) D(\lambda) \quad (1.1)$$

Los valores para $D(\lambda)$ se tomaron de (Dunn *et al.*, 2005) y se extrapolaron para el rango de 560-610 nm a partir del trabajo de (Kohl *et al.*, 2000). Se hizo la suposición de que se tiene una concentración basal de hemoglobina total de 100 μM con un 60% de saturación de oxígeno (Dunn *et al.*, 2005) para el análisis espectroscópico. Dichos valores de hemoglobina se estimaron para el cerebro de la rata en su totalidad en un estudio de Mayhew *et al.* (2000). Los coeficientes de extinción molar de las hemoglobinas $\epsilon_i(\lambda)$ (ver figura 2, apéndice II) se obtuvieron del sitio web de Prahl (1999); $\epsilon_i(\lambda)$ describe la probabilidad de que un fotón interactúe con el medio (ya sea mediante absorción o esparcimiento) en función de la longitud de camino y de la concentración molar (Wang y Wu, 2007). Los valores de reflectancia se corrigieron de acuerdo a la respuesta espectral de la cámara CCD camera y se hizo la convolución con la distribución espectral de potencia de los LED empleados (Brieu *et al.*, 2010).

El cálculo de las concentraciones de hemoglobina se basó en el supuesto de que la absorción de la luz es uniforme en todo el campo de visión (FOV). Ya que la penetración de la luz, en el tejido biológico, depende de su longitud de onda, algunos colores son más sensibles a cambios de absorción en tejido más profundo. Este es un factor que no se tomó en cuenta en la ecuación (1.1). En la figura 11B se muestra un perfil de sensibilidad obtenido a partir de simulaciones Monte Carlo, válido para mediciones tomadas a $\lambda=625$ nm; los resultados de las si-

mulaciones indican que la OIS es más sensible hasta profundidades de $\sim 500 \mu\text{m}$.

CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA OIS

Se estimaron la SNR y la resolución con una máscara de microscopio negativa USAF 1951 (R3L3S1N, Thorlabs, Newton NJ), se adquirió una serie de imágenes a una sola longitud de onda ($\lambda=525 \text{ nm}$) y usando los mismos parámetros (modo de operación de la cámara, apertura, tiempo de integración, promediado y ganancia) que se emplearon en los experimentos en animales. Se consideró la SNR diferencial SNR_{diff} como métrica de calidad de imagen, la cual viene dada por la ecuación (1.2); la SNR_{diff} se obtuvo calculando a diferencia entre los valores de intensidad del objeto f_t y el fondo f_b , integrados sobre el área A del objeto; esta diferencia se dividió entonces por la desviación estándar σ_b de los valores de intensidad en un área A del fondo (Prince y Links, 2005). La SNR_{diff} así calculada fue de aproximadamente 112:1 (41 dB).

$$SNR_{diff} = \frac{A(f_t - f_b)}{\sigma_b(A)} \quad (1.2)$$

Se tomó el ancho a media altura (FWHM) del elemento más pequeño que se pudiera distinguir como medida de resolución espacial. En este caso corresponde al elemento 3 del grupo 3 (10.10 pares de líneas/mm) y el FWHM que se midió fue de $\sim 60 \mu\text{m}$, como se muestra en la figura 3 en el apéndice II, en la siguiente página.

IMAGENOLÓGIA POR CONTRASTE DE GRANULARIDAD

Además de las imágenes de cambios en la concentración de hemoglobina, podemos calcular cambios en el CBF por medio de la LSCI. La granularidad de estas imágenes tiene su origen en las interferencias aleatorias de luz coherente que ha sido esparcida múltiples veces. El campo de interferencia fluctúa debido a la presencia de partículas es-

parcadoras en movimiento, lo cual crea variaciones de intensidad, denominadas patrones de granularidad (Boas y Dunn, 2010; Dunn *et al.*, 2001, 2005). Cuando el patrón de interferencia se integra a lo largo del tiempo de exposición de la cámara, se vuelve más borroso en áreas de flujo elevado. Así, podemos obtener imágenes de flujo sanguíneo midiendo el contraste espacial de la granularidad C , el cual está definido como la razón de la desviación estándar y la intensidad promedio $\sigma/\langle I \rangle$. El contraste es una función del tiempo de exposición T de la cámara CCD y depende del tiempo de decorrelación τ_c de la granularidad, el cual se supone inversamente proporcional a la velocidad de las partículas esparcadoras (Briers, 2001; Briers y Webster, 1995).

Para alcanzar un consenso entre la resolución espacial y la estimación adecuada del contraste por granularidad se eligió una ventana deslizante de 5×5 píxeles. Bajo la suposición de que los esparcidores siguen una distribución Lorentziana, se calculó el contraste por granularidad mediante la ecuación (1.3), la cual se grafica en la figura 4.

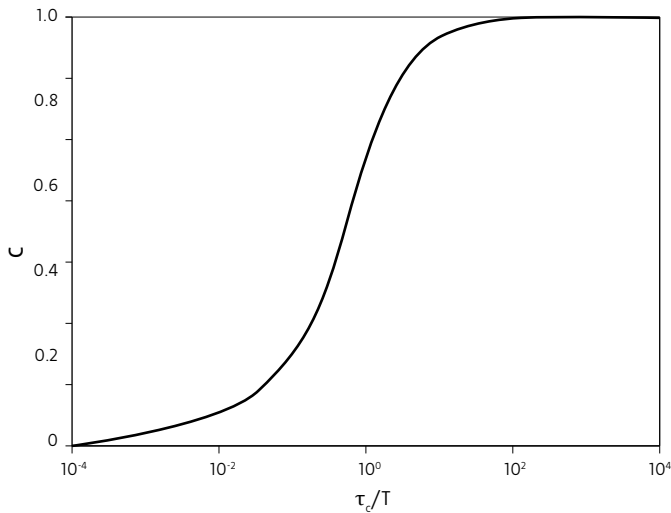


Figura 4.

Contraste por granularidad

Variación del contraste por granularidad C respecto a la razón tiempo de decorrelación a tiempo de integración τ_c/T .

$$c = \frac{\sigma}{\langle I \rangle} = \sqrt{\left(\frac{\tau_c}{2T}\right) \left(1 - e^{-\frac{2T}{\tau_c}}\right)} \quad (1.3)$$

Cuando el tiempo de integración T es mucho más grande que el de decorrelación de la granularidad τ_c , nos encontramos en el régimen asintótico (Duncan y Kirkpatrick, 2008), por consiguiente la ecuación (1.3) se puede simplificar a la expresión (1.4). A pesar de que la variación relativa de los esparcidores $\Delta \mathbb{V} / \mathbb{V}_0$, no está relacionada directamente con el CBF, la técnica de granularidad láser subestima el CBF en menos de un 5% (Luckl *et al.*, 2010), de modo tal que consideramos ambas cantidades como iguales en este trabajo. Los cambios relativos en flujo sanguíneo se obtienen a través de la siguiente fórmula:

$$-\frac{2\Delta C}{C_0} \approx \frac{\Delta v}{v_0} \approx \frac{\Delta CBF}{CBF_0} \quad (1.4)$$

Cabe notar que hay un signo negativo en la ecuación (1.4) debido a la conversión de valores de contraste por granularidad a tiempo de caída de la autocorrelación, el cual es inversamente proporcional al flujo sanguíneo (Bonner y Nossal, 1981).

CONSUMO METABÓLICO CEREBRAL DE OXÍGENO

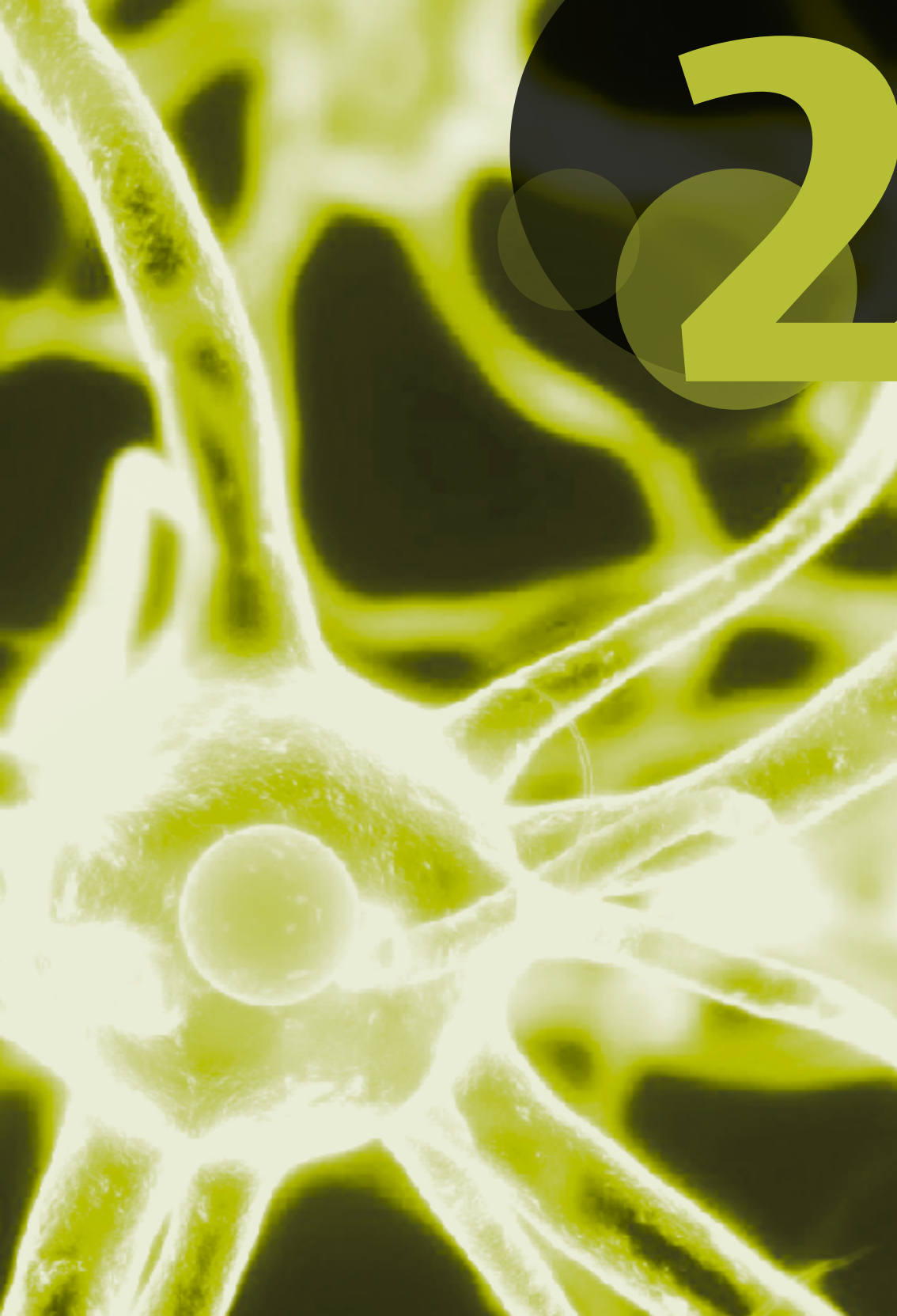
Al combinar los cambios medidos de manera experimental en CBF, hemoglobina total (HbT) y HbR en un modelo matemático de estado estable (1.5), podemos estimar los cambios en el consumo metabólico cerebral de oxígeno ($CMRO_2$) (Jones *et al.*, 2001; Mayhew *et al.*, 2000):

$$\frac{\Delta CMRO_{2,0}}{CMRO_{2,0}} = \frac{\left(1 + \frac{\Delta CBF}{CBF_0}\right) \left(1 + \gamma_R \frac{\Delta HbR}{HbR_0}\right)}{\left(1 + \gamma_T \frac{\Delta HbT}{HbT_0}\right)} - 1 \quad (1.5)$$

Las RSN se identifican a partir de una banda específica de frecuencias (0.009-0.08 Hz); estas fluctuaciones de baja frecuencia se consideran concordantes con la hipótesis central del modelo mencionado con anterioridad, la cual establece su validez mientras no haya transitorios en los componentes hemodinámicos. Las constantes γ_R y γ_T se eligieron dentro de un rango fisiológicamente plausible (0.75-1.25) (Jones *et al.*, 2001); por lo general, se consideran igual a la unidad.

CONCLUSIONES

En este capítulo he demostrado cómo la OIS, en combinación con la LSCI, nos permite obtener imágenes con diferentes contrastes: HbO_2 , HbR y CBF. Así, podemos combinar estas tres mediciones hemodinámicas en un modelo fisiológico para caracterizar a la respuesta hemodinámica a través de cambios relativos en el metabolismo. Todos estos diferentes contrastes se emplearon para identificar las redes en reposo.



2

Tomografía laminar óptica

La imagenología óptica bidimensional, como la OIS y la LSCI han resultado extremadamente útiles para cartografiar la actividad neuronal en la corteza cerebral (Dunn *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2007), no obstante, su aplicación a la médula espinal no es precisamente común (Beaumont *et al.*, 2014; Beaumont *et al.*, 2008a, 2008b; Brieu *et al.*, 2010; Brieu *et al.*, 2008; Lesage *et al.*, 2009; Sasaki *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2003) debido a múltiples dificultades, como la preparación del animal, minimización de movimientos del tórax y, sobre todo, debido a la localización profunda de las interneuronas (de 1 a 1.5 mm en la rata adulto) ya que la materia blanca envuelve a la materia gris. Todo ello sugiere la necesidad de una tecnología óptica que pueda cuantificar cambios de absorción luminosa a una profundidad de 1-2 mm, lo cual nos permitiría observar la actividad hemodinámica de la materia gris incrustada en la médula espinal, y así, de este modo, complementar la información que nos proporcionan las técnicas bien establecidas. Dicha técnica óptica tridimensional se describe en este capítulo.

La Tomografía Laminar Óptica (LOT) es una técnica recientemente desarrollada para llevar a cabo imagenología tridimensional en medios turbios, como el tejido vivo; es una modalidad sensible a cambios relativos en la absorción de la luz por parte de los cromóforos oxi- y desoxihemoglobina (Hillman *et al.*, 2004). En la LOT, la luz se inyecta de manera serial en la muestra, recorriendo la superficie del tejido a analizar con un haz de luz guiado por dos espejos galvanométricos. Esta técnica utiliza fuentes y detectores con distintas separaciones para

recolectar la luz que emerge a diferentes distancias de la posición de la fuente. Entre más alejado se encuentre el detector de la fuente, la luz recolectada ha viajado más profundamente en el tejido. Esto resulta en un conjunto de datos con una gran riqueza de información acerca de las propiedades ópticas del tejido profundo (Hillman y Burgess, 2008). La figura 22 muestra el esquemático del sistema desarrollado para este trabajo.

TEORÍA DE LA LOT

A fin de obtener imágenes completamente en 3D a partir de las mediciones de LOT uno necesita un conocimiento *a priori* de la propagación de la luz. Un modelo de la propagación de los fotones en un medio turbio, como el tejido biológico se describe por medio de la ecuación de transporte radiativo (RTE) (Arridge y Hebden, 1997),

$$\frac{1}{c} \frac{\partial I}{\partial t} + \hat{s} \cdot \nabla I(r, t, \hat{s}) + (\mu_a + \mu_s) I(r, t, \hat{s}) - \mu_s \int_{\hat{s}'} f(\hat{s}, \hat{s}') I(r, t, \hat{s}') d^2 \hat{s}' = q(r, t, \hat{s}) \quad (2.1)$$

Donde los parámetros μ_a y μ_s son respectivamente los coeficientes de absorción y esparcimiento, c denota la velocidad de la luz en el medio, I es el fulgor (también denominada intensidad específica) en la posición r en la dirección de \hat{s} . El primer término $\frac{1}{c} \frac{\partial I}{\partial t}$ representa el cambio de fulgor por elemento de ángulo sólido; el término $\hat{s} \cdot \nabla I(r, t, \hat{s})$ es una pérdida debido a divergencia, independientemente de las propiedades ópticas del medio difusor D ; el término $(\mu_a + \mu_s) I(r, t, \hat{s})$ representa la probabilidad de la extinción de fotones, ya sea mediante absorción o esparcimiento; la función $f(\hat{s}, \hat{s}')$ constituye la probabilidad de que la luz que se está propagando en la dirección de \hat{s}' se disperse hacia el elemento diferencial de ángulo sólido $d^2 \hat{s}$, en dirección de \hat{s} y el lado derecho de la ecuación (2.1) es la contribución de la fuente de luz q . A pesar de que la formulación de (2.1) ignora la polarización y considera únicamente colisiones elásticas, es más que suficiente para describir las interacciones luz-tejido que se describen en esta obra.

Las colisiones inelásticas se desprecian porque representan solo una pequeña fracción (aproximadamente 1 de cada 10 millones) de los fotones esparcidos (Le *et al.*, 2010) y las técnicas de imagenología óptica descritas en el presente libro no tienen la capacidad para distinguir entre ambos tipos de colisiones.

El sistema de LOT que se describe utiliza un haz de luz de corriente continua, potencia constante, así que se mide una respuesta independiente del tiempo y el primer término de (2.1) se anula, produciendo la forma invariante en el tiempo de la RTE:

$$\hat{s} \cdot \nabla I(r, \hat{s}) + (\mu_a + \mu_s)I(r, \hat{s}) - \mu_s \int_{S^2} f(\hat{s}, \hat{s}') I(r, \hat{s}') d^2 \hat{s}' = q(r, \hat{s}) \quad (2.2)$$

Para definir completamente nuestro problema en un dominio D limitado por la superficie ∂D , las condiciones de frontera vienen dadas por:

$$I(r, \hat{s}) = 0 \quad r \in \partial D \quad \hat{s} \cdot \hat{n}(r) < 0 \quad (2.3)$$

La convención aceptada es que $\hat{n}(r)$ es la normal saliente a la superficie de frontera ∂D . Físicamente, la ecuación (2.3) significa que no hay fotones viajando al interior de la frontera, excepto aquellos producidos por la fuente q . Cuando la fuente q es una fuente puntual difusa $q(r, \hat{s}) = \delta(r-r')\delta(\hat{s}-\hat{s}')$ sujeta a las condiciones de frontera (2.3) y la solución a (2.2) es la función de Green $G(r, \hat{s}; r', \hat{s}')$ dada por la siguiente ecuación:

$$I(r, \hat{s}) = \iint_{D \times S^2} G(r, \hat{s}; r', \hat{s}') q(r', \hat{s}') d^2 \hat{s}' d^3 r' \quad (2.4)$$

En aplicaciones neuronales de la LOT, los cambios locales de absorción que se miden reflejan la respuesta hemodinámica. Para modelar estos cambios, podemos descomponer el coeficiente de absorción

inhomogénea $\mu_a(r)$, en una parte homogénea μ_{a0} y una parte que varía espacialmente $\delta\mu_a(r)$:

$$\mu_a(r) = \mu_{a0} + \delta\mu_a(r) \quad (2.5)$$

Al sustituir (2.5) en (2.2), uno llega a:

$$\hat{s} \cdot \nabla I(r, \hat{s}) + (\mu_{a0} + \mu_a)I(r, \hat{s}) - \mu_a \int f(\hat{s}, \hat{s}') I(r, \hat{s}') d^2 \hat{s}' = q(r, \hat{s}) - \delta\mu_a I(r, \hat{s}) \quad (2.6)$$

Y de acuerdo con (2.4) la solución a (2.6) es:

$$I(r, \hat{s}) = \iint_{D\hat{S}^2} G_0(r, \hat{s}; r', \hat{s}') q(r', \hat{s}') d^2 \hat{s}' d^3 r' - \iint_{D\hat{S}^2} G_0(r, \hat{s}; r', \hat{s}') \delta\mu_a(r') I(r', \hat{s}') d^2 \hat{s}' d^3 r' \quad (2.7)$$

Donde I se expresa como la suma de I_i , el fulgor incidente, y de I_s , explicada como el fulgor esparcida; la cual se puede interpretar como la propagación de una fuente secundaria de la forma $q(r, \hat{s}) = -\delta\mu_a(r)I(r, \hat{s})$, la cual es el equivalente RTE del principio de Huygens's (Kim y Schotland, 2006). G_0 es la función de Green en un medio espacialmente homogéneo. Al sustituir $q(r, \hat{s}) = \delta(r-r')\delta(\hat{s}-\hat{s}')$ en (2.7) y usar la aproximación de Born de primer orden, obtengo:

$$G(r, \hat{s}; r', \hat{s}') = G_0(r, \hat{s}; r', \hat{s}') - \iint_{D\hat{S}^2} G_0(r, \hat{s}; r'', \hat{s}'') \delta\mu_a(r'') G_0(r'', \hat{s}''; r', \hat{s}') d^2 \hat{s}'' d^3 r'' \quad (2.8)$$

Aquí (r, \hat{s}) se puede representar como r_s , la cual es la ubicación de la fuente en la frontera con el medio; del mismo modo (r', \hat{s}') puede representarse como r_d , donde se encuentra localizado un detector; (r'', \hat{s}'') el cual se reemplaza por r , llevando a cabo la integración angular sobre \hat{S}^2 en (2.8). Finalmente, se obtiene la ecuación siguiente para cada par fuente-detector:

$$G(r_s, r_d) - G_0(r_s, r_d) = - \int_D G_0(r_s, r) \delta\mu_a(r) G_0(r, r_d) d^3 r \quad (2.9)$$

Ahora podemos reconstruir las imágenes tridimensionales del coeficiente de absorción espacialmente variable $\delta\mu_a(r)$ a partir de mediciones de $G(r_s, r_d)$ y de $G_0(r_s, r_d)$, obtenidas de los estados perturbado y no perturbado, respectivamente. A fin de completar el proceso de reconstrucción se calculan $G_0(r_s, r)$ y $G_0(r, r_d)$, las funciones de Green para fuentes y detectores, que se conocen a partir de las propiedades ópticas del medio de fondo, para finalmente invertir la forma discreta de (2.9) para así encontrar $\delta\mu_a(r)$. La forma discreta de la ecuación integral (2.9) puede expresarse de la siguiente forma:

$$\Delta M_{s,d} = A_{s,d}(r) \Delta\mu_a(r) \quad (2.10)$$

La ecuación (2.10) denota que un cambio pequeño en el coeficiente de absorción $\Delta\mu_a(r)$ resultará en un cambio en la medición $\Delta M_{s,d}$ tomada entre la fuente, en la posición s , y el detector en la posición d , que se efectúa en la superficie de la muestra (Hillman y Burgess, 2008). Estos cambios se relacionan a través de la matriz de sensibilidad espacial $A_{s,d}$ (también conocida como la función de ponderación o la función de densidad fotónica), la cual se deriva a partir de las funciones de Green fuente-detector. El cálculo práctico de las funciones de Green, derivadas de la ecuación RTE, involucra el modelado de las interacciones individuales de los fotones, gobernadas por las propiedades ópticas locales del medio de propagación; esta migración de fotones puede simularse numéricamente mediante el método Monte Carlo, debido, principalmente, a que se conocen las soluciones analíticas de Green para la RTE en geometrías relativamente simples (Kim y Schotland, 2006). Para generar las funciones de Green fuente-detector, empleamos un modelo Monte Carlo preciso (Boas *et al.*, 2002). La implementación práctica de (2.10) requiere que las mediciones se normalicen por M_0 , la cual representa la señal sin perturbar. El lado derecho de (2.10) también se debe dividir de manera similar por I_0 , que representa la señal simulada que se detectaría de la muestra cuando no hay inclusión:

$$\frac{\Delta M_{s,d}}{M_{0s,d}} = \frac{A_{s,d}(r)}{I_{0s,d}} \Delta\mu_a(r) \quad (2.11)$$

Una vez obtenido el modelo de propagación, se lleva a cabo la reconstrucción de la imagen resolviendo el sistema de ecuaciones (2.11), no obstante A , es decir, la matriz de sensibilidad obtenida a partir de las mediciones $A_{s,d}$, es una matriz no cuadrada y no se puede obtener su inversa de manera directa. Para llevar a cabo esta solución, se requiere obtener la pseudoinversa generalizada de Moore-Penrose A^\dagger , multiplicando ambos lados de la ecuación (2.2) por su transpuesta conjugada A^H y así crear una matriz cuadrada que puede invertirse:

$$\begin{aligned} A^H \Delta M &= A^H A \Delta \mu_a \\ (A^H A)^{-1} A^H \Delta M &= \Delta \mu_a \\ A^T \Delta M &= \Delta \mu_a \end{aligned} \quad (2.12)$$

El proceso de reconstrucción es un problema mal condicionado (Vogel, 2002) en el sentido de que el ruido en los datos ΔM puede dar origen a errores significativos en los coeficientes de absorción estimados μ_a . Más adelante detallo cómo se pueden usar simples técnicas de regularización para lidiar con este mal acondicionamiento. La técnica de regularización empleada se basa en la descomposición por valores singulares (SVD) truncada de la matriz de sensibilidad A , donde se considera igual a cero cualquier valor singular por debajo de un cierto valor de tolerancia. Dicho umbral de tolerancia se puede determinar de manera empírica para proporcionar imágenes con el máximo contraste. La pseudoinversa de Moore-Penrose tiene un alto costo computacional, aún así, esta técnica de regularización es factible para resolver el problema inverso en imagenología, espacialmente modulada (SMI) (Belanger *et al.*, 2010; Guevara *et al.*, 2010). Sin embargo, la LOT genera muchas más mediciones para una reconstrucción 3D, de ahí la necesidad de otra técnica de regularización que sea computacionalmente menos cara. Se aplicó el método de inversión descrito en las referencias (Hillman *et al.*, 2004; Hillman y Burgess, 2008), donde una regularización de Tikhonov se emplea para encontrar una solución a este problema subdeterminado:

$$\Delta \mu_a = A^T (A A^T + \alpha I)^{-1} \Delta M \quad (2.13)$$

Aquí α es el parámetro de regularización e I representa a la matriz identidad. Un reto común a todas las técnicas de tomografía óptica es encontrar un parámetro de regularización adecuado. Existen varios métodos que permiten seleccionar un parámetro α de modo tal que, la correspondiente solución regularizada $\Delta\mu_a$, minimice alguna métrica de la magnitud del error de la solución. Uno de estos métodos es el de la curva L; para implementarlo, uno grafica el logaritmo de la magnitud de la solución regularizada contra la norma cuadrada del residuo para un rango de valores del parámetro de regularización α . Dicha curva se ilustra en la figura 5. El criterio de selección de α consiste en seleccionar el parámetro correspondiente al punto de máxima curvatura de dicha función o, dicho de otro modo, la esquina de dicha curva (Vogel, 2002), lo cual minimiza la curva del error. Todas las reconstrucciones LOT se efectuaron mediante el mismo método de regularización de Tikhonov.

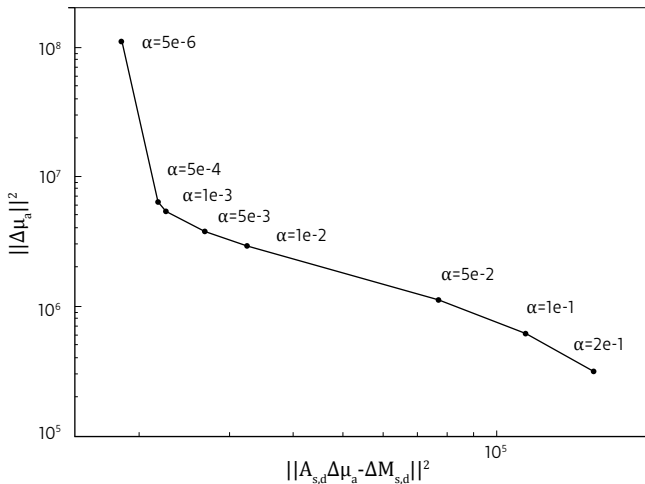


Figura 5.

Curva L

Ejemplo de análisis de la curva L para una reconstrucción LOT con SNR=60dB. El parámetro que minimiza el error corresponde al punto de máxima curvatura de la función. En este caso en particular se eligió un valor de $a=5e-4$.

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA LOT

El montaje experimental utilizado en este estudio ha sido descrito con detalle en varios artículos (Burgess *et al.*, 2007; Guevara *et al.*, 2010; Hillman *et al.*, 2007, 2004; Hillman *et al.*, 2006; Hillman y Burgess, 2008; Hillman, 2006; Ouakli *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2009), pero a continuación describiré brevemente las principales características del sistema. Se utiliza un diodo láser (HL6738, Opnext Inc.) como fuente de iluminación, su potencia nominal es de 35 mW, aunque puede diferir de la que se utiliza realmente para obtener las imágenes, ya que se ve disminuida por los componentes ópticos del montaje. El rayo láser se colima, se polariza linealmente y se manda hacia un divisor de haz (50:50, 25.4 mm de diámetro, Y43736 Edmund Optics). El haz que emerge del divisor se hace incidir en el sistema de barrido. Dicho sistema de barrido consiste de dos espejos móviles, y de la electrónica adecuada para moverlos, controlarlos y monitorearlos. Para alcanzar una tasa de imágenes elevada y un número adecuado de píxeles en las imágenes, el dispositivo de barrido debe operar a varios kHz. Un dispositivo que cumple con dichos requerimientos es el sistema de barrido resonante (SC-10 con el controlador PLD-XYG, Electro-Optical Products Corp.) el cual oscila sinusoidalmente a una frecuencia resonante fija de 1.5 kHz. El retraso resultante varía de manera sinusoidal, distorcionando así la imagen a lo largo del eje rápido. Un algoritmo fue implementado en el *software* para corregir esta no linealidad. El segundo espejo controlado por ese mismo dispositivo es un galvanómetro (6810P, Cambridge Technology, Inc.) el cual opera a 15 Hz para generar un barrido lineal con una velocidad efectiva de 7.5 imágenes por segundo. Podemos ajustar las magnitudes de los ángulos de barrido de los espejos mediante dos perillas en la caja del controlador, ajustando a su vez el FOV del sistema. El haz láser se refleja en los espejos galvanométricos y se enfoca mediante la lente de barrido ($f_{\text{barrido}}=25.4$ mm, 25.4 mm de diámetro, LB1761-B, Thorlabs, Newton NJ) en un plano focal intermedio. Este plano se proyecta directamente sobre la muestra mediante el lente de objetivo ($f_{\text{objetivo}}=50$ mm, 25.4 mm de diámetro, LB1471-B, Thorlabs, Newton NJ). La luz reflejada por el objeto de interés

es captada mediante el objetivo, pasa a través de la lente de barrido y llega al sistema de espejos galvanométricos, donde sigue el proceso inverso de barrido. Pasa entonces a través del divisor de haz, de donde se refleja hacia el plano de detección. Esta luz que regresa de la muestra se compone de la luz reflejada especularmente de la superficie de la muestra (y de los componentes ópticos) y de la luz retro-esparcida por la muestra. Se coloca entonces otro polarizador antes del arreglo de detectores para reducir el efecto de las reflexiones especulares, las cuales retienen su polarización original (Hillman *et al.*, 2006). La imagen en cuestión se produce mediante una lente de longitud focal $f_{imagen}=100$ mm (LB1676-B, Thorlabs, Newton NJ) cuyo plano focal se localiza en la lente de barrido. En este plano se coloca un arreglo de 4×8 fotodiodos avalancha (APD) (S8550, Hamamatsu Photonics K.K., Japan), el cual captura luz a diferentes posiciones radiales relativas al centro del punto de barrido, el cual se enfoca en el primer elemento. Por el momento sólo se utiliza una línea de siete elementos. El primero que se encuentra alineado con el eje óptico del sistema se dejó de utilizar para adquirir datos, porque la señal contenía rastros importantes de reflexión especular aún y con el uso de polarizadores cruzados. Las imágenes formadas equivalen a las siguientes mediciones tomográficas de reflectancia: $192 \times 80 = 15,360$ posiciones de fuente (en un FOV de $[5.5 \text{ mm}]^2$) y $192 \times 80 \times 7 = 107,520$ posiciones de detección, aunque posteriormente se submuestraron a una cuadrícula más pequeña para llevar a cabo la reconstrucción 3-D. El tamaño del punto de detección a_{det} se determina mediante el área de detección del APD y el aumento óptico del sistema m , que en nuestro caso es:

$$m = \frac{f_{imagen}}{f_{barrido}} = \frac{100\text{mm}}{25\text{mm}} = 4 \quad (2.14)$$

Por lo tanto, el área de detección a_{det} conseguida en la configuración actual se puede calcular como la razón del área efectiva de detección a_{eff} y el aumento m :

$$a_{det} = \frac{a_{eff}}{m} = \frac{2.56\text{mm}^2}{4} = 0.64\text{mm}^2 \quad (2.15)$$

El radio del punto de barrido se midió experimentalmente con un valor aproximado a 100 μm , resultando en una fuente sobre la muestra con un área de 0.0314 mm^2 . Las distancias entre los detectores y la fuente también se determinan mediante la razón de la distancia entre los elementos APD y el aumento m ; actualmente las distancias fuente-detector mínima y máxima, r_{sd_min} y r_{sd_max} , respectivamente son:

$$\begin{aligned} r_{sd_min} &= \frac{2.3\text{mm}}{4} = 0.575\text{mm}, \\ r_{sd_max} &= \frac{16.1\text{mm}}{4} = 4.025\text{mm}, \end{aligned} \quad (2.16)$$

Las señales de cada elemento APD son leídas por un canal analógico individual de la tarjeta de adquisición de datos (16 bits, 8 canales, 250kS/s por canal, PCI-6143, National Instruments, Austin TX). La adquisición de datos se sincroniza con los espejos galvanométricos a través de una interfaz gráfica personalizada desarrollada en LabView™ (National Instruments, Austin TX) figura 6 en el apéndice II.

RESULTADOS DE LA SIMULACIÓN

Para validar el proceso de reconstrucción de las imágenes LOT se fijó un marco de trabajo con una geometría fuentes-detectores idéntica al montaje experimental que se utilizó. Se ejecutó una serie de simulaciones numéricas de varios fantomas (*phantoms*) generados por computadora, cada una de ellas a diferente nivel de ruido para encontrar el parámetro óptimo de regularización que produciría la reconstrucción más precisa (en detrimento de la resolución de la imagen). Los parámetros de simulación del tejido de fondo fueron $\mu_a=0.01\text{mm}^{-1}$, $\mu_s=10\text{mm}^{-1}$ y $g=0.9$, los cuales se eligieron para emular las propiedades ópticas de la materia gris cortical (Bevilacqua *et al.*, 1999). El modelo Monte Carlo se utilizó para simular la difusión de la luz en un volumen homogéneo de $10 \times 10 \times 2.5$ mm ($64 \times 64 \times 16$ voxeles); se lanzaron 10^6 fotones, cuya propagación tomó aproximadamente una hora de procesamiento en un CPU dual Xeon E5440 2.83 GHz, con 32 GB of RAM.

La figura 7 en el apéndice II presenta los resultados de la simulación de una reconstrucción tomográfica de un fantoma numérico simple, el cual consiste de una varilla absorbente de 150 μm de diámetro inmersa en un medio homogéneo turbio; este fantoma simple se usó para encontrar la función de dispersión de línea (LSF) del sistema. Podemos observar que se presenta un ensanchamiento y degradación de la reconstrucción tomográfica a medida que la SNR disminuye conforme se aumente la profundidad de la inclusión. La anchura a media altura (FWHM) se eligió como un criterio para obtener un estimado conservador de la resolución óptica. El panel C de la figura 7 ilustra el efecto de la profundidad del objeto de interés en la reconstrucción; las secciones transversales normalizadas del objeto línea son más anchos y con menor amplitud a medida que el objeto de interés se encuentra a mayor profundidad.

Otro criterio a considerar es la razón contraste a ruido (CNR), donde se define el contraste como el $\Delta\mu_a$ pico del volumen reconstruido, mientras que el ruido se define como la distribución de voxeles $\langle\Delta\mu_a^2\rangle^{1/2}$ (Culver *et al.*, 2003). Esta métrica también se consideró para evaluar la calidad del volumen reconstruido en la fase experimental. El efecto del ruido es más importante cuando el objeto de interés se encuentra a una profundidad no mayor a 1 mm. Después de esta profundidad las reconstrucciones produjeron un CNR similar independientemente de la SNR, lo cual demuestra el efecto adverso de la profundidad en la calidad de la reconstrucción. La figura 7b muestra que la CNR disminuye con la profundidad, mientras que el FWHM se incrementa con la profundidad, como se ilustra en la figura 7d. La resolución medida experimentalmente se encontró en el rango de 0.5 a 1mm, dependiendo de la profundidad del objeto de interés.

También se simuló un fantoma numérico más complejo en medio turbio y a diferentes profundidades. La figura 8 de la siguiente página muestra la simulación de dicho fantoma complejo localizado a 1 mm de profundidad. Para generar mediciones realistas, se añadió un nivel de ruido de 1% a las simulaciones Monte Carlo, dicho nivel de ruido corresponde al medido experimentalmente (SNR=40dB). Para evitar problemas como el llamado «crimen inverso», la matriz de sensibilidad

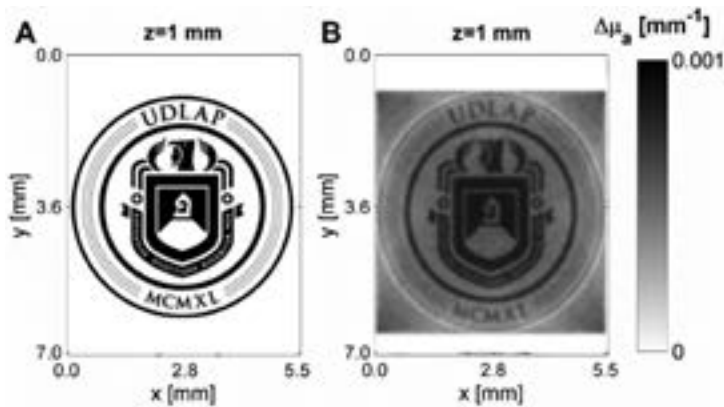


Figura 8.

Resultados de la simulación

Secciones representativas del volumen a 1 mm de profundidad (A) Fantoma numérico complejo con 100% de contraste, (B) Su reconstrucción a partir de datos simulados.

del problema inverso se generó a partir de simulaciones Monte Carlo a una resolución espacial diferente a la que se utilizó en el problema directo. Enseguida se empleó un esquema de regularización Tikhonov, cuyo parámetro α se seleccionó mediante la técnica de la curva-L. Los resultados de esta simulación se presentan en la figura 8.

Este marco operativo de simulación con geometría fuente-detector idéntica al montaje experimental nos permitió validar el proceso de reconstrucción LOT.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

En esta subsección se presentan los resultados LOT, tanto para los experimentos con fantasmas, como la prueba de concepto *in vivo*, donde se tomaron imágenes tridimensionales de la médula espinal de una rata de tipo silvestre.

► Imágenes del fantoma

Para validar las capacidades del sistema LOT es importante caracterizar las imágenes reconstruidas obtenidas a diferentes profundidades. Nuestro objeto de interés consistió en la colocación de un alambre fuertemente absorbente (150 μm de diámetro) a diferentes profundidades en una solución de intralípido con tinta china ($\mu_a=0.1 \text{ mm}^{-1}$, $\mu_s=10 \text{ mm}^{-1}$ at 680 nm) cuyas propiedades ópticas se asemejan a las de la materia gris (Yaroslavsky *et al.*, 2002). El FOV se eligió del mismo tamaño que el del campo de visión simulado (5.5 \times 7 mm). La figura 9A en el apéndice II muestra las funciones de sensibilidad para diferentes separaciones fuente-detector en la columna de la izquierda y las medidas obtenidas con el alambre situado a diferentes profundidades; el panel B de la misma figura 9 muestra una sección representativa de la reconstrucción tomográfica a 1 mm de profundidad. El alambre absorbente aparece en la imagen cuando la fuente está colocada sobre él, mientras que la sombra aparece cuando el detector se coloca por encima de éste. La distancia entre el alambre y su sombra indica la distancia fuente-detector. El objeto de interés se reconstruyó con éxito hasta 1.5 mm de profundidad, fijando así el límite para las reconstrucciones *in vivo* posteriores.

► Imágenes *in vivo*

En este trabajo de prueba de concepto se emplearon dos animales para probar la imagenología LOT en la médula espinal (Ouakli *et al.*, 2010). Los animales se anestesiaron con isoflurano (5 %), y se mantuvo su temperatura corporal a 37°C con una almohadilla calefactora controlada a lazo cerrado. Tanto el ritmo cardíaco, como el nivel de CO₂ expirado se monitorearon. Además del isoflurano, antes de la cirugía, se aplicó un bolo de 50 mg/kg de alfa-cloralosa (Bonvento *et al.*, 1994). Una traqueotomía se llevó a cabo y se ventilaron artificialmente con aire ambiente. El ritmo respiratorio se mantuvo entre 60 y 80 ciclos/min, con aproximadamente 2-ml de volumen corriente y una concentración expirada de CO₂ igual a 3%. Las ratas se colocaron en un aparato este-

reotáctico personalizado para inmovilizar la médula espinal y minimizar los artefactos de movimiento debido a la respiración y a la estimulación eléctrica de pata trasera. Los segmentos lumbares de la médula comprendidos entre el área torácica (T10) y la sacra (S1) se expusieron mediante laminectomía y se cubrieron con aceite mineral para evitar que se secase la médula. Se dejó de administrar isoflurano después de la cirugía para pasar a la inyección continua de alfa-cloralosa a una velocidad de 40 mg/kg/h. Se esperó treinta minutos para permitir la estabilización del animal. Transcurrido ese tiempo, se fijó firmemente la espina dorsal por medio de dos pares de pinzas para impedir cualquier movimiento longitudinal de la médula inducido por la respiración. El cráneo se adelgazó a un espesor de aproximadamente 100 μm en la región somatosensorial y se removió la sangre con un hisopo de algodón humedecido en solución salina. Finalmente se cubrió el cráneo con aceite mineral para llevar a cabo la toma simultánea de imágenes de la corteza cerebral en conjunto con la médula espinal.

La adquisición de datos se efectuó en sesiones de 40 minutos. Cada bloque de estimulación duró un segundo, con un intervalo inter-estímulo aleatorizado de, al menos, 20 segundos. Las mediciones adquiridas se promediaron por bloques para disminuir el ruido de carácter aleatorio. Los estímulos consistieron en enviar pulsos de corriente de 3-ms a una tasa de repetición de 3 Hz. El umbral de movimiento muscular determina las tres diferentes intensidades de estimulación (0.9 \times , 1.2 \times y 1.5 \times), las cuales se intercalaron. El protocolo de imagenología consistió entonces de grabaciones LOT de la médula espinal de manera simultánea a la OIS del cerebro.

Los pares fuente-detector se alinearon de manera paralela al eje rostro-caudal (figura 10B en el apéndice II), cubriendo un FOV de 2.5 \times 7.5 mm en el área lumbar (segmentos L3 - L5). El recorrido temporal promediado a bloques de la región de interés (ROI) ipsilateral a la estimulación (figura 10A) muestra mayor amplitud respecto a la ROI contralateral (figura 10C); aquí indicamos los estímulos con líneas verticales azules. Asimismo, la activación contralateral muestra mayor varianza, desplegada como sombras grises alrededor del valor medio, en línea negra. La amplitud de la activación resultó proporcional a la

intensidad de la estimulación en ambos lados de la médula espinal. Observamos que la sangre se drena a través de la vena dorsal aproximadamente un segundo después del pico de activación ipsolateral, como se muestra en la parte inferior de la figura 10B en el apéndice II.

También se investigó la factibilidad del uso concurrente de la OIS. La figura 11 en el apéndice II representa imágenes simultáneas de la corteza cerebral y de la médula espinal. El comportamiento previamente descrito por las gráficas de la figura 10 puede localizarse de manera espacial en la médula. En el panel A, se observa una disminución ligera inicialmente localizada en la vena dorsal a aproximadamente ~ 3.6 s del estímulo, es entonces que se incrementa la activación en el lado izquierdo de la médula espinal a los ~ 7.20 s, enseguida la sangre es drenada por medio de la vena dorsal a ~ 10.8 s. A diferencia de lo que ocurre en la médula espinal, donde la respuesta hemodinámica es ipsolateral al estímulo, la respuesta en la corteza somatosensorial fue contralateral, como se muestra en la figura 11B e, confirmando nuestras hipótesis. Cabe destacar un parche de lo que aparenta ser una activación ipsolateral en el hemisferio cerebral izquierdo; esto se puede explicar por el hecho de haber aplicado un umbral arbitrario al mapa funcional de activación y por el no haber corregido los falsos positivos.

Los datos LOT para cada par fuente-detector se integraron entre 4.5 y 9 s, posestimulación (a $0.9 \times$ el umbral muscular) para generar mediciones a ser utilizadas en el problema inverso en el pico de activación.

Se emplearon simulaciones Monte Carlo (Boas *et al.*, 2002) para modelar la propagación de la luz en la espina dorsal utilizando información anatómica obtenida de un atlas (figura 12B en el apéndice II). Se generó una matriz de sensibilidad para relacionar los cambios en absorción a los datos medidos experimentalmente usando la primera aproximación de Born (Kim y Schotland, 2006). Al resolver el problema inverso se logró recuperar un mapa 3D de la actividad neural evocada; debido al ruido presente en las mediciones se usó la regularización de Tikhonov, escogiendo el valor óptimo para el parámetro de regularización, el cual se encontró en las reconstrucciones previas de fantasmas líquidos.

Los resultados de las reconstrucciones se muestran en los paneles A y C de la figura 12 en el apéndice II. La señal de la mitad dorsal de la médula en $z=0.4$ mm es representativa de la activación interneuronal (Willis y Coggeshall, 1991), y está de acuerdo a las expectativas anatómicas para las aferentes del nervio ciático. En la parte profunda de la materia gris la señal es mucho más difusa y se observa activación contralateral, que puede tener su origen en las conexiones de las interneuronas.

La prueba de concepto aquí presentada consiste en el uso concurrente de la LOT y la OIS para tomar imágenes de la médula espinal y de la corteza cerebral respectivamente. Este montaje multimodal puede allanar el camino para investigar la plasticidad cortical después de una lesión medular (SCI) y como se adapta el cerebro a esta reorganización. No obstante, las limitaciones de alcance en profundidad y la pobre repetibilidad de los resultados debido a una SNR débil siguen siendo un problema. Otra limitante de la LOT es que el proceso de reconstrucción involucra el uso de un modelo anatómico de la médula para la propagación de fotones. A pesar de que las dimensiones de la médula espinal son bastante similares entre miembros de una misma especie a una cierta edad, el procedimiento no es óptimo para generalizar resultados. El modelo directo general tendría que producirse de una imagen anatómica MRI de cada sujeto, lo cual es caro; o considerar la alternativa de analizar la histología, lo cual consume mucho tiempo.

Para cuantificar el efecto de los errores en el supuesto anatómico, se construyeron varios modelos en los cuales la materia gris se desplazó $\pm 20\%$, tanto de manera horizontal, como de modo vertical, tal como se muestra en la figura 13 en el apéndice II. Se eligió la métrica L_2 para cuantificar los errores en la reconstrucción. A pesar de ser relativamente pequeños los errores ($\pm 20\%$) en la anatomía, se produjeron errores considerables en la reconstrucción: ~ 80 - 100% mayores, que usando el modelo anatómicamente correcto. Estos resultados sugieren que la regularización de Tikhonov ajustada por la curva-L es altamente sensible al modelo *a priori* usado para la propagación de fotones y en futuros trabajos se deberían investigar técnicas más robustas como el análisis Bayesiano (Abdelnour *et al.*, 2010).

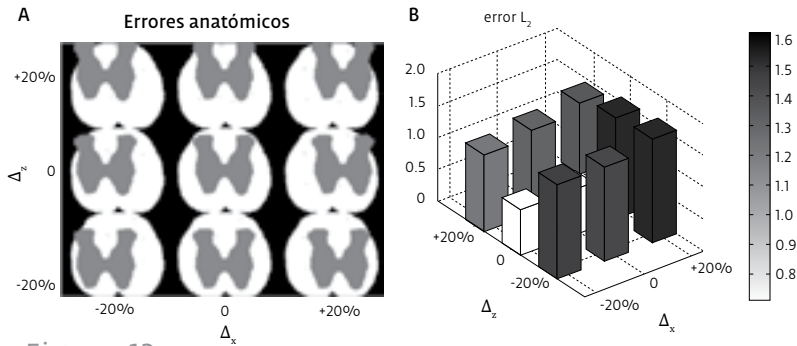


Figura 13.

Errores anatómicos

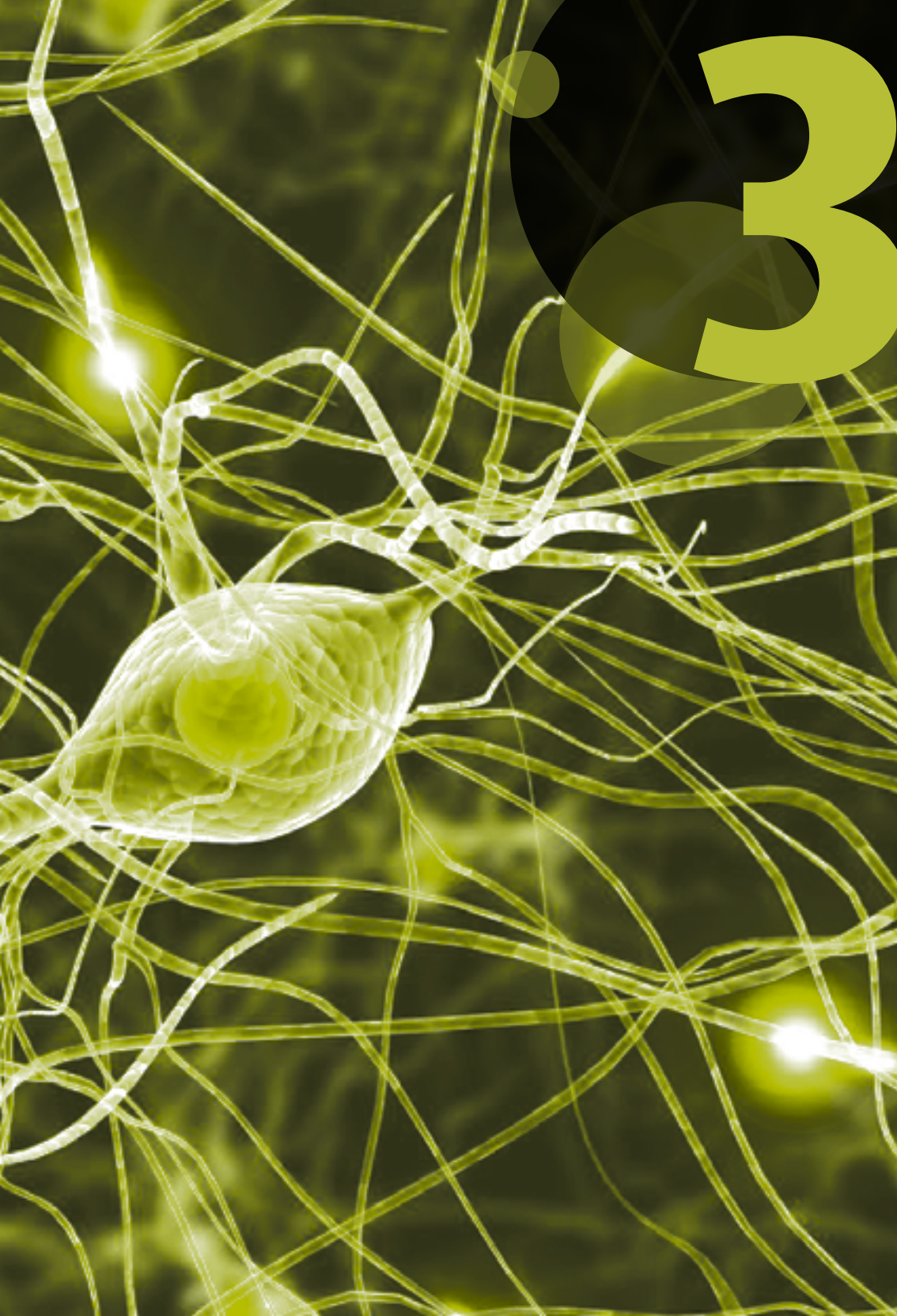
(A) Modelos para la propagación de la luz donde se colocó la materia gris en diferentes lugares. (B) Error de reconstrucción L_2 producidos por dichos errores en la anatomía.

CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que la LOT puede cartografiar la respuesta hemodinámica en tres dimensiones, son una sensibilidad hasta 1.5 mm de profundidad en la médula espinal de la rata; sin embargo la SNR del sistema no permitió tomar imágenes de las respuestas hemodinámicas de todos los especímenes de manera repetible.

En mi opinión esto puede remediarse con un rediseño del montaje óptico, colocando un objetivo de baja amplificación con una apertura numérica (NA) mayor y actualizando el resto de la óptica a piezas de 2" para capturar más fotones retroesparcidos. Otro aspecto a mejorar es la resolución del problema inverso; se podrían aplicar técnicas más robustas como la reconstrucción Bayesiana en vez de la regularización de Tikhonov, la cual es muy sensible a errores en los supuestos anatómicos usados como medio de propagación en el problema directo.

Nuestra meta inicial consistía en observar la respuesta hemodinámica a profundidad en la médula espinal y el cerebro. A pesar de alcanzar un éxito moderado, la técnica es mal condicionada y poco apta para develar las redes en estado de reposo. Por lo tanto, nuestros esfuerzos se encaminaron a técnicas alternativas, mejor adaptadas al estudio de la conectividad funcional en estado de reposo.



3

Tomografía por coherencia óptica

La tomografía por coherencia óptica (OCT) se aplicó en la caracterización de los efectos de un nuevo modelo de rigidez arterial (Sadekova *et al.*, 2013) en el cerebro del ratón; de manera más específica, se usó la OCT para medir la pulsatilidad del flujo sanguíneo en las arterias pertenecientes a diferentes áreas del cerebro del ratón. Los datos adquiridos con la OCT sirven como preludeo a nuestros estudios en estado de reposo, así las cosas, describo a continuación dicha técnica de imagenología. Este capítulo cubre los aspectos técnicos referentes al diseño óptico, mecánico y electrónico del aparato OCT. La figura 17 en el apéndice II ofrece una representación esquematizada de los diferentes componentes del sistema.

La OCT es una técnica de imagen biomédica relativamente reciente. Puede decirse que llena el vacío entre la microscopía confocal (CM) y el ultrasonido (US) de alta resolución en términos de resolución y de profundidad de penetración (figura 14A en el apéndice II). El US clínico estándar puede tomar imágenes profundas con limitada resolución. Al usar frecuencias más altas se puede obtener una resolución más fina, aunque se incrementa la atenuación de ondas ultrasónicas, limitando así la profundidad de penetración. La resolución axial de la OCT fluctúa entre 1-15 μm y se encuentra determinada por las propiedades de la fuente de luz. La resolución lateral se determina por el objetivo empleado para tomar imágenes de la muestra. En la mayoría de los tejidos biológicos, la profundidad de penetración se ve limitada a 2-3 mm debido al esparcimiento óptico. La CM posee mejor resolución ($<1 \mu\text{m}$), pero la profundidad de penetración se ve limitada a unos cuan-

tos cientos de micrómetros en la mayoría de los tejidos, nuevamente debido al esparcimiento.

La OCT se basa en una técnica de retroesparcimiento desarrollada durante la década de 1980 en el campo de las telecomunicaciones, denominada reflectometría óptica en el dominio de la frecuencia (OFDR), la cual se usaba para detectar fallas en las fibras ópticas (Ghafoori-Shiraz y Okoshi, 1985, 1986). Al mandar un pulso de luz en la fibra se detecta su retorno si hay una falla que provoca esta reflexión.

El concepto de medición óptica de distancia se aplicó por primera vez al tejido biológico en 1991 por el grupo de James Fujimoto en el Massachusetts Institute of Technology, quienes tomaron imágenes *in vitro* de la retina humana y de la arteria coronaria (Huang *et al.*, 1991). La OCT se lleva a cabo dirigiendo un rayo óptico al objeto de interés y midiendo los ecos retrasados de la luz retroesparcida. A diferencia del US, estos ecos no pueden medirse directamente ya que la velocidad de la luz es extremadamente alta (figura 14B en el apéndice II), por lo que deben usarse técnicas interferométricas.

La primera aplicación de la OCT fue la oftalmología y sigue siendo, a la fecha, el área más importante de uso clínico de la OCT (Fujimoto *et al.*, 2000). A finales de los años noventa la OCT se adaptó a un endoscopio, y se le denominó «biopsia óptica» utilizándose para visualizar tejido en un animal viviente (Tearney *et al.*, 1997).

En los primeros años del nuevo milenio hubo un cambio paradigmático en la forma de efectuar OCT, se cambió de un sistema de detección en el dominio del tiempo (TD-OCT) a uno en el dominio de la frecuencia (FD-OCT), resultando en mejoras de la SNR y la velocidad de barrido (Leitgeb *et al.*, 2000). La primera mención del método se hizo en 1995 por Fercher *et al.* (1995) y los primeros tomogramas *in vivo* se presentaron en 2002 (Wojtkowski *et al.*, 2002).

TEORÍA DE LA OCT

En el montaje básico de OCT mostrado en la figura 15 en el apéndice II, la señal detectada corresponde a la transformada de Fourier del perfil de reflectancia de la muestra en profundidad. La salida de la fuente se divide en el brazo de referencia, que ilumina un espejo estático y el brazo de la muestra que ilumina la muestra y recibe la luz que refleja dicho espécimen. En esta modalidad se registran medidas de reflectancia del tejido a diferentes profundidades de manera simultánea.

La luz reflejada de la muestra interfiere con la luz que regresa del espejo, pero sólo puede ocurrir interferencia cuando los caminos ópticos de ambos brazos son prácticamente idénticos, dentro de la longitud de coherencia de la fuente. La corriente captada por el detector se define en la ecuación (3.1):

$$i_{\text{det}}(t) = \frac{\eta q}{h\nu} \left(P_r + P_o \int r^2(z) dz + 2\sqrt{P_r P_o} \int r(z) \Gamma(z) \cos(2k(t)z + \phi(z)) dz \right) \quad (3.1)$$

Donde η es la sensibilidad del fotodetector, q es la carga elemental y $h\nu$ es la energía de un fotón. El primer término P_r es la potencia óptica reflejada del brazo de referencia. El segundo término depende de la potencia óptica que ilumina la muestra P_o . $\Gamma(z)$ representa a la función de coherencia instantánea del láser y $k(t)$ es el número de onda, el cual es linealmente barrido por la fuente láser. El tercer término representa la señal interferométrica, la cual se relaciona con el perfil de reflexión de la muestra a través de la transformada de Fourier. En práctica, la señal se digitaliza y se lleva a cabo una transformada rápida de Fourier (FFT) para obtener un barrido axial, llamado línea-A (figura 16A en el apéndice II). Se pueden obtener imágenes transversales, haciendo una serie de líneas-A para generar un conjunto de datos bidimensional (barrido-B), el cual se despliega en escala de grises o como imagen de falso color (figura 16B en el apéndice II). Para generar conjuntos de datos en tres dimensiones (3D-OCT) se hace una serie de barridos-B a lo largo de la dimensión transversal (figura 16C en el apéndice II).

DISEÑO DE UN SISTEMA OCT

El montaje OCT se basa en un interferómetro de Michelson con componentes adicionales para efectuar un barrido y adquisición de datos rápidamente. La primera etapa del diseño consiste en elegir los componentes ópticos y electrónicos para crear y detectar un patrón de interferencia y para efectuar el barrido del láser sobre la muestra. Al elegir adecuadamente los componentes optomecánicos se asegura la estabilidad del montaje y se facilita el ajuste rápido y preciso de las partes ópticas. El sistema OCT se representa en la figura 17 en el apéndice II.

El sistema OCT descrito en esta sección usa una fuente de barrido láser (Axsun, 1310 Swept Source Engine) con una longitud de onda central $\lambda_0=1310$ nm y ancho de banda $\Delta\lambda=100$ nm (figura 18A en el apéndice II). Se midió una potencia promedio de salida del láser de ~ 18 mW. Al tener una intensidad lumínica, distribuida en su ancho de banda y repartida en picos de alta potencia en cada longitud de onda discreta, nos permite tener una mayor sensibilidad con bajo riesgo de daño óptico (Liu y Brezinski, 2007), mientras que la tasa de barrido de 50 kHz permite obtener imágenes en tiempo real. El corazón del sistema es un interferómetro de tipo Michelson construido con dos acopladores de fibra óptica y dos circuladores. La luz que llega de la fuente de barrido pasa por un acoplador de fibra 90/10 de banda ancha (Thorlabs, FC1310-70-10-APC). La porción de 90% llega a un circulador (Thorlabs, CIR-1310-50-APC) que manda la luz al brazo de muestra y colecta la luz retroesparcida de la muestras. La porción de 10% se pasa a otro circulador que manda y colecta luz del brazo de referencia. La luz retroesparcida, tanto de la muestra, como del brazo de referencia, se recombina en el acoplador de fibra óptica 50/50 (Thorlabs, FC1310-70-50-APC), produciendo así el patrón de interferencia que va hacia las entradas del fotodetector balanceado (Thorlabs, PDB120C). El controlador de polarización (Thorlabs, PLC-900) se emplea para optimizar el contraste del patrón de interferencia.

Todas las fibras usadas son monomodo, con revestimiento de 125 μm y terminaciones con conectores FC/APC (ángulo de 8° de con-

tacto físico) los cuales minimizan las retroreflexiones en el sistema de fibras.

► Brazo de muestra

El brazo de muestra efectúa el barrido del haz láser sobre la superficie del tejido vivo, para obtener secciones transversales o imágenes completamente volumétricas de la muestra bajo escrutinio. La figura 18B en el apéndice II despliega el esquemático del brazo de muestra. Para propagar el haz de la fibra óptica, se acopla un colimador (Thorlabs, F280APC-C) al conector FC/APC, para generar un haz colimado de ~ 3.27 mm de diámetro. Para tener una guía visual del FOV se hace uso de un láser apuntador (Thorlabs, LP660-SF40), incorporado al brazo de muestra. Se logró colimar el láser apuntador con una lente plano-convexa sin recubrimiento (Thorlabs, LA1951). El alineado preciso de dicho láser se consiguió gracias a un espejo con recubrimiento de plata (Thorlabs, PF10-03-P01) colocado en una montura cinemática. Tanto el láser de imagen, como el apuntador, se acoplan con un espejo dicróico pasa-cortas (Thorlabs, DMSP1000, 50% a $\lambda=1000$ nm) donde se centran y alinean con el eje óptico. Entonces se dirigen ambos a un par de espejos galvanométricos (Thorlabs, GVSM002/M) montados en una jaula de 1" (GCM002/M). Después del sistema de galvos se encuentra un telescopio unitario o relé óptico, el cual consiste en dos lentes idénticas colocadas en un arreglo afocal (de foco infinito) (Thorlabs, LA1131-C, $f_1 = f_2 = 50$ mm, $1050 < \lambda < 1620$ nm). Este relé óptico se usa para conjugar el punto pivote de los espejos a una distancia de ~ 18.9 mm de la placa de montaje de la lente telecéntrica de barrido (Thorlabs, LSM04). Este lente representa una gran ventaja en nuestra aplicación ya que permite tener una imagen plana cuando se hace el barrido de la muestra. Además, el tamaño del haz es uniforme a lo largo y ancho del FOV en su totalidad, lo que mantiene constante la resolución lateral. En el camino de regreso la luz retroesparcida por el espécimen es recolectada por la lente telecéntrica mencionada, después pasa por el telescopio unitario, y se refleja nuevamente en los espejos oscilantes para enviarse al colimador. Todas las lentes y colimadores están fa-

bricados de vidrio óptico común N-BK7 y poseen un recubrimiento en ambos lados que minimiza la reflexión en el rango de 1050 - 1620 nm.

► Brazo de referencia

El brazo de referencia (figura 18C en el apéndice II) es el equivalente óptico del brazo de muestra: tiene la misma longitud de camino óptico y cantidad de dispersión inducida por el vidrio. Además permite regular la intensidad de la señal con un filtro de densidad neutra (NDF) ajustable (Thorlabs, NDC-50C-2M), de 0 a 2 densidades ópticas (OD), es decir, niveles de transmisión de 10^0 a 10^{-2} . Dado que se trata de un filtro reflectivo, hay que tener especial cuidado en evitar que la luz reflejada ingrese, de nuevo, al colimador de fibra, de modo que el NDF se coloca ligeramente inclinado, respecto al eje óptico, para prevenir esos patrones de interferencia espurios en nuestra señal OCT. Primeramente, la longitud de camino óptico debe igualarse a la del brazo de muestra. Esta distancia debe tener un ajuste grueso para obtener un patrón de interferencia, deslizando el espejo con recubrimiento de plata (Thorlabs, PF10-03-P01) en una guía cola de milano. Una vez que se realiza el ajuste grueso, debe existir un ajuste fino para colocar la muestra a la profundidad adecuada. Este ajuste fino se consigue por medio de un montaje micrométrico acoplado a la guía cola de milano. En seguida, debido al gran ancho de banda de la fuente de barrido, las diferentes longitudes de onda viajarán a diferentes velocidades cuando se propagan por medios de dispersión, como el vidrio en las fibras y en las lentes. Existe una diferencia de dispersión entre los brazos interferométricos que afectaría la resolución axial del sistema. Por lo tanto, es necesario balancear esta diferencia de dispersión entre el brazo de muestra y el de referencia para alcanzar la resolución óptima. En el brazo de referencia coloqué la misma cantidad de vidrio que existe en el brazo de muestra. La cantidad de vidrio contenida en el objetivo telecéntrico se compensa fácilmente mediante un bloque de compensación de dispersión (Thorlabs, LSMo4DC) y el vidrio del relé óptico se compensa a través de un par de prismas (Thorlabs, PS9o8L-C), acopla-

das con aceite del mismo índice de refracción que el vidrio BK7 (Cargille, BK-7 Matching Liquid 11510).

PROGRAMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS

La señal del fotodetector balanceado se digitaliza mediante la tarjeta de conversión analógica digital (ADC) (Altera, Data Conversion HSMC Daughter Board). Brevemente, los valores del ADC se guardan en la memoria externa del FPGA (Terasic, DE4 board), entonces cuando se llena la memoria intermedia, se envían los datos a la computadora vía TCP/IP para la reconstrucción de imagen y almacenamiento en disco. El control de los espejos galvanométricos oscilantes y las señales de sincronía se manejan mediante otra tarjeta de adquisición (National Instruments, USB-6351). La transferencia de datos se midió en ~ 110 Mbps, lo cual no es suficiente para generar imágenes en tiempo real, las cuales necesitan una velocidad de transferencia de 878 Mbps (~ 20 Mb por línea-A a una tasa de 45 KHz).

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA

En esta sección presento la caracterización del sistema descrito con anterioridad. Ya que es un sistema con múltiples aplicaciones en potencia, su plena caracterización es importante. Por consiguiente, se requieren mediciones cuantitativas para evaluar el desempeño de nuestro sistema de imagenología óptica.

► Resolución

El esparcimiento múltiple afecta las imágenes OCT de manera adversa. La razón de esparcimientos múltiples contra esparcimientos únicos se incrementa en función de la profundidad. Este incremento en los esparcimientos múltiples resulta en un ensanchamiento de la PSF del sistema, dicho de otro modo, una disminución de la resolución axial como resultado de incrementar la profundidad de las imágenes. En la OCT las resoluciones axial y lateral son independientes entre sí. La

resolución axial depende de la longitud de coherencia de la fuente, mientras que la resolución lateral está determinada por las condiciones de enfoque: la óptica y el paso lateral de barrido.

Resolución axial

La resolución axial viene determinada por las características de la luz coherente empleada como fuente (Lexer *et al.*, 1997). De manera más específica la longitud de coherencia, definida como el ancho espacial Δz del campo de autocorrelación producido por el interferómetro, el cual viene dado por:

$$\Delta z = \frac{2 \ln 2 \lambda_0^2}{\pi \Delta \lambda} \quad (3.2)$$

Su valor teórico es $\Delta z = 7.33 \mu\text{m}$, sin embargo, la PSF medida fue de $\sim 17 \mu\text{m}$. La discrepancia se debe principalmente a dos razones: primera, el uso de una ventana Hanning para calcular la FFT de un reflector único (un espejo en este caso) ensancha el FWHM, segunda y más importante, los datos se adquirieron a una frecuencia de muestreo fija debido a limitaciones del equipo electrónico, y después se interpolaron al espacio k , lo cual deviene en una resolución degradada. Esto se puede remediar usando el reloj- k de la fuente láser como temporizador externo de muestreo en una tarjeta de adquisición de datos adecuada. Este problema se confirmó al medir la PSF con un digitalizador *PCI Express* de 12 bits a 500 MS/s (ATS9350, Alazar Technologies Inc., Canadá), capaz de usar un reloj externo de muestreo; su FWHM resultó de $\sim 13 \mu\text{m}$.

Compensación de dispersión

Para alcanzar la resolución óptima se necesita igualar la dispersión óptica entre ambos brazos del interferómetro, lo cual se consigue parcialmente colocando prismas de vidrio en el brazo de referencia, como se describe en la sección Brazo de referencia. En la etapa de procesamiento se aplica un algoritmo de compensación de dispersión de segundo y tercer orden de acuerdo con el procedimiento detallado en (Wojtkowski *et al.*, 2004). Se efectúa esta compensación para mini-

mizar el desbalance en los brazos del interferómetro. El criterio de optimización se eligió de modo tal que se incremente el contraste de la imagen maximizando una métrica de calidad de imagen, en este caso la PSF axial del sistema (definida como el FWHM de un reflector único). A continuación se muestran las PSF a diferentes profundidades antes (figura 19A en el apéndice II) y después (figura 19B en el apéndice II) de implementar el algoritmo de compensación de dispersión. Nótese en la figura 19C en el apéndice II cómo el algoritmo mejora la calidad de imagen para todas las profundidades, aunque hay un deterioro en la calidad de imagen con el incremento de la profundidad.

Resolución lateral

La profundidad de foco define el rango en el cual se mantiene la resolución lateral. Tienen que hacerse concesiones al momento de elegir el diámetro focal y la zona focal del haz luminoso, entre más pequeño sea el diámetro del haz, más corta es la zona focal. Una lente con alta NA se usa sólo en barrido-C (*en face* o frontal), no obstante, en aplicaciones sensibles a la profundidad, es deseable un FOV amplio (14×14 mm). Por lo tanto, se utiliza una lente telecéntrica con una débil NA=0.09. La resolución lateral teórica (dada por (3.3)) es $\Delta r=26.5 \mu\text{m}$, y la zona focal es $\Delta f_r=0.84 \text{ mm}$.

$$\Delta r = \frac{2\lambda_0}{\pi} \frac{1}{NA}, \quad \Delta f_r = \frac{\pi \Delta r^2}{2\lambda_0} \quad (3.3)$$

► Profundidad de penetración, sensibilidad y rango dinámico

En OCT de fuente de barrido (SS-OCT) el rango en el cual se puede formar una imagen viene dado por la máxima diferencia de camino óptico ΔZ_{Nq} , determinada por la condición de Nyquist (Häusler y Lindner, 1998). La profundidad de penetración depende entonces del número de muestras tomado en cada barrido del láser $N_s=1152$. Suponiendo un índice de refracción $n=1.38$ y considerando las características de la fuente láser: longitud de onda central $\lambda_0=1310 \text{ nm}$ y ancho de

banda óptico $\Delta\lambda=100$ nm, existe una diferencia de camino máxima de $\Delta Z_{Nq}=3.58$ mm en tejido biológico y de $\Delta Z_{Nq}=4.94$ mm en el aire.

$$\Delta Z_{Nq} = \frac{N_s \lambda_0^2}{4n\Delta\lambda} \quad (3.4)$$

No obstante, la penetración en medios turbios es aún menor. En un fantoma esparcidor construido a base de resina, TiO_2 y un tubo de polietileno (0.28 mm de diámetro interior, 0.61 mm de diámetro externo, BD Intramedic #PE-10-100) la máxima profundidad lograda es de aproximadamente 3 mm (figura 20A en el apéndice II). La profundidad de penetración *in vivo* es aún menor, 1 mm en una yema de dedo humana (figura 20B). Nótese la presencia de una línea horizontal sólida a ~ 1 mm de profundidad. Este artefacto se debe a la presencia de una modulación parásita en el espectro de la fuente (Gelikonov *et al.*, 2010).

La sensibilidad se define como la mínima señal detectable capaz de producir una salida igual a la de las fluctuaciones aleatorias (Brezinski, 2006). Se coloca un espejo como señal de entrada y se alinea para obtener la máxima cantidad de luz en la fibra óptica. Esta intensidad de luz saturará el detector, por lo que se colocan NDF en el brazo de muestra para reducir la intensidad captada. Con cada filtro añadido los prismas del bloque de compensación de dispersión se ajustan para tener la misma diferencia de camino óptico. Se siguen añadiendo filtros hasta que se deje de distinguir el espejo. La sensibilidad del sistema equivale al doble de la atenuación total ya que el haz viaja dos veces a lo largo del brazo de muestra. Se midió un valor de ~ 114 dB con este método.

El rango dinámico se define como la razón entre la máxima señal detectable y la mínima. Idealmente este rango estaría limitado por la capacidad de la tarjeta de adquisición con un ADC de 14-bits, es decir ~ 84 dB. Se emplea el mismo montaje que el descrito en el párrafo anterior. La atenuación necesaria para obtener una imagen no saturada fue de 40 dB, la cual corresponde a ~ 74 dB de rango dinámico.

OCT DOPPLER

Un aspecto clave de la OCT es su capacidad de medir la velocidad de partículas en movimiento gracias al efecto Doppler. El efecto Doppler es el cambio en la frecuencia de una onda debido al movimiento relativo entre la fuente y el receptor; las partículas en movimiento desempeñan el papel del receptor en este caso. La frecuencia observada de la luz retroesparcida por la partícula difiere de la frecuencia de la fuente de manera proporcional a su velocidad. La frecuencia f_D Doppler es la diferencia entre la frecuencia observada y la frecuencia de la fuente. Existen varias técnicas para medir la frecuencia Doppler y en esta obra uso una técnica sensible a las partículas esparcadoras en movimiento adaptada de Ren *et al.* (2006) y Srinivasan *et al.* (2010). En síntesis, se define la señal compleja de la transformada de Fourier de la j -ésima línea-A como $\Gamma_j(z)$, en función de la profundidad z , luego se calcula la diferencia entre dos líneas-A adyacentes $M_j(z)$:

$$M_j(z) = \Gamma_{j+1}(z) - \Gamma_j(z) \quad (3.5)$$

Luego se define una región de interés (ROI) como la intersección de N líneas y K renglones, y se promedia la señal $A_j(z)$ sobre esta ROI:

$$A_j(z) = \sum_{z=m}^{m+K} \sum_{j=n}^{n+N} M_j(z) M_{j+1}^*(z) \quad (3.6)$$

Después se calcula la frecuencia Doppler local promedio a partir de $A_j(z)$:

$$f_D^j(z) = \frac{1}{2\pi\tau} \tan^{-1} \left\{ \frac{\Im[A_j(z)]}{\Re[A_j(z)]} \right\} \quad (3.7)$$

Donde τ es el periodo de adquisición de una sola línea-A. La ventaja de esta técnica radica en que permite cambiar la zona de promediado. Si se elige una ROI grande, la técnica es menos sensible a velocidades pequeñas, pero también se ve afectada en menor medida por el ruido Doppler que proviene de los difusores Doppler estáticos.

MÉTODOS EXPERIMENTALES

Se ha demostrado que el endurecimiento de las arterias es un factor predictivo en el deterioro cognitivo y en la demencia (Pase *et al.*, 2012), aun así no existe un modelo específico de rigidez arterial. Recientemente se desarrolló un nuevo modelo de calcificación unilateral de la carótida (Sadekova *et al.*, 2013), y se empleó la OCT para evaluar el impacto de la calcificación de la carótida en el cerebro, midiendo la pulsatilidad del flujo sanguíneo a lo largo de un ciclo cardíaco. En la figura 21 en el apéndice II se muestran ejemplos de mediciones de pulsatilidad. Debido a que el sistema descrito en este capítulo no se encontraba funcionando al 100%, al momento de los experimentos *in vivo*, se empleó otro OCT (Baraghis *et al.*, 2011).

En nuestro trabajo se usó un tomógrafo de coherencia óptica en el dominio de la frecuencia (FD-OCT) para efectuar la toma de imágenes. Este sistema se describe a detalle en Baraghis *et al.* (2011). En resumen, el sistema se basa en un LED de 870 nm (Exalos EXS8710-2411, Langhorne, PA), con 65 nm de ancho espectral y 2.5 mW de potencia incidente en la muestra, a través de un objetivo 10× corregido al infinito (Olympus UMPLFLN 10XW, Markham, Ontario). Las resoluciones axial y lateral son 5 y 10 μm , respectivamente. La detección se lleva a cabo mediante un espectrómetro personalmente construido que usa una cámara lineal de 2048 pixeles (Basler Sprint sPL2048 -140k, Exton, PA). La tasa de líneas-A se limitó a 15 kHz debido a las capacidades de escritura de datos al disco duro. La máxima velocidad Doppler de flujo sanguíneo detectable fue de 3 mm/s sin repliegue de la fase. Se efectuaron una serie de adquisiciones en cada ratón con un FOV de dimensiones of 200-800 μm , dependiendo del tamaño de las arterias bajo observación. La atenuación de la luz permitió obtener imágenes de vasos sanguíneos hasta 500 μm de profundidad. Se midieron entre 4 y 6 diferentes arterias por cada animal.

Las imágenes se reconstruyeron *a posteriori* utilizando programas personalizados escritos en Matlab (The MathWorks, Natick, MA). La compensación de dispersión se implementó de acuerdo al procedimiento descrito en (Wojtkowski *et al.*, 2004). El flujo sanguíneo

Doppler se calculó empleando la técnica sensible a difusores en movimiento, adaptada de Ren *et al.* (2006) y Srinivasan *et al.* (2010). Finalmente se aplicó un filtro pasa-altas para remover los componentes esparcidos estacionarios de la imagen.

Para obtener el perfil de flujo sanguíneo durante un ciclo cardíaco se tienen que hacer múltiples barridos-B (cada uno compuesto por 840 líneas-A) en el mismo lugar, en nuestro caso se efectuaron 400. De manera simultánea se registra la señal electrocardiográfica (ECG) durante este protocolo, lo que permite la reconstrucción de la evolución de la velocidad sanguínea durante un latido del corazón. Se detectan los picos QRS del ECG, después se asigna la diferencia de tiempo entre el complejo QRS y cada línea-A; esta diferencia se denomina tiempo de ciclo cardíaco. Típicamente se adquieren ~8 imágenes cada ciclo. Cada línea-A se coloca en una matriz 3D cuyas otras dimensiones son la posición y el tiempo de ciclo cardíaco, lo que nos permite reconstruir el perfil de velocidad del flujo sanguíneo para cada pixel durante todo el latido del corazón.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

El impacto de la rigidez arterial en la pulsatilidad del flujo sanguíneo cerebral se evaluó por medio de imagenología OCT. El grupo al cual se le trataron las arterias con CaCl_2 , la pulsatilidad se incrementó significativamente, tanto para las arterias de tamaño medio, como para las grandes ($>95\mu\text{m}$), respecto al grupo control. Es más, este incremento resultó significativo sólo para el lado derecho de la corteza, la cual es ipsolateral a la arteria carótida tratada con CaCl_2 . En lo que respecta a las regiones específicas del cerebro, la pulsatilidad se incrementó de manera significativa en la región de la arteria media cerebral, sin embargo, la corteza somatosensorial no mostró ninguna diferencia significativa. Estos resultados sugieren que la pulsatilidad inducida por la rigidez de la carótida depende de la localización específica de los segmentos arteriales.

CONCLUSIONES

En este capítulo se demostró la aplicación de la FD-OCT para evaluar la pulsatilidad del flujo sanguíneo cerebral. La implementación completa y total del sistema SS-OCT que se diseñó no se pudo llevar a cabo debido a limitaciones del propio equipo; no obstante, si se actualiza la tarjeta de adquisición de datos, cambiándola por un digitalizador de alta velocidad, capaz de efectuar un muestreo lineal en el dominio k , se tendría un sistema capaz de tomar imágenes en tiempo real. Dicha actualización no requeriría mayores modificaciones a la óptica existente y su implementación debería ser trivial.



4

Conectividad funcional

En el presente capítulo se describen las técnicas que nos permiten observar la sincronía entre diferentes zonas del cerebro y ver cómo cambia en presencia de una enfermedad, ya sea cardiovascular o de tipo neurológico. El término conectividad funcional (fc) se define como la evaluación de la correlación temporal entre eventos neurofisiológicos espacialmente remotos (Friston *et al.*, 1993). Esta definición se aplica, tanto a estudios basados en tareas, como a paradigmas en estado de reposo, el trabajo presentado en esta obra, empero, se limita a estudios en reposo.

En este capítulo describo los algoritmos usados para extraer información de fc a partir de mediciones ópticas. El trabajo presentado en las aplicaciones (capítulo 5, 6 y 7) se efectuó principalmente con fc basada en regiones de interés y mediciones de teoría de grafos. Para el análisis de datos en OIS y PAT, desarrollamos dos paquetes de herramientas en MATLAB compatibles con la interfaz gráfica de mapeo estadístico paramétrico (SPM) (The FIL methods group, 2010), capaz de ejecutarse en lotes, se ponen a disposición copias de este programa solicitándose al laboratorio del Prof. Lesage. Además de lo mencionado, se exploraron algunas otras técnicas como descomposición en valores singulares y agrupamiento (*clustering*) jerárquico, aunque no se implementaron plenamente para efectuarse el análisis a nivel de grupo. Algunos otros métodos como modelos de ecuaciones estructurales (Gonçalves y Hall, 2003), herramientas de información mutua (Salvador *et al.*, 2007) o mapas auto-organizables (Peltier *et al.*, 2003) están fuera de los límites y alcances de esta obra.

DESCRIPCIÓN DE LOS ALGORITMOS

► Conectividad funcional basada en regiones de interés

Una de las primeras técnicas para identificar patrones espaciales de actividad cerebral coherente (y la más ampliamente utilizada) es el análisis basado en regiones de interés (Biswal *et al.*, 1995). Este método conlleva la extracción de la trayectoria temporal de la señal funcional sobre una región de interés, también llamada semilla (*seed*), para después calcular la correlación temporal entre esta señal extraída y el curso temporal de todos los píxeles que pertenecen al cerebro. Este análisis también puede limitarse a la correlación temporal entre regiones de interés (ROI).

Las sesiones de grabación duran aproximadamente quince minutos y se llevan a cabo en estado de reposo. Las trayectorias temporales de cada píxel se filtran en la banda 0.009-0.08 Hz, usando un filtro Butterworth de cuarto orden cero desfase, de acuerdo a estudios previos de fc (Bero *et al.*, 2012; Brian R White *et al.*, 2011). Se elige un diseño Butterworth debido a su respuesta plana en la banda de paso; se consigue un desfase de cero en el filtrado, procesando los datos en las direcciones delantera y reversa, usando la función `filtfilt` de MATLAB (Oppenheim *et al.*, 1999). Después del filtrado temporal cada píxel se submuestra de 5 Hz a 1 Hz.

Para tomar en cuenta la variabilidad coherente común a todos los píxeles se debe crear una señal global del cerebro promediando las trayectorias temporales de aquellos píxeles pertenecientes al cerebro. Enseguida se incluye esta señal global cerebral en la regresión de la trayectoria temporal de cada uno de los píxeles, usando un modelo lineal general (GLM) del paquete de funciones mapeo estadístico paramétrico (Friston *et al.*, 2006) (SPM8) que se ejecuta bajo MATLAB ver. 7.10.0.499 (R2010a) (The MathWorks, Natick, MA). Este procedimiento tiene su origen en la fc-MRI para mejorar la calidad de las mediciones al remover las fluctuaciones espontáneas BOLD comunes a todos los voxels del cerebro (Fox *et al.*, 2009).

Representemos los datos OIS como la matriz y de dimensiones $n \times m$, donde n es el número de puntos temporales (cuadros) y m es el número de píxeles. La señal global cerebral g se define como la trayectoria temporal promedio de todos aquellos píxeles marcados como pertenecientes a la corteza cerebral. Esta señal global g es un vector columna de $n \times 1$ elementos. La regresión pixel a pixel de los datos OIS sobre la señal g produce la imagen:

$$\beta_g = g^+ y \quad (4.1)$$

Donde g^+ (que es un vector renglón de $1 \times n$ elementos) es la pseudo inversa de g , es decir $g^+ = [g^T g]^{-1} g^T$ y $g^+ g = 1$. Ahora β_g es un vector (imagen) renglón de $1 \times m$ elementos. Al remover la señal global de los datos OIS y generamos la nueva serie de imágenes:

$$y' = y - g \beta_g \quad (4.2)$$

Esta serie temporal de imágenes y' es el residuo de la regresión y se usa entonces para generar los mapas de correlación basados en regiones de interés.

La regresión de la señal cerebral global provoca que la distribución de las correlaciones se centre alrededor de un valor igual a cero (sin correlación), engendrando la aparición de correlaciones negativas artificiales (anticorrelaciones). Por lo tanto, se debe tener precaución al interpretar las anticorrelaciones que se generan en esta etapa del procesamiento de datos.

Todas las ROI se colocan manualmente *a priori* usando las coordenadas correspondientes a las regiones corticales frontal, cíngulo, motriz, somatosensorial, retrosplenial y visual (Brian R White *et al.*, 2011). Las series temporales se calculan como el promedio dentro de siete píxeles alrededor del *locus*.

El principio de funcionamiento de la fc basada en ROI se ilustra con un ejemplo en la figura 22 en el apéndice II.

Cuando el modelo animal implica una modificación unilateral, es de esperarse que se observen diferencias entre las regiones y sus homólogas contralaterales, así que la métrica empleada en la evaluación de la fc fue una correlación funcional bilateral; la cual se define como el coeficiente de correlación de Pearson r entre la trayectoria temporal de cada ROI y su contraparte lateral, produciéndose así seis valores para cada ratón. Enseguida se convierten los valores de coeficiente de Pearson r a medidas Z de Fisher Z usando $Z(r) = \frac{1}{2} \ln [(1+r)/(1-r)]$ antes de efectuar las pruebas de clasificación de Wilcoxon. Se corrigieron los valores p para comparaciones múltiples utilizando el ajuste de porcentaje de falsos descubrimientos (FDR). Los valores ya ajustados se consideraron como significativos para $p < 0.05$.

Este enfoque es usado ampliamente en neuroimagenología funcional dada su simplicidad, alta sensibilidad y facilidad de interpretación (Cordes *et al.*, 2001; Fox y Raichle, 2007; Greicius *et al.*, 2003). No obstante esta técnica no está exenta de limitaciones: se genera sólo un mapa por cada región de interés, y estos mapas no son capaces de proporcionar una visión completa de todas las interacciones entre ROI. La información de un mapa individual se limita a las conexiones funcionales de la región seleccionada, lo que dificulta examinar patrones de conectividad funcional a gran escala. Además, los resultados dependen de la información *a priori* del emplazamiento de cada región (Fox y Raichle, 2007).

► **Análisis de componentes independientes (ICA)**

Este enfoque es probablemente la segunda técnica más empleada para analizar la fc (Fox y Raichle, 2007). El ICA minimiza la dependencia estadística entre sus componentes. Cada componente se asocia con un mapa espacial, y algunos de éstos reflejan sistemas neurofuncionales y otros representan componentes de ruido. La técnica no requiere la colocación *a priori* de las ROI, sin embargo, sí requiere que el usuario determine manualmente cuales componentes son los más importantes y se asemejan a sistemas neurofuncionales y cuales reflejan el ruido. Es una técnica prometedora debido a que está basada

únicamente en los datos y su uso se incrementa día a día. No obstante, todavía existen inconvenientes. El primero es que los resultados dependen enormemente del número de componentes que el usuario le solicite al algoritmo. El segundo, ya mencionado con anterioridad, es la separación manual entre los mapas funcionales y el ruido. El último, es que ha habido un debate entre la independencia espacial y la temporal (McKeown *et al.*, 2003).

En este trabajo se exploró una alternativa al ICA: el análisis de componentes principales (PCA) y su herramienta equivalente, la descomposición en valores singulares (SVD) (Worsley *et al.*, 2005). El PCA es similar al ICA en términos de resultados y de interpretación, pero supone que las fuentes de datos están meramente no correlacionadas, no precisamente independientes estadísticamente. El objetivo del PCA es minimizar el error de retroproyección de datos comprimidos (Draper *et al.*, 2003). Representemos los datos OIS mediante la matriz espacio-temporal X_{nt} donde $n=1, 2, \dots, N$, siendo N el número de píxeles y $t=1, 2, \dots, T$ donde T es el número de muestras temporales. Las trayectorias temporales de cada pixel se correlacionan entre sí para generar la matriz de autocorrelación:

$$R_{xx}(i, j) = \text{corr}(X(i, t), X(j, t)), \quad i, j \in N \quad (4.3)$$

Almacenar en memoria esta matriz de autocorrelación o de conectividad puede ser prohibitivo, ya que el tamaño de R_{xx} es $N \times N$, de ahí la necesidad de recurrir a medios de almacenamiento un tanto más sofisticados, tales como el mapeo de memoria a disco duro. Además R_{xx} se puede aproximar como:

$$R_{xx} = \sum_{k=1}^K U_{nk} \Lambda_{kk} V_{nk} \quad (4.4)$$

Donde U y V son matrices ortogonales interpretadas como las bases de los modos de correlación, donde cada una representa un patrón de conectividad espacial, y Λ es la matriz diagonal con las ponderaciones de los componentes. Los valores singulares indican la contribu-

ción de cada vector en particular a la varianza total en los datos. Por lo tanto, los primeros vectores singulares representan los patrones de conectividad más dominantes, tal y como se ilustra mediante la figura 23 en el apéndice II.

► Agrupamiento jerárquico

El agrupamiento (*clustering*) jerárquico intenta aglomerar aquellos píxeles cuyo comportamiento temporal es similar (Cordes *et al.*, 2002). De manera similar al PCA, se construye una matriz de autocorrelación con las trayectorias temporales de todos los píxeles. Aquí aplicamos un algoritmo de agrupamiento a todos aquellos píxeles cuya similitud exceda un cierto umbral. Existen diferentes métodos para medir la similitud entre grupos (*clusters*); en el ejemplo aquí mostrado se empleó el método de la distancia más corta. Al obtener esta información se puede construir un dendrograma o árbol jerárquico, que resulta útil para concebir las relaciones existentes entre diferentes regiones, como se ilustra en la figura 24 en el apéndice II. Esta técnica no se exploró en profundidad debido a la limitante impuesta por la necesidad de definir un número máximo de grupos *a priori*, ya que no existe una medida única de definir el número óptimo de grupos en los cuales se deben repartir los datos (Margulies *et al.*, 2010).

► Teoría de grafos

Cualquier tipo de sistema complejo se puede representar como una red, es decir, un conjunto de elementos enlazados por conexiones (Pettrella, 2011). La teoría de grafos es una rama de las matemáticas que trata de caracterizar a las redes; su origen se atribuye a Euler, quien en el siglo XVIII, resolvió el problema de los puentes de Königsberg (Euler, 1741). El problema consistía en encontrar una ruta a través de la ciudad atravesando los puentes exactamente una vez y regresando al punto inicial. Euler demostró que era imposible representando el problema como una red abstracta: un grafo (Stam y Reijneveld, 2007). Cualquier clase de elementos que interaccionen puede ser visto como una red,

desde las conexiones sociales, el Internet, redes eléctricas, sistemas de transporte público, genes, proteínas o neuronas (Bassett y Bullmore, 2006). La técnica de fc basada en ROI previamente explicada se enfoca principalmente en cartografiar la extensión espacial de las redes, mientras que la teoría de grafos, al contrario, proporciona los métodos complementarios para caracterizar varias propiedades de la organización cerebral vista como una red.

En un grafo G , la representación matemática de una red, los vértices (nodos N) corresponden a los elementos del sistema y las líneas (bordes K) que conectan cada vértice simbolizan las interacciones entre ellos (Latora y Marchiori, 2001). Así, la corteza cerebral se puede modelar como un grafo donde los nodos se asocian con las ROI y los bordes se asocian con la amplitud de la conectividad funcional $z(r)$ existente entre esas regiones. Después de calcular la matriz de conectividad región a región, generalmente se aplica un umbral para definir la matriz de adyacencia, la cual caracteriza al grafo G . Se elige un umbral apropiado de costo para que la red exhiba las propiedades de mundo pequeño, características de las redes funcionales cerebrales (Achard y Bullmore, 2007; Bassett y Bullmore, 2006).

Un grafo G formado por un conjunto de nodos (vértices) N y un conjunto de bordes (conexiones) K se puede caracterizar mediante varias métricas a nivel de ROI (Bassett y Bullmore, 2006; Whitfield-Gabrieli y Nieto-Castanon, 2012). G se puede representar por su matriz de adyacencia o de conectividad, es decir, la matriz de dimensiones $N \times N$ cuyo elemento $a_{mn}(G)$ indica la presencia de un borde que conecta el nodo m con el nodo n . Una de las medidas más elementales es el grado, definido simplemente por el número de bordes que conectan a un cierto nodo n , y se indica generalmente como $k_n(G)$. Otra métrica importante de cada nodo n es el costo $C_n(G)$, definido como la proporción de vecinos conectados. La función $d_{nm}(G)$ representa el camino más corto entre los nodos n y m en el grafo G , y se define como el camino con el mínimo número de bordes. La longitud de camino promedio $L_n(G)$ se define como el promedio de las distancias más cortas entre un nodo n y el resto de los nodos del grafo. Una medida relacionada con la anterior es la eficiencia global $E_n^{global}(G)$, la cual es el inverso de

la longitud de camino promedio. $E_n^{global}(G)$ se puede considerar como una medida de la importancia relativa que tiene un nodo dado en el grafo. Una medida de la robustez de un grafo es el coeficiente de agrupamiento $CC_n(G)$, definido como la probabilidad de que los vecinos de este nodo también estén conectados entre sí; dicho de otro modo, equivale al número de conexiones entre el nodo n y sus nodos vecinos $e_n(G)$, dividido entre el máximo número de conexiones. Una medida proporcional al coeficiente de agrupamiento es la eficiencia local $E_n^{global}(G)$, definida como la eficiencia global promediada entre todos los vecinos del nodo n . Finalmente, el grado de intermediación $CB_n(G)$, de un nodo n en particular es el número de caminos más cortos que pasan por este nodo $\sigma_{jm}(n)$, divididos entre el total de caminos más cortos de la red $\sigma_{jm}(G)$. (Anthonisse, 1971; Freeman, 1977). Es una medida de la importancia del nodo en el grafo.

Las métricas que reflejan un nivel global de integración en la red se generaron mediante el promedio de medidas a nivel de nodo, como se muestra en la tabla 4.1. Estas medidas a nivel de red se ingresaron en un GLM de segundo nivel para comparar patrones de fc entre grupos.

El nivel de relevancia estadística se determinó mediante un test t de Student no apareado ($p < 0.05$) con corrección FDR (Benjamini y Hochberg, 1995). En síntesis, el procedimiento FDR se define como:

$$P_{(i)} \leq \frac{i}{m} q^* \quad (4.5)$$

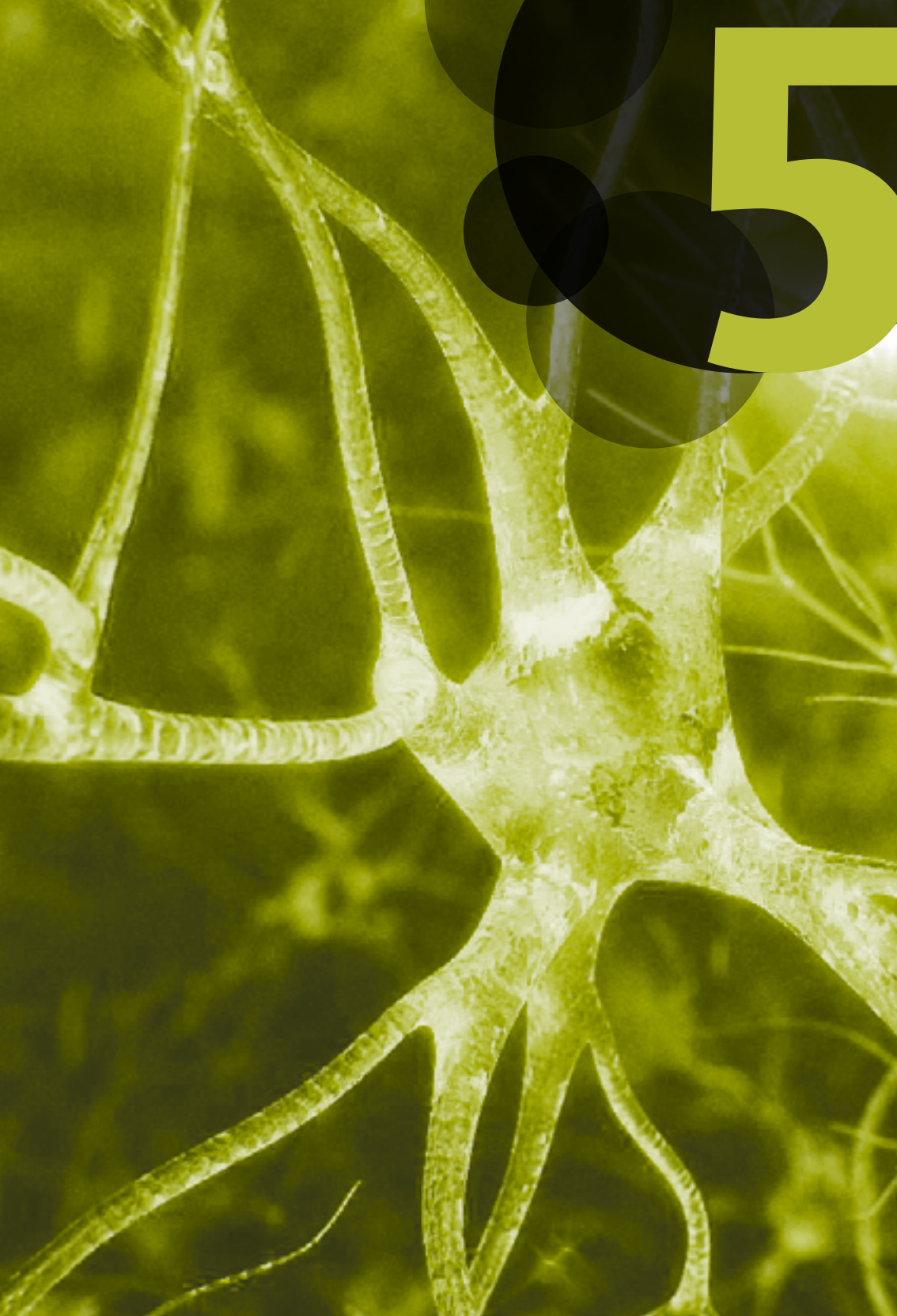
Donde $P_{(i)}$ son los valores p en orden, $H_{(i)}$ es la hipótesis nula que corresponde a $P_{(i)}$, y q^* es el nivel de relevancia del test. Se define k como el valor i más grande para el cual la desigualdad (4.5) se cumple, entonces se rechazan todas las $H_{(i)}=1, 2, \dots, k$ y se controla la FDR. Esta corrección es menos severa que el método de Bonferroni, lo que incrementa la potencia estadística a costa de incrementar los errores de falsos positivos.

La teoría de grafos aprovecha las herramientas desarrolladas en el área de las matemáticas a lo largo de muchos años y proporciona los instrumentos para aplicar esta teoría a la imagenología cerebral, ca-

	Mediciones a nivel de ROI	Mediciones a nivel de red
Eficiencia global	$E_n^{global} = \frac{1}{N-1} \cdot \sum_{m \in \text{ROI}} \frac{1}{d_{nm}(G)}$	$E^{global} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{n \in G} E_n^{global}(G)$
Eficiencia local	$E_n^{local} = E_n^{global}(G_n)$	$E^{local} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{n \in G} E_n^{local}(G)$
Grado de intermediación	$CB_n(G) = \sum_{j \in \text{ROI}} \frac{\sigma_{jn}(n)}{\sigma_{jn}(G)}$	$CB(G) = \frac{1}{N} \cdot \sum_{n \in G} CB_n(G)$
Costo	$C_n(G) = \frac{1}{N-1} \cdot k_n(G)$	$C(G) = \frac{1}{N} \cdot \sum_{n \in G} C_n(G)$
Longitud de camino promedio	$L_n(G) = \frac{1}{N-1} \cdot \sum_{m \in \text{ROI}} d_{nm}(G)$	$L(G) = \frac{1}{N} \cdot \sum_{n \in G} L_n(G)$
Coefficiente de agrupamiento	$CC_n(G) = \frac{2 \cdot e_n(G)}{k_n(G) \cdot (k_n(G) - 1)}$	$CC(G) = \frac{1}{N} \cdot \sum_{n \in G} CC_n(G)$
Grado	$k_n(G) = \sum_{m \in G} a_{mn}(G)$	$k(G) = \frac{1}{N} \cdot \sum_{n \in G} k_n(G)$

Tabla 4.1. Definición de las medidas de teoría de grafos.

racterizando así la organización del cerebro como una red. Un punto importante es la colocación de las ROI; ya que se tienen que definir *a priori*, esta técnica sufre de las mismas limitantes que el enfoque basado en regiones descrito con anterioridad.



5

Imagenología óptica de redes epilépticas en ratones

El propósito principal del trabajo descrito en este capítulo fue investigar el potencial de la OIS como una herramienta para estudiar las redes en reposo durante la actividad epileptiforme. Se empleó la neurotoxina 4-Aminopiridina (4-AP) en ratones para modelar la actividad epileptiforme *in vivo*. Se identificaron RSN antes y después de la crisis epiléptica inducida, las cuales mostraron tanto incremento como decremento en las correlaciones homólogas para diferentes ROI de la corteza cerebral. Estos cambios no se manifestaron de manera uniforme a través de las diferentes medidas hemodinámicas (HbO_2 , HbR, CBF y CMRO_2), lo que sugiere un desacople potencial entre la circulación sanguínea y el metabolismo en las RSNs. Estos resultados apoyan la necesidad de incluir medidas hemodinámicas independientes en una investigación más exhaustiva de las redes epilépticas.

La epilepsia es un grupo de desórdenes neurológicos donde la sincronía anormal de descarga en grandes grupos de neuronas resulta en un ataque epiléptico (*ictus*), el cual puede tener serias consecuencias conforme avanza el tiempo (Kandel *et al.*, 1991). La epilepsia es uno de los desórdenes neurológicos más comunes, que afecta entre el 0.4 y el 0.8% de la población (World Health Organization, 2006). El método actualmente usado para visualizar descargas anormales epileptiformes en pacientes es llevar a cabo un electroencefalograma (EEG), una técnica que emplea electrodos para registrar la actividad eléctrica espontánea del cerebro (Gibbs *et al.*, 1937). Las anomalías epilépti-

formas usualmente se dividen en a) descargas «interictales» las cuales son transitorios EEG breves (en el orden de milisegundos) y asintomáticos que se distinguen claramente de la señal de fondo; y b) descargas «ictales» las cuales son actividades rítmicas focales con patrones característicos de evolución (con respecto a la amplitud, frecuencia y distribución espacial) que duran varios segundos al menos. Estas descargas *ictales* se asocian generalmente con manifestaciones clínicas de crisis epilépticas.

Recientemente se han explorado técnicas de imagenología funcional basadas en la perfusión cerebral como fMRI combinada con electroencefalografía (fMRI-EEG) (Gotman *et al.*, 2005) y la espectroscopía en el cercano infrarrojo funcional (fNIRS -EEG) (Gallagher *et al.*, 2008) como herramientas potenciales para identificar el foco epiléptico, así también como para estudiar el acoplamiento entre las regiones cerebrales involucradas en la red epiléptica. A pesar de que los cambios hemodinámicos disparados por eventos epilépticos han mostrado potencial para su localización, las observaciones en neuroimagenología aún tienen factores que confunden su interpretación. Una razón muy general es que la respuesta hemodinámica no se restringe al foco epileptogénico sino que se distribuye a través de una red de estructuras cerebrales con una dinámica compleja (Nguyen *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2007). Por ejemplo, la presencia de activación espejo (Morrell y deToledo-Morrell, 1999) hace que la lateralización se dificulte. Incluso cuando hay un foco claro y bien definido, los aspectos temporales entre la HbO₂, la HbR, el CBF, el CBV y el metabolismo del oxígeno son intrincados. En las descargas interictales y, sobre todo, en las crisis, se requiere un gran consumo metabólico para generar estas grandes descargas neuronales (Bruehl *et al.*, 1998); por lo que se ven acompañadas de un incremento en la perfusión, lo que complica la interpretación de la fMRI y de la fNIRS, dada la compleja relación entre las diferentes cantidades de interés.

El término conectividad funcional (fc) se aplica a una clase de estudios que examinan las correlaciones coherentes de actividad neural interregionales, ya sea durante tareas cognitivas o durante el reposo (Fox y Raichle, 2007). Es una técnica sensible a la sincronía espacial

y temporal de las fluctuaciones de la actividad neural (Waites *et al.*, 2006). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada con mediciones EEG en varios estudios que han encontrado cambios en la sincronía antes y después de la crisis (Aarabi *et al.*, 2008; Mormann *et al.*, 2003; Ponten *et al.*, 2007; Schindler *et al.*, 2007; Wendling *et al.*, 2005). La evaluación de conectividad funcional con EEG (fcEEG) *interictal* se ha demostrado en pacientes con epilepsia de lóbulo temporal (Bettus *et al.*, 2008), así también como en niños epilépticos (Righi *et al.*, 2008). Además, la fcEEG ha comprobado fungir como predictor del diagnóstico de epilepsia (Douw *et al.*, 2010). La motivación para aplicar la fc usando medidas hemodinámicas viene dada por estudios recientes que han usado fMRI en reposo (Luo *et al.*, 2012; Mankinen *et al.*, 2012; Waites *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011), y que encontraron una fc alterada en varias redes funcionales de pacientes epilépticos. En el primero de estos estudios se realizaron investigaciones en pacientes con epilepsia de lóbulo temporal izquierdo, donde se encontró una disminución significativa de conectividad comparados con los controles, en áreas relacionadas con el lenguaje, en estado de reposo (Waites *et al.*, 2006). Otros estudios de redes epilépticas documentaron un decremento de fc en las redes autorreferencial, somatosensorial, visual, y auditivas (Wang *et al.*, 2011), así también como en la red neuronal por defecto (DMN) (Frings *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012) y en la red dorsal de atención (Zhang *et al.*, 2009). La naturaleza distribuida de activación durante las crisis epilépticas, la heterogeneidad de la población de pacientes y el acoplamiento no lineal (Pouliot *et al.*, 2012; Voges *et al.*, 2012) entre los componentes vasculares durante grandes descargas neuronales son factores que motivan la investigación de estos fenómenos en modelos animales controlados para así caracterizar mejor los cambios de las redes surgidos de los eventos epilépticos.

En el estudio descrito en este capítulo adaptamos un técnica desarrollada recientemente que combina mapeo de fc usando señales ópticas intrínsecas (fcOIS) (Bero *et al.*, 2012; White *et al.*, 2011). Esto nos permitió medir la magnitud de la fc bilateral después de inducir crisis focales en la corteza somatosensorial, empleando un análisis de correlación basado en ROI. Dado que todos los procedimientos se efectua-

ron bajo condiciones de anestesia, el estado anestésico en reposo lo denominamos simplemente estado de reposo, por simplicidad y claridad. Además del contraste de oxihemoglobina previamente usado en Bero *et al.* (2012) y White *et al.* (2011), examinamos la desoxihemoglobina y flujo sanguíneo medidos de manera simultánea con LSCI para generar un conjunto extendido de medidas, para caracterizar cambios hemodinámicos durante amplias descargas neuronales. Este enfoque multimodal con grabaciones eléctricas y ópticas, proporciona una descripción completa de la actividad en reposo, antes y después de la inyección de la neurotoxina. La OIS y la LSCI cartografían variables hemodinámicas sobre toda la corteza cerebral y las grabaciones electrofisiológicas dan una medida precisa del potencial de campo local (LFP) en el área que circunda el foco epiléptico. La inyección de 4-AP en la corteza somatosensorial izquierda se usó para producir descargas epileptiformes (de aquí en adelante denominadas simplemente crisis) que resultan en hiperactividad en las neuronas corticales (Fabene *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2009). Este modelo ofrece la posibilidad de comparar la corteza en estado sano y en estado epiléptico en el mismo animal. Hay dos motivaciones para este estudio: (1) Comprender la modulación de redes cerebrales en etapas tempranas de ictiogénesis es importante para mejorar nuestra comprensión de la patofisiología de la enfermedad (Bettus *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012; Mankinen *et al.*, 2012); lo que puede ayudar a descubrir los mecanismos mediante los cuales se alteran estas redes cerebrales. (2) Y la motivación a largo plazo de evaluar la utilidad de los análisis en reposo para localizar el foco epiléptico o detectar las crisis. Nuestro objetivo fue hacer un estudio de prueba de principio usando imagenología óptica en eventos epileptiformes agudos, con la perspectiva de trasladar estas técnicas a un modelo animal más crónico donde no se requieran condiciones de anestesia.

MÉTODOS

► Preparación animal

Todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo de acuerdo a las recomendaciones del Consejo Canadiense de Cuidado Animal, aprobadas por el comité de ética en investigación animal del Instituto de Cardiología de Montreal. Nueve ratones C57BL/6 de sexo masculino (de 8.9 ± 0.2 semanas, peso de 23.3 ± 2.3 g, Charles River, Wilmington, MA) se anestesiaron vía inyecciones intraperitoneales de uretano (2mg/g de peso corporal) en una solución salina a 10% (peso/volumen). La temperatura corporal se mantuvo a 37°C con una frazada calefactora con control de lazo cerrado (MouseSTAT, Kent Scientific, Torrington, CT).

Se realizó una traqueotomía para evitar dificultades respiratorias (Moldestad *et al.*, 2009). El cuero cabelludo se removió de manera cuidadosa y se hizo una perforación guiada esterotácticamente en la corteza somatosensorial izquierda (las coordenadas fueron 1 mm al lado de la línea media, 1 mm caudal a bregma, ver la figura 25B en el apéndice II) para la inyección de 4-AP y monitorear la electrofisiología usando una aguja de calibre núm. 22.

Los ratones se colocaron en un aparato estereotáctico y se adquirió el ECG de manera subcutánea con un amplificador de una derivación (amp-bo1, emka TECHNOLOGIES, Paris). La señal filtrada (en la banda 0.2-500 Hz) y amplificada ($1000\times$ de ganancia) se muestreó a 1 kHz. Todos los signos vitales se digitalizaron con una tarjeta de adquisición de datos (NI-USB 6353, National Instruments, Austin, TX) controlada mediante una interfaz gráfica desarrollada en LabView (National Instruments), la cual controlaba también la adquisición de imágenes. Para evitar que se secase el cráneo expuesto, se hizo un contenedor con cera ósea el cual se adhirió al cráneo con gel de ultrasonido y se llenó con aceite mineral después de posicionar el micro electrodo.

► Modelo de epilepsia y electrofisiología

Se logró inducir la actividad epileptiforme de acuerdo con los procedimientos previamente descritos por Zhao *et al.* (2011, 2009), que se describen brevemente más adelante. Las crisis focales se indujeron con una inyección de 500 nL del agente bloqueador de canal K⁺ 4-AP (A78403, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en solución a 15 mM, a través de una micropipeta de vidrio con un controlador de microinfusión (uMC4, World Precision Instruments, Sarasota FL). El volumen se inyectó a una velocidad de 50 nL/min. La pipeta de vidrio de borosilicato (1 mm de diámetro exterior, 0.7 mm de diámetro interior, 75 mm de largo, World Precision Instruments, New Haven, CT) se estiró de manera horizontal en un jala-pipetas programable (P-2000, Sutter Instruments, Novato, CA).

Después de la inyección, se removió la pipeta de vidrio y se colocó un microelectrodo de tungsteno (0.5 - 2M Ω) a una profundidad de \sim 500 μ m en la corteza, para registrar el LFP extracelular en el sitio de inyección. La señal se filtró entre 10-5000 Hz, se amplificó 1000 veces con un amplificador de microelectrodos (modelo 1800, A-M systems, Sequim, WA), y se digitalizó a 10 kHz. Los datos LFP se filtraron de manera digital entre 0.2 y 130 Hz usando un filtro Butterworth de cuarto orden en posprocesado. Un ejemplo de actividad epileptiforme típica se muestra en la figura 25C en el apéndice II.

► Sistema óptico

Las imágenes OIS se adquirieron con una cámara CCD de 12 bits (Pantera 1M60, DS-21-01M60-12E, Teledyne Dalsa, Waterloo, ON) con un tamaño de pixel físico de 12 μ m en el circuito integrado y una resolución plena de 1024 \times 1024 pixeles. El montaje se muestra en la figura 25A en el apéndice II.

Una interfaz personalizada sincroniza la cámara con la iluminación, a la vez que graba las imágenes y los signos vitales. Se empleó una lente macro (105 mm f/2.8max, Sigma Corp., Ronkonkoma, NY) con poca profundidad de campo (350 μ m). Las imágenes de reflectancia

de la corteza se registraron a múltiples longitudes de onda multiplexadas en el tiempo (525, 590, 625 nm) producidas por LED de 10W (LZ4-00MA00, Led Engin, San Diego, CA). En la iluminación para imágenes de granularidad se empleó un láser de 90 mW, 785 nm (L785P090, Thorlabs, Newton, NJ). La apertura de la cámara se ajustó a $f/8$, a un tamaño similar al del pixel. El multiplexado de las cuatro longitudes de onda permitió una frecuencia de adquisición de 5 Hz. Se realizó un sub-muestreo de 2×2 para poder guardar los datos de manera continua en el disco duro. La iluminación se ajustó de modo tal que no sobrepuso ni se subexpuso ninguna parte del cerebro, con ninguna longitud de onda. El tiempo de integración se ajustó a 10 ms. Todo el arreglo óptico se montó en una mesa óptica con amortiguamiento activo (RS 2000, Newport, Irvine, CA) para evitar señales espurias debido a vibraciones.

► Imagenología por señales ópticas intrínsecas (OIS)

El análisis de imágenes espectroscópicas se basó en trabajo previamente publicado (Dubeau *et al.*, 2011; Dunn *et al.*, 2003). En síntesis, se toman imágenes de reflectancia de cada longitud de onda con la cámara y se interpretan como cambios en atenuación (densidad óptica) $\Delta OD = \log\left(\frac{I}{I_0}\right)$, donde I es la intensidad de luz reflejada e I_0 la intensidad de luz incidente. Los cambios relativos en HbO_2 y HbR se encontraron usando la ley de Beer-Lambert modificada (Delpy *et al.*, 1988) y una pseudo inversa de Moore-Penrose:

$$\Delta OD(\lambda, t) = \sum_i \epsilon_i(\lambda) C_i(t) D(\lambda) \quad (5.1)$$

El factor de longitud de camino diferencial, $D(\lambda)$, se tomó de Dunn *et al.* (2005) y los valores fuera del rango 560-610 nm se extrapolaron de Kohl *et al.* (2000). El nivel de base de la concentración de hemoglobina total de 100 μM se supuso en base a una saturación de oxígeno de 60% Dunn *et al.* (2005) para el análisis espectroscópico. Los coeficientes de extinción de la hemoglobina se obtuvieron de Prahl (1999)

y los valores de reflectancia se corrigieron para la respuesta espectral de la cámara CCD en convolución con la distribución de potencia espectral de los LED (Brieu *et al.*, 2010).

Las imágenes de cada cromóforo (HbO_2 , HbR) se filtraron espacialmente con un *kernel* Gaussiano de 11×11 píxeles (0.6×0.6 mm) con una desviación estándar de 5 píxeles (0.3 mm). Se grabó una imagen anatómica con iluminación de 525 nm, y la región que corresponde al cerebro se seleccionó manualmente usando una curva cerrada suave para crear una máscara de cerebro. Todo el procesamiento de datos se llevó únicamente en aquellos píxeles marcados como pertenecientes a dicha máscara.

► **Imagenología de contraste por granularidad láser (LSCI)**

Además de obtener imágenes de los cambios en las concentraciones relativas de hemoglobina, también se calcularon cambios en CBF mediante LSCI. La granularidad tiene su origen en la interferencia fortuita debida a múltiples esparcimientos de una fuente de luz coherente. En la presencia de partículas esparcidoras en movimiento: el campo de interferencia tiene fluctuaciones en intensidad, y estas variaciones se conocen como patrones de granularidad (Boas y Dunn, 2010; Dunn *et al.*, 2001, 2005). Al integrarse durante el tiempo de exposición de la cámara el patrón de granularidad se vuelve más borroso donde el flujo sanguíneo se incrementa. Las imágenes de flujo sanguíneo se generan a partir del contraste espacial de la granularidad C , definido como la razón entre la desviación estándar y el promedio de la intensidad $\sigma/\langle I \rangle$. El contraste es una función del tiempo de exposición de la cámara T y se relaciona con el tiempo de decorrelación τ_c de la granularidad, el cual se asume como inversamente proporcional a la velocidad de las partículas esparcidoras (Briers, 2001). Se empleó una ventana de 5×5 píxeles (0.3×0.3 mm) para calcular estas imágenes y los cambios relativos en flujo sanguíneo se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$C = \frac{\sigma}{\langle I \rangle'} - \frac{2\Delta C}{C_0} \equiv \frac{\Delta V}{V_0} \equiv \frac{\Delta CBF}{CBF_0} \quad (5.2)$$

Ya que $\Delta v/v_0$ subestima el CBF por menos de un 5% (Luckl *et al.*, 2010), en esta obra ambas cantidades se supusieron iguales. Las imágenes de flujo se sometieron a los mismos procesos de filtrado espacial que las imágenes de hemoglobina, además las imágenes de los diferentes contrastes se redujeron a $\frac{1}{4}$ del tamaño original debido a restricciones de memoria.

► Consumo metabólico cerebral de oxígeno (CMRO₂)

Los cambios relativos en el CMRO₂ se calcularon a partir de imágenes de CBF, HbT y HbR usando la relación en estado estable siguiente (Jones *et al.*, 2001; Mayhew *et al.*, 2000):

$$\frac{\Delta CMRO_2}{CMRO_{2,0}} = \frac{\left(1 + \frac{\Delta CBF}{CBF_0}\right) \left(1 + \gamma_R \frac{\Delta HbR}{HbR_0}\right)}{\left(1 + \gamma_T \frac{\Delta HbT}{HbT_0}\right)} - 1 \quad (5.3)$$

La hipótesis central de esta relación es la ausencia de transitorios con componentes hemodinámicos desacoplados. Aquí, dado que las RSN se identificaron a partir de datos filtrados entre 0.009-0.08 Hz (ver sección Conectividad funcional (fc)), planteamos la hipótesis de que, para estas redes, dicha relación se mantenía. Las constantes γ_R y γ_T se supusieron iguales a 1, lo cual las ubica dentro del rango fisiológicamente plausible (0.75-1.25) (Jones *et al.*, 2001).

► Conectividad funcional (fc)

En este capítulo seguimos el procedimiento detallado por White *et al.* (2011) para producir mapas de correlación basados en ROI, como el método para estudiar un aspecto de la fc; los pasos de dicho método se describen brevemente a continuación.

Varias sesiones de adquisición multimodal (tanto óptica, como eléctrica) de 15 minutos cada una, se llevaron a cabo en condiciones de reposo: dos sesiones se efectuaron antes de la inyección de 4-AP, mientras que otras dos se realizaron ~5 minutos después de liberar el compuesto epileptogénico en la corteza somatosensorial, lo que da un total de cuatro sesiones por ratón. Las trayectorias temporales de cada pixel se filtraron en la banda 0.009-0.08 Hz (usando un filtro Butterworth de cuarto orden y desfase cero), de acuerdo a estudios previos de fc (Bero *et al.*, 2012; White *et al.*, 2011). Después del filtrado temporal, cada trayectoria temporal se submuestreó de 5 Hz a 1 Hz.

Se generó una señal cerebral global a partir del promedio de todas las trayectorias de los pixeles. Para tomar en cuenta la variabilidad coherente común a todos los pixeles, se regresa esta señal global de cada pixel, usando un modelo lineal general GLM del paquete SPM (Friston *et al.*, 2006) (SPM8 www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm), el cual se ejecuta dentro de la plataforma MATLAB (The MathWorks, Natick, MA).

Todas las ROI se colocaron *a priori* usando las coordenadas correspondientes a las cortezas izquierda y derecha frontal, cíngulo, motriz, somatosensorial, retrosplenial y visual (White *et al.*, 2011), como se ilustra en la figura 25B en el apéndice II. Las señales se calcularon como el promedio de los pixeles en un radio de 3.5 pixeles (0.2 mm) a partir del locus, un ejemplo se ilustra mediante la figura 25D en el apéndice II. Esta ROI se colocó en el foco epiléptico marcado con el círculo punteado de la figura 25B en el apéndice II. Se pueden observar un aumento en HbO₂ y la disminución correspondiente de HbR al inicio de la crisis inducida.

Con la aplicación unilateral de 4-AP se esperan diferencias bilaterales entre las regiones corticales, así que la métrica empleada para evaluar fc fue la correlación funcional bilateral, definida como el coeficiente de correlación de Pearson, entre la trayectoria de cada ROI y su homóloga contralateral, lo que producirá seis valores para cada ratón. Estos valores de r se convirtieron a mediciones Z de Fisher Z usando $Z(r) = \frac{1}{2} \ln \left[\frac{(1+r)}{(1-r)} \right]$ antes de efectuar las pruebas de hipótesis. Dado que las suposiciones para distribuciones normales pudieran no sostenerse en este estudio, su importancia estadística se de-

terminó mediante la prueba de Wilcoxon. Los valores P se corrigieron para comparaciones múltiples usando ajuste FDR. Los valores ajustados se consideraron significativos para $p < 0.05$.

RESULTADOS

► Identificación de redes funcionales

Las redes funcionales que se identificaron de manera previa a la inyección de 4-AP se observaron de conformidad a la literatura previa (White *et al.*, 2011) para HbR (ver mapas representativos de cuatro ratones en la figura 26 en el apéndice II) aunque cabe decir que en algunos casos aparecía una fuerte lateralización de algunas redes.

Ya que realizamos una adquisición multi-espectral, se aplicó el mismo procedimiento para imágenes de HbO_2 y de CBF estimado con imagen de granularidad, y no se observaron cambios significativos (datos no mostrados). En un experimento se efectuó el análisis utilizando usando una tasa de imágenes más rápida para investigar el efecto de la frecuencia de adquisición. Al no encontrarse diferencias significativas se confirmó que la tasa de adquisición a 5Hz resultó adecuada (datos no mostrados).

► Cambios en la conectividad después de la inyección de 4-AP

De un total de nueve ratones, sólo cinco mostraron actividad epiléptica de manera clara (ver tabla 5.1 más adelante) mientras que cuatro, sólo actividad de puntas epilépticas. La crisis epiléptica se caracteriza por una actividad rápida rítmica de creciente amplitud y decreciente frecuencia, que evoluciona en puntas rítmicas y actividad lenta de ondas antes de un término gradual (vea un ejemplo de ello en la figura 25C en el apéndice II), mientras que la actividad de puntas presenta menos de 10 picos por ráfaga (datos no mostrados). Todos los ratones se combinaron en el análisis de datos. Para evaluar el impacto de las crisis agudas y de la actividad epileptiforme en las RSNs, las sesiones

en estado de reposo adquiridas posteriormente a la inyección de 4-AP se analizaron siguiendo la misma metodología descrita en la sección Conectividad funcional (fc).

Las correlaciones entre regiones homólogas se investigaron y compararon antes y después de la inyección de la neurotoxina. Los datos extraídos de las trayectorias temporales de la HbO_2 mostraron una diferencia significativa en la región retrosplenial (figura 27A en el apéndice II). Para el contraste HbR no hubo diferencia significativa en ninguna de las regiones pareadas (figura 27B en el apéndice II), aunque se observa una disminución de fc en la corteza somatosensorial, tendencia que se aprecia también en los datos de flujo y CMRO_2 . Las regiones cíngulo, somatosensorial y retrosplenial, mostraron cambios significativos cuando se analizó el contraste CBF (figura 27C en el apéndice II): se observó una fc bilateral disminuida en las ROI somatosensoriales, mientras que la fc aumentó en las regiones cíngulo y retrosplenial.

A fin de determinar si estos cambios hemodinámicos se asocian con patrones de consumo metabólico, calculamos el CMRO_2 usando las fórmulas de estado estable, dadas las bajas frecuencias de las fluctuaciones frecuentemente documentadas en estudios de fc (Biswal *et al.*, 2010; Biswal *et al.*, 1995; Fox y Raichle, 2007; Greicius *et al.*, 2003). Los datos no muestran diferencias significativas (figura 27D en el apéndice II). Sin embargo, se aprecia una disminución de fc en las cortezas somatosensorial y retrosplenial, aunque no resulta significativa después del ajuste FDR. Todos los resultados se evaluaron con una prueba de Wilcoxon, también llamada test U de Mann-Whitney.

Las redes funcionales se derivaron de los datos de imagen filtrados en la banda específica de conectividad. También nos interesamos en medir la correlación entre señales brutas antes y después de las crisis, para observar el grado de alteración en todas las señales antes de la regresión de la señal cerebral global. Esos datos mostraron que todas las ROI están correlacionadas de manera positiva, lo cual indica la presencia de una señal común a todos los píxeles durante eventos epilépticos, de ahí la necesidad de regresar una señal global, obtenida del promedio de las señales de todos los píxeles identificados como cerebro.

► Correlación entre fc y duración de la crisis epiléptica

Al restringir el análisis a aquellos ratones que mostraron evidente actividad epiléptica, nos propusimos investigar si la duración de la crisis tenía un impacto en los cambios de conectividad. A fin de calcular estos cambios bilaterales se sustrajo la correlación bilateral durante las sesiones de control, $z_o(r)$, de la correlación bilateral posinyección 4-AP, $z_{4AP}(r)$, y se graficaron estos cambios frente a la duración promedio de las crisis inducidas, como se ilustra en la figura 28 en el apéndice II. En general las correlaciones entre duración de crisis y cambios en conectividad bilateral fueron moderados. Para la corteza somatosensorial, donde se inyectó la toxina, hubo una correlación positiva. Este mismo tipo de correlación se observó en los datos extraídos de las ROI frontales. Para otras regiones corticales, es decir, motriz, cíngulo, retrosplenial y visual, se observó el efecto inverso: los cambios se correlacionaron de manera negativa. En lo que respecta al contraste CBF la correlación fue significativa en las regiones somatosensorial ($r^2=0.52$) y retrosplenial ($r^2=0.75$). El contraste HbR mostró una correlación significativa para la región retrosplenial ($r^2=0.50$), mientras que HbO₂ tuvo una correlación moderada (no significativa) para la corteza mo-

Tabla 5.1. Datos de las crisis epilépticas.

ID del sujeto	Duración de las crisis (s)		Porcentaje de la sesión en estado de crisis (%)		Duración promedio (s)
	Sesión 1	Sesión 2	Sesión 1	Sesión 2	Ambas sesiones
1	45, 43, 33, 32	35, 32, 27	5.2, 4.9, 3.8, 3.7	4, 3.7, 3.1	35.3
3	27, 33, 34	-	2.8, 3.4, 3.5	-	31.3
4	114	71, 112	13.2	8.2, 12.9	99
7	38, 30, 30	33, 32	4.4, 3.4, 3.4	3.8, 3.7	32.6
9	130	161	15	18.6	145.5

La primera columna proporciona la duración (en segundos) de las crisis en cada sesión, múltiples números indican múltiples ocurrencias; la segunda columna muestra el porcentaje de la sesión en el que ocurrió las crisis; finalmente la última columna indica la duración promedio de las crisis por cada sujeto.

triz ($r^2=0.41$). La longitud promedio de los ataques por cada sujeto fue de 68.7 ± 51 s. Todas las sesiones de grabación fueron de 863 segundos. La tabla 5.1 incluye la duración de la actividad tipo crisis para cada sesión, el porcentaje de esa sesión que pertenece a una crisis y la duración promedio de las crisis en cada sujeto.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se investigó la fc regional bilateral usando un análisis de correlación basado en ROI. La fc antes y después de la inyección del agente epileptogénico 4-AP en la corteza somatosensorial.

Al usar contraste de HbO_2 , se encontraron diferencias significativas de fc en la corteza retrosplenial. Con la HbR como contraste, no hubo regiones que mostraran una diferencia estadísticamente importante aunque la mayoría de las correlaciones disminuyeron. En el caso del CBF relativo, se observó una diferencia significativa en las regiones corticales correspondientes al cíngulo, somatosensorial y retrosplenial. Las únicas ROI apareadas que mostraron un decremento significativo de fc se encontraron en la corteza somatosensorial, mientras que las regiones retrosplenial y cíngulo mostraron un incremento en fc; hacemos la conjetura que este aumento puede explicarse por la proximidad de esas dos últimas regiones al seno sagital, de modo tal que su comportamiento se ve dominado por un incremento en el drenado venos durante la actividad epiléptica. Para el $CMRO_2$ estimado, no se encontraron cambios significativos en las medidas de conectividad.

Debido a la proximidad de las ROI retrosplenial y cíngulo con el sitio de inyección de 4-AP los cambios en fc bilateral de estas regiones pueden atribuirse a la proximidad del sitio de inyección, lo que sugiere que la neurotoxina 4-AP pudo haberse propagado hacia esas regiones. No obstante, en el sitio de la inyección, la conectividad homóloga disminuyó, lo cual sugiere que hay un desacople de las conexiones hemisféricas que enlazan las áreas somatosensoriales mientras que en los sitios retrosplenial y cíngulo, aumentó la conectividad. Una explicación podría ser que existe un papel compensatorio en regiones cer-

canas (que aumentan su conectividad) para subsanar una reducción en la sincronización homóloga somatosensorial. Se observó un fenómeno similar en Brown *et al.* (2006), donde después de un derrame cerebral en la corteza sensorial de ratones, ocurrió una reorganización funcional, en áreas cercanas, aunque mucho tiempo después (8 semanas). Otra hipótesis es que los cambios hemodinámicos que se observan aquí pueden reflejar una redistribución local de flujo sanguíneo asociada con una actividad metabólica elevada en el foco epiléptico.

► **La actividad epiléptica conduce a un aumento y a un decremento de conectividad funcional**

En el caso de HbO_2 se observó una disminución significativa en la corteza retrosplenial. Sin embargo, la diferencia entre la sesión control y la sesión posinyección no resultó significativa en redes HbR. En el contraste de flujo sanguíneo se observó un incremento en las ROI pareadas tanto del cíngulo como del retrosplenial, así como un decremento significativo en la región somatosensorial.

En estudios previos que usaron fMRI (Luo *et al.*, 2012; Mankinen *et al.*, 2012; Waites *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011), se documentó, en general, una reducción de la fc en varias redes funcionales, medidas en pacientes epilépticos en reposo. Aunque hay que hacer una distinción clara con los experimentos descritos aquí, los cuales se enfocaron en RSN durante eventos epileptiformes agudos, los resultados que emergen de este estudio indican una interacción compleja entre los diferentes componentes de la respuesta hemodinámica, que conducen tanto a aumentos como a disminuciones de la fc en nuestro modelo animal. A pesar de que la HbR, la cual está estrechamente relacionada con la señal BOLD-fMRI, mostró disminuciones no significativas en la mayoría de las regiones (4 de 5); tanto la HbO_2 , como el CBF, observaron a sus correlaciones bilaterales moverse en direcciones opuestas en el sitio de la inyección, es decir, en la somatosensorial y en la retrosplenial hubo cambios significativos. Estos cambios de correlación dependientes de los componentes hemodinámicos indican que hay

un potencial desacople del flujo y metabolismo, aun en redes de bajas frecuencias.

Todas estas observaciones sugieren que usar una sola modalidad, por ejemplo fMRI BOLD, para investigar redes en reposo en epilepsia, puede resultar limitado, al no controlar ni flujo, ni oxigenación. Aun así, queda por investigar si los cambios observados se deben a cambios en la fisiología (aun y cuando no se observaron cambios significativos ni en el ECG ni en el ritmo respiratorio), a una alta demanda metabólica en el foco epiléptico o a la propia actividad neural. Un futuro trabajo con un modelo crónico que permita investigar las redes fuera de los periodos de crisis podría revelar cambios más coherentes entre los componentes hemodinámicos.

► **La correlación entre la actividad electrofisiológica y la conectividad en reposo**

Debido a que registramos la electrofisiología de manera simultánea, pudimos investigar el efecto de la duración de las crisis en correlaciones bilaterales de las RSNs. Nuestros resultados mostraron una dependencia de los cambios en fc bilateral respecto a la duración de las crisis, pero se vieron mitigados debido a los bajos valores de r^2 obtenidos en el análisis. Queda por estudiar si estos cambios también están presentes en condiciones subagudas, durante eventos de puntas, así también como la causa subyacente a los cambios de RSN observados en pacientes. Nuestros resultados se ven limitados por el hecho de que la electrofisiología se midió en la corteza somatosensorial; es posible que una actividad similar medida en otras regiones conduzca a diferentes resultados. El hecho de mantener el cráneo intacto, aparte del sitio de inyección permitió observar toda la corteza sin daños, pero la ausencia de múltiples sitios de registro LFP implica que la dependencia espacial de la electrofisiología sigue siendo una variable de confusión que no se investigó.

► El consumo metabólico refleja cambios hemodinámicos

El $CMRO_2$ es probablemente el marcador más cercano a la actividad neuronal. Aquí planteamos la conjetura de que la relación de estado estable entre las señales hemodinámicas y el $CMRO_2$ se mantiene para las redes en reposo debido a la baja frecuencia de sus fluctuaciones. Suponiendo la validez de esta hipótesis y comparando los cambios de correlación en las redes obtenidas con el contraste $CMRO_2$, nuestro análisis muestra cambios que siguieron tendencias similares a los cambios en HbR, excepto por las ROI visuales y frontales donde las diferencias observadas fueron pequeñas. Esta observación puede a su vez apoyar el uso de fMRI-BOLD ponderado por HbR como medición indirecta de RSN en epilepsia, a pesar de los factores de confusión fisiológicos ya conocidos y al desacople hemodinámico mostrado en este capítulo.

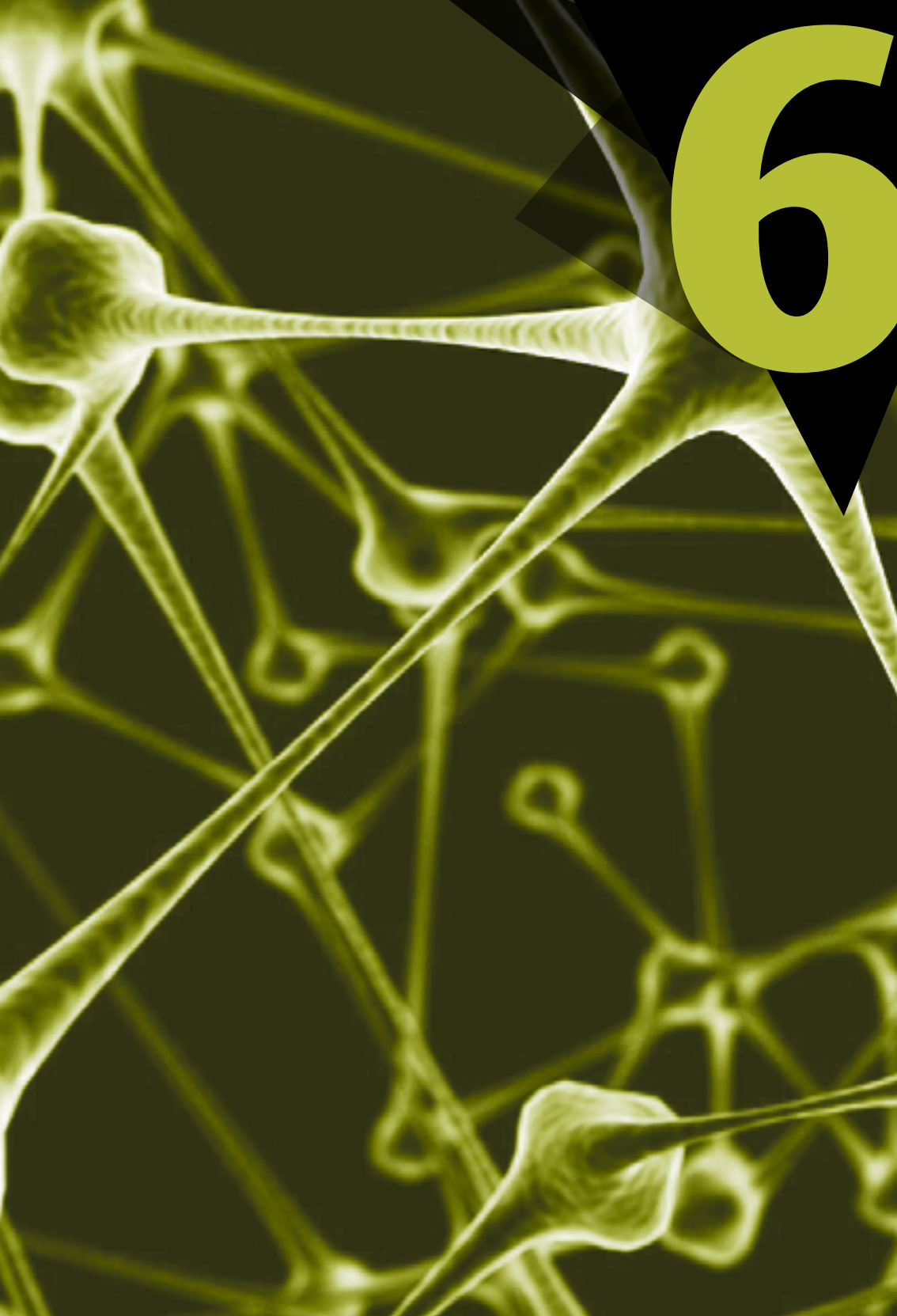
CONCLUSIÓN

Nuestra meta original fue investigar el potencial de la OIS para el estudio de redes epilépticas. Al combinar la OIS con la LSCI fuimos capaces de capturar imágenes simultáneas de cambios en HbO_2 , HbR, CBF y potencialmente $CMRO_2$, produciendo así un buen conjunto de datos hemodinámicos para estudios de fc durante crisis agudas. En este trabajo, después de inyectar 4-AP en la corteza somatosensorial de los ratones, se observaron cambios significativos en redes derivadas de ROI cercanas al sitio de inyección. Estos cambios no resultaron uniformes en todos los componentes hemodinámicos lo que señala un cuadro complejo con un potencial desacople entre el flujo sanguíneo y el metabolismo en las redes de baja frecuencia. Este estudio apoya la necesidad de investigar de manera más extensa la caracterización de redes epilépticas con más de una medida hemodinámica.

Existen varias limitaciones severas que hay que mencionar: la primera y la más importante es que los resultados se obtuvieron en eventos epileptiformes agudos y en una muestra relativamente pequeña.

Por consiguiente, no pueden equipararse directamente a aquellos estudios de conectividad en humanos obtenidos típicamente en periodos de reposo carentes de crisis epilépticas. Así, se debe tener precaución al interpretar estos resultados ya que existen varios factores fisiológicos que pueden confundir la actividad neuronal observada. En trabajos a futuro se intentará investigar poblaciones más grandes de modelos animales crónicos que se asemejen más a los estudios en humanos en estado de reposo.

6



Imagenología óptica de la conectividad funcional en estado de reposo en un nuevo modelo de rigidez arterial

En este capítulo evaluamos el impacto de la rigidez unilateral de la carótida en las redes en reposo. Usando mediciones de $CMRO_2$ se encontró una tendencia decreciente de la correlación bilateral, y dicha tendencia fue más evidente en las áreas de la corteza motriz y cíngulo. Los resultados de teoría de grafos sugieren una pérdida de conectividad en las redes funcionales en general (Guevara *et al.*, 2013).

La hipertensión arterial es una enfermedad con una prevalencia de entre 25% y 30% de la población adulta mundial (World Health Organization, 2012) y es un factor de riesgo en el envejecimiento temprano del cerebro, el desarrollo de enfermedades cognitivas y demencias. Los déficits cognitivos, incluyendo leves deficiencias cognitivas no amnésicas (Roberts *et al.*, 2010), se han asociado con enfermedades coronarias (CHD) (Aronson *et al.*, 1990; Breteler *et al.*, 1994; Singh-Manoux *et al.*, 2003). La rigidez arterial se ha identificado como factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (CVD) y puede desempeñar un rol en el desarrollo de dichos déficits. Se ha demostrado que la rigidez arterial es un predictor del declive cognitivo y de la demencia (Pase *et al.*, 2012). Las funciones cognitivas básicas como atención y memoria también se ven afectadas de manera adversa por el envejecimiento (Glisky, 2007), un proceso que se acelera debido a factores de riesgo como las CVD.

La imagenología anatómica y funcional se usa de manera activa para investigar dichos cambios en el funcionamiento del cerebro. Existen correlatos basados en imagen del envejecimiento y de déficits cog-

nitivos inducidos por la edad, como una disminución en la conectividad y en la eficiencia de redes cerebrales funcionales (Sun *et al.*, 2011), un peso y volumen cerebral menores (Anderton, 2002; Iadecola, 2010) y una reducción de CBF (Marshall y Lazar, 2011; Marshall *et al.*, 2001) relacionada con la disfunción endotelial (Bolduc *et al.*, 2012; Faraci, 2011). Aunque las investigaciones antes mencionadas sugieren que las técnicas de imagenología cerebral funcional poseen potencial en el ambiente clínico, se siguen viendo limitadas por dificultades en la interpretación. Un paso clave es la comprensión del impacto de la fisiología sistémica y el endurecimiento vascular y/o estenosis en las señales derivadas de la hemodinámica, utilizadas en imagenología funcional.

A pesar de que los estudios de fMRI usados en investigación básica se han enfocado en la respuesta del cerebro a una tarea; las complejidades del diseño de dicha tarea, la duración de múltiples eventos, el análisis estadístico y su interpretación, han limitado su uso en grandes estudios clínicos. Las RSN con fMRI facilitan la participación del paciente y reducen el número de variables comportamentales implícitas en paradigmas basados en tareas, produciendo un conjunto de redes básicas que pueden cartografiarse de manera confiable en sujetos humanos (Fox y Raichle, 2007; Greicius *et al.*, 2003; Gusnard *et al.*, 2001; van den Heuvel y Hulshoff Pol, 2010). La aplicación de mapeo de RSN con fMRI en diversas áreas de la neurociencia ha revelado nuevos aspectos de interés en la organización, tanto del cerebro sano (Buckner *et al.*, 2008; Cole *et al.*, 2010), como del cerebro con enfermedades, como la enfermedad de Alzheimer (Gili *et al.*, 2011; Greicius *et al.*, 2004; He *et al.*, 2009; van den Heuvel y Hulshoff Pol, 2010). Las RSN han desentrañado mecanismos potenciales del cerebro en diferentes áreas, pero se necesita resolver el significado concreto de los procesos subyacentes, así como su interpretación. La caracterización de RSN en presencia de una CVD es un primer paso para establecer técnicas de RSN en este contexto y puede ser la explicación de la escasez de estudios en reposo de la patología vascular. Se han encontrado, tanto aumentos, como decrementos en la fc de declive cognitivo vascular en el estudio de Sun *et al.* (2011). La fc en reposo se incluyó recientemente en el estudio RUN DMC de enfermedades de capilares cerebrales (van

Norden *et al.*, 2011). Recientemente, se ha encontrado una correlación entre patrones de afectación de las RSN y una disminución del desempeño cognitivo en pacientes con estenosis de la carótida (Cheng *et al.*, 2012).

El presente estudio aprovecha el reciente desarrollo de un modelo murino de rigidez arterial controlada, que se induce de manera unilateral mediante la aplicación de cloruro de calcio (CaCl_2). En un trabajo previo (Sadekova *et al.*, 2013), se demostró que este modelo induce degeneración neuronal en el hipocampo. Para ahondar en el impacto de la calcificación de la carótida y su aumento de rigidez en el cerebro, se cuantificó la pulsatilidad de flujo sanguíneo en ambos hemisferios. Se observaron cambios estadísticamente significativos en la pulsatilidad para el grupo CaCl_2 , lo que sugiere que la rigidez de la carótida tiene un impacto en la entrega de sangre aunque no en el flujo de base. Este modelo, donde uno puede estudiar el efecto aislado de la calcificación unilateral de la carótida en el cerebro, nos brinda una oportunidad única para investigar el impacto específico del endurecimiento arterial en las RSN.

El presente capítulo tiene como objetivo evaluar la conectividad en reposo de este modelo de rigidez arterial, empleando imagenología óptica intrínseca (OIS) multi-espectral. Al usar múltiples longitudes de onda para la iluminación, se pueden estimar cambios en la HbO_2 y la HbR, mientras que la imagenología por granularidad (LSCI) da acceso al CBF relativo. Al combinar estas medidas en un modelo matemático podemos estimar el CMRO_2 . Por lo tanto, debido al acceso a diferentes componentes hemodinámicos, la conectividad funcional basada en imagenología óptica de señales intrínsecas (fcOIS) puede proporcionar información adicional que complementa los estudios en reposo hechos con fMRI en el contexto de CVD.

MATERIALES Y MÉTODOS

► Modelo animal

Un total de $N=23$ ratones machos C57BL/6 (de 8 ± 0.2 semanas, peso de 23.6 ± 1.4 g, Charles River, Wilmington, MA), se dividieron en dos grupos para este estudio. Las carótidas de los animales se expusieron a un procedimiento simulado (Grupo 1, $N=11$), donde se aplicó una solución estéril de NaCl a 0.9% en la carótida; el segundo grupo (Grupo 2, $N=12$) se sometió a un procedimiento de calcificación mediante la aplicación de una solución de CaCl_2 a 0.3M. El comité de ética en investigación animal del instituto de cardiología de Montreal aprobó todos los procedimientos quirúrgicos, los cuales se ejecutaron de acuerdo a las recomendaciones del consejo canadiense en cuidado animal.

► Aplicación del cloruro de calcio

Se aplicó cloruro de calcio de manera periarterial para desarrollar rigidez de la carótida *in vivo*. Los ratones C57BL/6 (de 8 ± 0.2 semanas de edad, 23.7 ± 1.6 g de peso) se anestesiaron con isoflurano (5% para la inducción, 2% para el mantenimiento) en oxígeno (2 L/min para la inducción, 1.5 L/min para el mantenimiento). Este procedimiento requirió de 45 minutos de anestesia por animal y se controló la temperatura corporal entre 36 y 37 °C usando un calefactor (MouseSTAT, Kent Scientific, Torrington, CT). Se ejecutó una incisión en el cuello para dejar expuesta la arteria carótida común derecha (RCCA), y entonces se aplicó por veinte minutos un algodón estéril empapado ya sea en solución NaCl al 0.9% para el grupo control ($N=11$) o con una solución de CaCl_2 a 0.3M para el grupo bajo tratamiento ($N=12$). Posteriormente se suturó la incisión de la piel y se selló con adhesivo para tejido (Vetbond, 3M, St. Paul, MN). Se administraron de manera subcutánea bupivacaína (marcaína) (4mg/kg) y carprofen (5 mg/kg) para proporcionar anestesia local posquirugía. Además, se inyectó carprofen (5 mg/kg) cada 24 horas durante dos días o tres si se consideraba necesario. Las infecciones se previnieron de manera efectiva con la administración

posoperatoria de trimetoprim-sulfametoxazol (tribrissen, 30 mg/kg) cada 24 horas durante 3 a 5 días. Los animales se monitorearon dos veces al día durante la primera semana posoperatoria y se evaluaron en cuanto a peso, síntomas de infección local, dolor o incomodidad, comportamiento y consumo de agua y comida. Después de este periodo de recuperación, se monitorearon diariamente. La OIS se llevó a cabo dos semanas después de la operación.

► **Imagenología OIS**

Preparación animal y montaje óptico

La preparación de los ratones se llevó a cabo de la manera descrita en la sección Preparación animal del capítulo anterior. El montaje utilizado en este estudio se ilustra mediante la figura 29 en el apéndice II. Para una descripción detallada del sistema óptico referimos al lector a la sección Sistema óptico del capítulo anterior.

Procesado OIS y conectividad funcional

El análisis de los datos OIS se basó en trabajos previos y se describe a detalle en la sección Imagenología por señales ópticas intrínsecas (OIS), así como el procesado de imágenes LSCI se relata en el apartado Imagenología de contraste por granularidad láser (LSCI). Ambas mediciones se combinan en un modelo matemático para proporcionar no sólo imágenes de HbO_2 , HbR y CBF , sino también estimados de $CMRO_2$, como se describe en la sección Consumo metabólico cerebral de oxígeno ($CMRO_2$).

► **Análisis de redes en reposo**

Referimos al lector al apartado Conectividad funcional (fc) para profundizar en el tratamiento de las redes en reposo basado en regiones de interés.

Mediciones de teoría de grafos

Varias mediciones relacionadas con la teoría de grafos se calcularon para evaluar el impacto potencial de la calcificación de la carótida en las propiedades topológicas de las redes cerebrales. A pesar de que estas mediciones no proporcionan información específica sobre el funcionamiento, sí proveen indicadores de cambios en las redes que pueden ocurrir con la rigidez arterial. El cerebro se modeló como un grafo donde los nodos (N) se asociaron a ROI y los bordes (K) se asociaron con la amplitud de la conectividad funcional $z(r)$ entre estas regiones (Latora y Marchiori, 2001). Después de calcular la matriz de conectividad región a región, se aplicó un umbral para definir la matriz de adyacencia que caracteriza el grafo G . Se eligió un umbral de costo de 0.3 a fin de que la red tuviera propiedades de mundo pequeño, características de las redes funcionales en el cerebro (Achard y Bullmore, 2007; Bassett y Bullmore, 2006).

Se investigaron varias propiedades de la organización cerebral indirectamente a través de las mediciones de grafos a nivel de nodo (Bassett y Bullmore, 2006; Whitfield-Gabrieli y Nieto-Castanon, 2012): 1) el grado, $k_n(G)$, definido como el número de bordes que se conectan a un cierto nodo n ; 2) el costo $C_n(G)$, definido como la proporción de vecinos conectados a un cierto nodo; 3) la longitud de camino promedio $L_n(G)$ que se define como el promedio de los caminos más cortos del nodo n al resto de los nodos del grafo; 4) la eficiencia global $E_n^{local}(G)$, la cual es el promedio del inverso de la distancia más corta de la región n hacia los otros vértices del grafo; 5) el coeficiente de agrupamiento $CC_n(G)$, definido como la probabilidad de que los vecinos de este nodo también estén conectados entre sí; 6) la eficiencia local $E_n^{local}(G)$, definida como el promedio de la eficiencia global entre todos los vecinos del vértice n . Finalmente, 7) el grado de intermediación $CB_n(G)$ de un nodo n en particular es la proporción de todos los caminos más cortos en una red que pase por dicho nodo.

A través del promediado de las medidas a nivel de nodo se generan medidas que reflejan la integración total dentro de la red. Estas medidas, en resumen se ingresaron a un modelo lineal general de segundo nivel para comparar patrones de fc entre el grupo control (NaCl) y el

grupo CaCl_2 . La relevancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student no apareada ($p < 0.05$) con corrección FDR. Todas las medidas de teoría de grafos se ejecutaron mediante el paquete de programas CONN (Whitfield-Gabrieli y Nieto-Castanon, 2012).

RESULTADOS

Durante las inspecciones diarias del periodo posoperatorio no se observaron signos de infección, pérdida de peso o incomodidad. Dos animales del grupo CaCl_2 fallecieron antes de la sesión de imagenología, debido -posiblemente- a un posicionamiento incorrecto del tubo de traqueotomía, lo que impidió una respiración normal. Otro animal del mismo grupo no se incluyó en el análisis debido a datos de pobre calidad causados por saturación no deseada fuera de la región de interés, lo que ocasionó que una línea completa de la cámara CCD se saturara. La muestra final usada para todo el análisis fue de $N=9$ para el grupo CaCl_2 y de $N=11$ para el grupo NaCl (control).

► Conectividad funcional basada en regiones de interés

Los mapas de correlación HbO_2 promediados para ambos grupos se muestran en la figura 30 del apéndice II. Las dos primeras columnas pertenecen al grupo control (NaCl), mientras que las últimas dos pertenecen al grupo CaCl_2 . Cada fila contiene los mapas generados de una ROI situada en una región cortical en particular, primero se muestra la ROI localizada en el hemisferio izquierdo y después su homólogo contralateral. El grupo CaCl_2 mostró una extensión espacial mayor de píxeles correlacionados positivamente, respecto al grupo NaCl ($\text{CaCl}_2 = 7.6\% \pm 3.6\%$ vs. $\text{NaCl} = 5.14\% \pm 1.63\%$, $p=0.0278$) donde se definió la extensión espacial como el porcentaje de píxeles que mostraron un coeficiente de correlación mayor que 0.5. Los mapas representativos de fc para otros contrastes no son mostrados, al ser sumamente similares al de HbO_2 .

Los mapas con contraste HbO_2 de la figura 31A en el apéndice II mostraron -principalmente- cambios no significativos de correlación bilateral funcional $z(r)$ de los ratones CaCl_2 comparados a los controles. Se vio una disminución en las regiones frontal, motriz y retrosplenial, y se observó un aumento en las zonas cíngulo, somatosensorial y visual. Los datos de HbR (figura 31B en el apéndice II) muestran una disminución de $z(r)$ en todas las regiones excepto en la corteza visual donde se incrementó, aunque de manera no significativa. Los datos de CBF (figura 31C en el apéndice II) muestran en general valores más pequeños de $z(r)$ en todas las regiones corticales. Esto podría explicarse por una mayor varianza en los datos CBF asociada con una adquisición más ruidosa de la señal de granularidad. Con este contraste las regiones que mostraron una menor $z(r)$ en los ratones CaCl_2 fueron la motriz, el cíngulo y la somatosensorial. Las regiones corticales frontal, retrosplenial y visual tuvieron una $z(r)$ ligeramente mayor en el grupo CaCl_2 , respecto a los ratones NaCl . Los datos CMRO_2 (figura 31D en el apéndice II) mostraron una tendencia de $z(r)$ disminuida en los ratones que se sometieron al procedimiento CaCl_2 , excepto en la corteza frontal. La conectividad mostró una tendencia decreciente en las regiones motriz ($p=0.1241$) y cíngulo ($p=0.1241$).

A fin de explorar a profundidad la robustez de la conectividad bilateral observada, se corrió un segundo análisis, donde se excluyeron los datos que se alejaron más de 3 desviaciones estándar de la media (Pukelsheim, 1994). Los resultados obtenidos después de remover estos casos aparte, resultaron muy similares a lo obtenido con el conjunto completo de datos, siguiendo las mismas tendencias y por consiguiente no se muestran aquí.

► Mediciones de teoría de grafos

En las mediciones de HbO_2 , se encontraron diferencias significativas para las mediciones globales a nivel de red, tanto en el grado de intermediación, como en la longitud de camino promedio, los cuales resultaron más elevados para el grupo NaCl . Al observar las propiedades topológicas de cada región se encontraron diferencias (aunque no sig-

Tabla 6.1. Resumen de los resultados significativos del análisis de segundo nivel empleando mediciones de teoría de grafos.

	A nivel de ROI				A nivel de red			
	HbO ₂	HbR	CBF	CMRO ₂	HbO ₂	HbR	CBF	CMRO ₂
<i>E_n^{global}(G)</i>	M _R		M_L†, F_L, M_R		<i>E^{global}(G)</i>		*	
<i>E_n^{local}(G)</i>	F _R		<i>M_R, R_L, V_R</i>		<i>E^{local}(G)</i>		*	
<i>CB_n(G)</i>	M _L		<i>M_R*</i>		<i>CB(G)</i>	*	*	
<i>C_n(G)</i>		M _L		C _L	<i>C(G)</i>			
<i>L_n(G)</i>	<i>S_R, S_L, F_R, F_L, C_L</i>	S_L	F_R, V_R		<i>L(G)</i>	*	*	
<i>CC_n(G)</i>	F _R		M_R†, R_L, V_R		<i>CC(G)</i>		*	
<i>k_n(G)</i>		M _L		C _L	<i>k(G)</i>			

†Incremento en el grupo CaCl₂ con respecto al grupo NaCl se muestra en negritas, mientras que un decremento se muestra en itálicas. Las negritas y un † indican valores p corregidos a un nivel de relevancia de 0.05. Mediciones: eficiencia global *E_n^{global}(G)*, eficiencia local *E_n^{local}(G)*, el grado de intermediación *CB_n(G)*, costo *C_n(G)* *C_n(G)*, longitud de camino promedio *L_n(G)*, coeficiente de agrupamiento *CC_n(G)* y grafo *k_n(G)*. Abreviaturas: F: corteza frontal, M: corteza motriz, C: corteza cíngulo, S: corteza somatosensorial R: corteza retrosplenial, V: corteza visual, los subíndices indican (L) región izquierda, (R) región derecha.

nificativas al corregirse para FDR) en las eficiencias global y local, así como en el grado de intermediación, la longitud de camino promedio y el coeficiente de agrupamiento.

A nivel de red no hubo diferencias significativas en las mediciones de HbR, pero a nivel de ROI la región motriz izquierda mostró diferencias significativas (aunque no corregidas para FDR) en costo y grado. También la región izquierda somatosensorial mostró un incremento en la longitud de camino promedio.

Los análisis de grafos basados en datos de CBF mostraron un aumento significativo de la eficiencia global, el grado de intermediación la longitud de camino promedio; se encontraron disminuciones significativas en la eficiencia local y en el coeficiente de agrupamiento. A nivel de región hubo un aumento significativo en el grado de inter-

mediación y en el coeficiente de agrupamiento para la región motriz izquierda. Se encontraron algunas diferencias a nivel de región, aunque no significativas después de corrección FDR en la eficiencia, tanto global, como local, longitud de camino promedio y el coeficiente de agrupamiento.

Al usar estimados de $CMRO_2$ se encontraron incrementos significativos en agrupamiento y grado (aunque sin corrección FDR) en la región cíngulo izquierdo; aunque no se encontraron diferencias con $CMRO_2$ a nivel de red.

Los resultados discutidos arriba se basaron en redes binarias. Extendiendo estos resultados la figura 32 del apéndice II reporta resultados para redes ponderadas, mostrando la intensidad promedio de las conexiones para ambos grupos, donde el tamaño de los nodos reflejan el grado de intermediación $CB_n(G)$, una medida de la importancia relativa de cada región en la red. Hay pocos cambios evidentes en la conectividad en general que pueden inferirse de las redes de hemoglobina y CBF por sí solas. Los cambios de conectividad en $CMRO_2$ son, empero, más evidentes: hay un gran número de nodos anticorrelacionados en el grupo $CaCl_2$ y también una gran cantidad de nodos que sobrevivieron el umbral aplicado. Los datos de $CMRO_2$ también muestran más nodos anticorrelacionados en el grupo $CaCl_2$ al compararse con el grupo control.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la rigidez unilateral de la carótida en las RSN de ratones bajo anestesia. Mientras que un creciente número de estudios sugieren que la rigidez arterial es un factor de riesgo predictivo de déficits cognitivos con la edad, sigue siendo un reto evaluar su rol en la modulación de la hemodinámica funcional, sobre todo por una falta de modelo animal que aisle estos efectos. El flujo sanguíneo que viene de la carótida alimenta el círculo de Willis y representa típicamente el 70% de la perfusión total en el cerebro. Entre las regiones selectas para nuestro análisis, esperamos que la corteza occipital (visual) así también como parte de las cortezas temporal

y parietal, reciban un flujo disminuido de la carótida en comparación con otras regiones.

► Cambios hemodinámicos

Los cambios observados en la extensión espacial de los mapas de correlación reflejan una reorganización de la conectividad funcional derivada de mediciones hemodinámicas en la corteza. Para regiones individuales se observaron áreas significativamente mayores de fluctuaciones hemodinámicas coherentes contralaterales para el grupo CaCl_2 . Podemos especular que este mecanismo se origina en la respuesta fisiológica a la pulsatilidad originada por la rigidez de la alimentación al círculo de Willis, lo que potencialmente induce una respuesta global de las arterias de resistencia. En otro estudio (Sadekova *et al.*, 2013) se observaron cambios en la dilatación mediada por el flujo y en el tono miogénico en arterias aisladas y presurizadas, sujetas a diferentes niveles de pulsatilidad, apoyando este mecanismo como un modulador vascular de cambios en la conectividad independientes del metabolismo.

Al enfocarnos en la localización de la región y la amplitud de las correlaciones en lugar de su extensión espacial, encontramos que los resultados de las mediciones de HbO_2 , HbR y CBF reflejan que, en comparación con el grupo NaCl , los ratones CaCl_2 tienen valores de correlación bilateral menores en la corteza motriz, pero mayores en la corteza visual. En otras regiones, dependiendo del componente hemodinámico y la localización espacial, hay cambios de correlación bilateral en ambas direcciones (aumento y decremento) lo que sugiere interacciones entre diferentes sistemas hemodinámicos cuando se manipula el flujo sanguíneo de manera unilateral y una pérdida de sincronía neuronal debido a la degeneración en el hipocampo, previamente descrita, que este modelo exhibe. Los resultados generales de evaluar la sincronía bilateral destacan la importancia de interpretar cuidadosamente los resultados de una sola señal hemodinámica como medición indirecta de cambios neuronales, sobre todo en situaciones donde el suministro de sangre se ve afectado.

► CMRO₂

Entre los cambios importantes, los cambios de fc del CMRO₂ no siempre correspondieron a los cambios observados en otros contrastes. De hecho, cuando observamos las correlaciones homólogas, los resultados de CMRO₂ fueron diferentes en 50% de los casos analizados, respecto a los cambios en CBF, HbO₂ y HbR. El CMRO₂ mostró una tendencia decreciente en la fc del grupo CaCl₂ que resultó más evidente en las regiones motriz y cíngulo. Ya que el CMRO₂ tiene el potencial para mostrar una independencia de los cambios vasculares y proporcionar una medición metabólica que se espera sea muy cercana a la actividad neural, los cambios observados pueden reflejar de mejor manera la degeneración neuronal en el hipocampo que se presenta en este modelo. Al usar $fcOIS$ basada únicamente en la absorción de la hemoglobina no podríamos diferenciar la respuesta vascular de la actividad metabólica subyacente, de ahí la necesidad de un conjunto más completo de parámetros hemodinámicos. Estos resultados apoyan la idea de que hay que tener cuidado cuando se interpretan estudios de conectividad funcional con técnicas basadas sólo en la hemodinámica.

► Mediciones de teoría de grafos

Concentrándonos a nivel de ROI, la rigidez de la RCCA tuvo un impacto mayor en la corteza frontal derecha, tanto en mediciones de HbO₂, como en las de CBF. La eficiencia local y el coeficiente de agrupamiento, ambas medidas de la robustez de la red, son considerablemente mayores en el grupo NaCl, indicando en potencia la pérdida de eficiencia de la red debido a la aplicación de CaCl₂. Esta disminución en el promedio de toda la corteza del coeficiente de agrupamiento puede interpretarse como un reflejo de la aleatorización de las redes funcionales debido a la rigidez arterial; esta aleatorización es particularmente notable en la corteza motriz derecha. El grado de intermediación se encontró que era mayor en el grupo CaCl₂, lo cual sugiere que se desarrolló un papel más centralizado de esa región en la estructura general de la red. Las diferencias no significativas en costo y grado en la región cortical mo-

triz izquierda (en HbR) sugieren que este nodo se desconectó de la red global, con menos vecinos en el grupo CaCl_2 . El costo y el grado también se redujeron en el cíngulo izquierdo bajo mediciones de CMRO_2 , pero estos cambios no se vieron reflejados a nivel global.

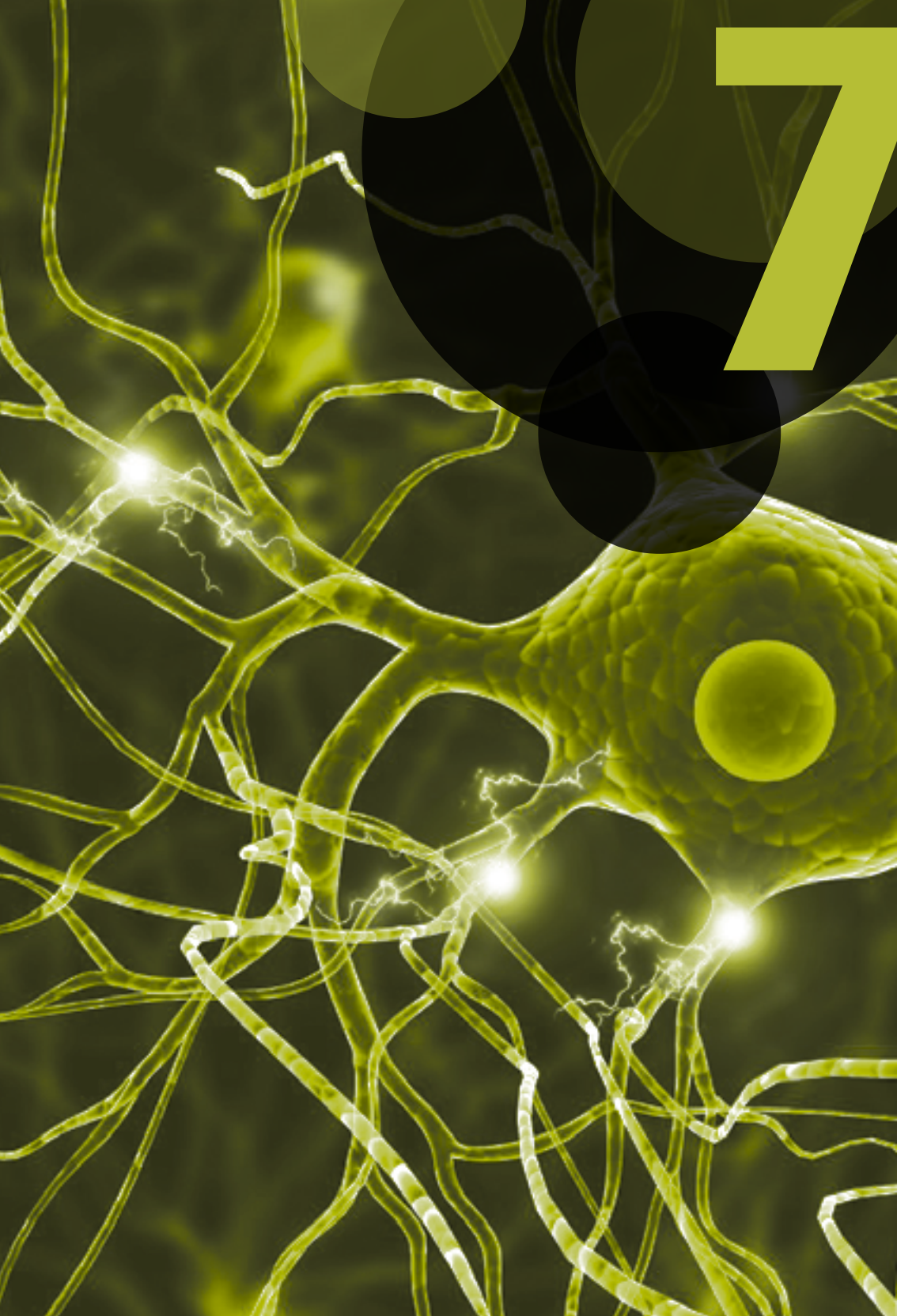
La inspección visual de las redes funcionales ponderadas (figura 32 en el apéndice II) indican una reorganización de las redes de CMRO_2 , pero debido a la falta de una formulación única para medidas basadas en redes ponderadas (Saramäki *et al.* 2007) su caracterización plena sigue siendo compleja.

► Impacto para BOLD-fMRI

La cartografía de redes en reposo constituye un enfoque único para evaluar el funcionamiento del cerebro en poblaciones de pacientes donde hacer fMRI, basada en tareas, es todo un reto. La señal BOLD-fMRI se origina de las propiedades magnéticas de HbR, depende del volumen sanguíneo flujo y desoxigenación locales, y está sesgada hacia la vascularización de tipo venoso. Nuestros resultados muestran que las investigaciones de conectividad de redes basadas únicamente en señales de HbR, en efecto, muestran una disminución de conectividad entre regiones homólogas, pero estos cambios no fueron significativos, y resultaron más débiles y sólo parcialmente coherentes con las observaciones empleando CMRO_2 . A nivel global, las señales de HbR mostraron cambios pequeños en comparación con los de CBF y CMRO_2 . En general, estos resultados sugieren que la señal BOLD-fMRI puede estar potencialmente modulada por la rigidez de la vascularización arterial y se puede ver beneficiada al realizarse mediciones calibradas y basadas en el flujo sanguíneo, aplicadas a estudios que investigan las RSN en poblaciones afectadas por la rigidez arterial.

CONCLUSIÓN

Al usar un nuevo modelo roedor de calcificación de la carótida, pudimos investigar por primera vez el efecto aislado de la rigidez arterial unilateral en las redes en reposo. Es difícil hacer una comparación directa de nuestros resultados con enfermedades en humanos o incluso con otros modelos animales, ya que nuestro modelo es específico para el estudio de la rigidez de la carótida, independientemente de otras variables, como cambios sistémicos en la presión sanguínea, altos niveles de lípidos en circulación que están presentes en otros modelos; u otros factores que conducen a la rigidez arterial en humanos como el envejecimiento o la arterosclerosis. Al usar fcOIS multi-espectral, nuestros resultados muestran modificaciones en las redes asociadas con un potencial desacople entre las diferentes medidas hemodinámicas (HbO_2 , HbR y CBF) y el metabolismo ($CMRO_2$). Aunque quedan factores de confusión debido al hecho de que el procedimiento produce degeneración neural en el hipocampo y también alteraciones vasculares laterales debido a la rigidez inducida en la carótida, ambos efectos alteran las RSNs, nuestros resultados resaltan la importancia de calibrar las imágenes cerebrales cuando hay un remodelado arterial.



Imágenes de una lesión inflamatoria en el cerebro neonato de la rata usando tomografía fotoacústica

En este capítulo se describe la aplicación de la PAT para evaluar la saturación de oxígeno (SO_2) y los cambios de conectividad en el cerebro neonatal de la rata, usando un modelo de lesión de materia blanca. La reducción en SO_2 medida *in vivo* se puede explicar parcialmente por la evaluación histológica de la microvascularización. No hubo diferencias en la conectividad funcional homóloga en el grupo lesionado, en comparación con los controles, este resultado puede explicarse por el corto periodo transcurrido entre la lesión y la toma de imágenes. (Guevara *et al.*, 2013).

La leucomalacia periventricular (PVL) es una de las causas predominantes de parálisis cerebral y de déficit del desarrollo neurológico en infantes prematuros (Blumenthal, 2004). El mecanismo fisiopatológico principal se creía que era debido a la inestabilidad hemodinámica de la circulación cerebral pasiva, lo que debilitaba las áreas de materia blanca, compuestas de pre-oligodendrocitos altamente vulnerables a los radicales libres (Blumenthal, 2004). Estudios recientes han mostrado una asociación entre la inflamación y la lesión de materia blanca (Dammann *et al.*, 2002; Dammann y Leviton, 2004; Haggberg *et al.*, 2005). Aun así, no queda del todo claro si la inflamación induce cambios hemodinámicos en la materia blanca en desarrollo. Una dosis intravenosa de lipopolisacáridos (LPS) suficiente para causar hipotensión también afectó el suministro de O_2 a la materia blanca (Dalitz *et al.*, 2003). No obstante, un experimento conducido en ovejas fetales mostró que dosis pequeñas de LPS no eran suficientes para producir hipoxemia ni hipotensión sistémica, pero podían disparar

lesiones significativas en la materia blanca (Duncan *et al.*, 2006). A la fecha, se sabe poco sobre los cambios locales en el aporte de oxígeno cuando existe inflamación inducida por LPS. En los roedores, uno de los modelos posnatales más robustos y reproducibles consiste en efectuar una inyección de LPS en el cuerpo calloso. Puede replicar todos los aspectos de la PVL incluyendo astrocitosis, reacción microglial, pérdida celular preoligodendrocito, necrosis, apoptosis, hipomielinación (Cai *et al.*, 2003; Pang *et al.*, 2003), atrofia hipocampal (Wang *et al.*, 2013) y los marcadores de comportamiento de la PVL (Choi *et al.*, 2011). Una reciente caracterización del modelo mediante MRI mostró claras similitudes entre lo que se ve en infantes prematuros con dicha lesión, como una disminución del coeficiente de difusión aparente en la materia blanca, aumento de la constante de tiempo de relajación de T₂, dilatación ventricular medible e incremento en la capacidad de difusión radial (Lodygensky *et al.*, 2010).

Los cambios regionales que se observan en la lesión de materia blanca en infantes prematuros se han descrito mediante NIRS. Esta técnica bien establecida y portátil se ve limitada por la ausencia información a profundidad, donde por ejemplo, la presencia de un hematoma subdural o un edema puede conducir a resultados erróneos. Además, la técnica no puede diferenciar la corteza de la materia blanca o la saturación extraída de la circulación venosa. Aunque se puede obtener información parcial en profundidad utilizando métodos de reconstrucción tomográficos (Boas *et al.*, 2001; O'Leary *et al.*, 1995), éstos tienen sus limitaciones. La imagenología fotoacústica es una técnica sensible a la profundidad, no invasiva que combina el contraste intrínseco de la óptica con la ventaja de la alta resolución del ultrasonido (Wang y Hu, 2012; Xiang *et al.*, 2012). Al iluminar el tejido usando un láser de pulso corto, ocurre una expansión termoelástica transitoria, generando una onda de presión ultrasónica, que puede ser detectada por un transductor (Wang *et al.*, 2003). Al usar más de una longitud de onda y la información espectroscópica de la hemoglobina, posee el potencial para determinar la saturación de oxígeno regional. En cachorros de ratón, datos recientes muestran que sólo 24 horas de lesión hipóxica isquémica fueron suficientes para inducir un 40% de reducción

en la densidad cerebro-vascular (Honoré *et al.*, 2013). En este estudio, se buscaron evaluar cambios en la saturación de oxígenos local 24 horas después de someterlos a LPS, al máximo de la lesión inflamatoria, y determinar si alguno de los cambios detectados *in vivo* estaría correlacionado con una modificación del esqueleto microvascular de la corteza y la materia blanca.

Múltiples estudios de imagenología funcional en el cerebro en desarrollo han tenido éxito en la identificación de una respuesta fisiológica a tareas externas (Born *et al.*, 2000; Born *et al.*, 1998; Seghier *et al.*, 2006). A pesar del éxito de este enfoque que requiere una preparación compleja, la atención se ha centrado a la cartografía cerebral en condiciones de reposo (Smyser *et al.*, 2011), un enfoque más adecuado en neonatos, donde los estudios fMRI basados en tareas son todo un reto. La resonancia magnética en estado de reposo (rsMRI) simplifica el diseño experimental, consiguiendo así que los estudios longitudinales sean factibles en los infantes (Doria *et al.*, 2010; Smyser *et al.*, 2010, 2011).

Desde el descubrimiento de que las áreas espacialmente remotas están conectadas en el dominio temporal a través de fluctuaciones espontáneas de baja frecuencia en la señal BOLD (<0.1 Hz) (Biswal *et al.*, 1995), se han llevado a cabo varios estudios en estado de reposo en los infantes (Church *et al.*, 2009; Damaraju *et al.*, 2010; Doria *et al.*, 2010; Fransson *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Smyser *et al.*, 2010); aunque los infantes que presentaban PVL se excluyeron de estos estudios (Damaraju *et al.*, 2010; Fransson *et al.*, 2007). Recientemente, Smyser *et al.*, han caracterizado el dramático efecto de la lesión de materia blanca en infante prematuro mediante estudios en estado de reposo (Smyser *et al.*, 2013). Así, la detección temprana de los cambios de conectividad funcional inducidos por la PVL podrían convertirse en una herramienta no invasiva para monitorear recién nacidos en riesgo e identificar eventualmente aquellos que requieran terapia neuroprotectora. Aun así, llevar a cabo mediciones de MRI en infantes prematuros inestables, es complicado. La posibilidad de tener datos sensibles a la profundidad en conectividad funcional sería inmensamente útil, por ello exploramos el potencial de la imagenología fotoacústica para detectar conectividad funcional.

El objetivo de esta aplicación fue determinar el impacto de la inflamación en el cuerpo calloso y en la corteza, ambos afectados por la inflamación. Además se exploró la posibilidad de evaluar la fc utilizando PAT en cachorros inmaduros de rata.

MATERIALES Y MÉTODOS

► Declaración ética

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron conforme a las recomendaciones del consejo canadiense de cuidado animal, también fueron aprobados por el comité de ética en investigación animal del Instituto de Cardiología de Montreal y por el comité institucional para el cuidado animal en la investigación en el centro de investigación del CHU Sainte-Justine. Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo anestesia de isoflurano y se realizó el mayor esfuerzo para minimizar el sufrimiento.

► Lesión inflamatoria neonatal

En este estudio se usaron 19 cachorros de rata Sprague-Dawley de 3 días de nacido (P3) provenientes de cuatro camadas (9.8 ± 0.3 g de peso, Charles River, Wilmington, MA); a los cachorros se les dio agua y comida *ad libitum*. Los cachorros P3 equivale a infantes muy jóvenes de entre 24 y 28 semanas de gestación (Sizonenko *et al.*, 2003). En este trabajo se siguió el mismo procedimiento de estudios anteriores (Lodygensky *et al.*, 2010) el cual fue diseñado por el grupo de Cai (Cai *et al.*, 2003; Pang *et al.*, 2003) y se describe brevemente más adelante.

Los cachorros P3 ($n=19$) se separaron aleatoriamente en dos grupos: el LPS ($n=11$; $n_{machos}=6$, $n_{hembras}=5$) y el grupo NaCl (control simulado $n=8$; $n_{machos}=7$, $n_{hembras}=1$). A los cachorros se les aplicó una inyección guiada por ultrasonido utilizando el sistema de micro-ultrasonido Vevo LAZR (FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, ON, Canadá) ya sea con LPS en suspensión (1 mg/kg, E. Coli, serotipo 055:B5, Sigma St Louis, MO) en 0.5 μ L de salina estéril o con el mismo volumen de salina estéril para el

grupo control simulado. La inyección se aplicó en el cuerpo calloso a nivel equivalente de P-7, c9 (Ramachandra y Subramanian, 2011), ilustrado en la figura 33A en el apéndice II. Las inyecciones se realizaron mediante una micro-pipeta montada en un inyector controlado por microprocesador (Micro4 de World Precision Instruments) a una tasa de 100nL/min. Todas las inyecciones se llevaron a cabo bajo anestesia de isoflurano, y se hizo todo el esfuerzo posible para minimizar el sufrimiento. Todos los animales sobrevivieron a la inyección. 24 horas más tarde se tomaron imágenes como se describe en la siguiente subsección.

► Imagenología PAT

Los cachorros se aseguraron en un montaje esterotáctico neonatal, diseñado personalmente y colocado en la estación de imagenología; se monitorearon, tanto la respiración, como la temperatura con el sistema 1025L (SA Instruments Inc., Stony Brook, NY). El sistema de imagenología fotoacústica Vevo LAZR se empleó para adquirir todas las imágenes con un transductor ultrasónico LZ250 a una frecuencia central de 21 MHz. El barrido-B tardó 1.4 s por cuadro con un FOV de 13 mm de ancho × 18 mm de profundidad (512 líneas-A, 416 muestras) usando un arreglo de 256 elementos con una resolución axial de 75 μm. Una secuencia de barridos-B se adquirió durante un periodo de 5 minutos. La imagenología fotoacústica funcional se llevó a cabo en dos longitudes de onda ($\lambda_1=750$ nm y $\lambda_2=850$ nm) con una energía de pulso de aproximadamente 18 mJ/cm². Las imágenes de hemoglobina total (HbT) y de saturación de oxígeno (SO₂) se calcularon internamente a partir de los datos brutos de acuerdo al procedimiento descrito en detalle en las referencias (Ephrat *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2006):

$$HbT = \frac{\mu_a(\lambda_1)\Delta\epsilon_{HbR}(\lambda_2) - \mu_a(\lambda_2)\Delta\epsilon_{HbR}(\lambda_1)}{\epsilon_{HbR}(\lambda_1)\epsilon_{HbO_2}(\lambda_2) - \epsilon_{HbR}(\lambda_2)\epsilon_{HbO_2}(\lambda_1)} \quad (7.1)$$

$$SO_2 = \frac{\mu_a(\lambda_2)\epsilon_{HbR}(\lambda_1) - \mu_a(\lambda_1)\epsilon_{HbR}(\lambda_2)}{\mu_a(\lambda_1)\Delta\epsilon_{HbR}(\lambda_2) - \mu_a(\lambda_2)\Delta\epsilon_{HbR}(\lambda_1)} \quad (7.2)$$

Donde μ_a es el coeficiente de absorción estimado (cm^{-1}); ϵ_{HbO_2} y ϵ_{HbR} son los coeficientes de extinción molar ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) de la oxi- y desoxihemoglobina respectivamente; así $\Delta\epsilon_{HbR} = \epsilon_{HbO_2} - \epsilon_{HbR}$. Una vez que se estimaron los coeficientes de absorción efectivos, se calculan la HbT y la SO_2 . Los valores de oxi y desoxihemoglobina (HbO_2 y HbR respectivamente) se calcularon usando las siguientes ecuaciones:

$$\begin{cases} \text{HbO}_2 = \text{SO}_2 \text{HbT} \\ \text{HbR} = (1 - \text{SO}_2) \text{HbT} \end{cases} \quad (7.3)$$

Se grabó una sesión de cinco minutos por cada animal. La misma sesión se usó para calcular la saturación cortical local y la conectividad funcional. La saturación local cortical se calculó usando el promedio de los valores de SO_2 durante el estado de reposo después de remover los cuadros contaminados con excesivo movimiento (ver la técnica de limpieza más abajo). Los valores promedio de SO_2 se calcularon en un rectángulo de $1 \times 0.5 \text{ mm}^2$; la SO_2 en la corteza se calculó en una curva suave que circundó la región de interés, ya sea en la corteza izquierda o en la derecha como se muestra en la figura 71B.

► **Análisis de conectividad funcional basado en regiones de interés**

First, all functional images (PAT) within each scan were realigned to the first image to reduce the impact of motion artifacts. Images of each contrast were spatially smoothed with a Gaussian kernel of FWHM=0.2 mm. Imaging of the anatomy was performed by an ultrasonic B-scansimultaneously recorded, from which the region corresponding to brain was manually selected using a closed spline curve to create a brain mask. All further processing was performed only on those pixels belonging to the brain mask. The image time series were temporally band-pass filtered (zero phase-shift fourth-order Butterworth filter) at 0.009-0.08 Hz, according to previous functional connectivity studies (Guevara *et al.*, 2013; Jonckers *et al.*, 2011; White *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2008). In order to account for spurious variability, several nuisance variables were regressed from each pixel time course including (a)

The signal averaged over the lateral ventricles (LV), (b) the signal averaged over a region in the deep white matter and (c) three parameters obtained by rigid body motion correction (translation along X and Y axes and rotation around those same axes). Regression of the aforementioned parameters was performed simultaneously using a General Linear Model (GLM) from the package Statistical Parametrical Mapping (Friston *et al.*, 2006) (SPM8, www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm) running on a MATLAB (The MathWorks, Natick, MA) platform. In previous studies, the global brain signal, created from the average of all the pixels time traces, was found to introduce artificial anticorrelations (Murphy, Birn, Handwerker, Jones, & Bandettini, 2009), even though a neural basis for such anticorrelations is probable (Fox *et al.*, 2009), it was not included as a regressor in this study.

All seeds were placed *a priori* on the rat brain using anatomical definitions from the Ramachandra atlas with complementary information from the Paxinos atlas (Paxinos & Watson, 2007; Ramachandra & Subramanian, 2011), as shown on Figura 33B en el apéndice II. Seed time-courses were computed as the mean time course of the pixels within a 0.5 mm radius from the seed locus. Several seed radii were explored (from 0.1 to 0.5 mm), only limited by anatomical specificity; the largest radius was chosen because of stronger values in bilateral correlations.

► Limpieza

El movimiento durante la adquisición de imágenes influencia la calidad de los datos PAT. El movimiento de la cabeza causa cambios espurios en la intensidad de la señal fotoacústica. Después de realinear los cuadros y regresar los parámetros de movimiento, se aplicó una técnica de limpieza llamada en inglés *scrubbing* para remover aquellas mediciones distorsionadas por movimiento no deseado (Power *et al.*, 2012). La limpieza se basa en dos mediciones para etiquetar los cuadros contaminados por movimiento excesivo: desplazamiento cuadro a cuadro (FD) y DVARS (La D es por derivada temporal y VARS significa varianza RMS [media cuadrática] sobre los pixeles) (Smyser *et al.*, 2010).

La métrica FD representa el movimiento instantáneo de la cabeza y es una medida empírica calculada a partir de cuatro parámetros; en la ecuación (7.4) $\Delta d_{ix} = d_{ix} - d_{(i-1)x}$ representa la derivada de la traslación a lo largo del eje x, y de la misma manera para los otros parámetros de movimiento rígido; el desplazamiento rotacional $|\Delta\alpha_i|$ se convirtió de radianes a mm, calculando la longitud de arco en un círculo de radio 4.05 mm, la distancia media de la corteza al centro de la cabeza en ratas P4.

$$FD_i = |\Delta d_{ix}| + |\Delta d_{iy}| + |\Delta\alpha_i| \quad (7.4)$$

La otra métrica, DVARS se calculó el valor RMS de la derivada de la señal global; esta medición representa qué tanto ha cambiado la intensidad de una imagen del cerebro en comparación con el cuadro anterior.

$$DVARS(\Delta I)_i = \sqrt{\{[\Delta I_i(\bar{x})]^2\}} = \sqrt{\{[I_i(\bar{x}) - I_{i-1}(\bar{x})]^2\}} \quad (7.5)$$

En la ecuación (7.5) $I_i(x)$ representa la intensidad de la imagen en el pixel x del cuadro i. Se aplica un umbral a las medidas FD y DVARS, y aquellas imágenes por encima de dicho umbral se etiquetaron. Después de revisar cuidadosamente las imágenes de toda la población, se eligieron valores de $FD > 0.001\text{mm}$ y $DVARS > 3000$ para representar los niveles por encima de la norma de los cachorros que no presentaron movimiento. Además se requirió un mínimo de 80% cada sesión (~4 minutos) de datos PAT utilizables para ser incluidos en el análisis de grupo. Aquellos cuadros no etiquetados se concatenaron para efectuar el análisis de correlación bilateral. No se han encontrado efectos nocivos al usar datos funcionales discontinuos en estudios previos del estado en reposo (Power *et al.*, 2012; Van Dijk *et al.*, 2012).

Mediante la aplicación unilateral de LPS se investigaron diferencias interhemisféricas, así que la métrica para evaluar la conectividad funcional elegida fue la correlación bilateral funcional, definida como la correlación entre la trayectoria temporal de cada región de interés y su homólogo contralateral, generándose así seis valores para cada cachorro de rata. El coeficiente de correlación de Pearson r se convir-

tió al coeficiente de Fisher Z usando $Z(r)=\frac{1}{2} \ln [(1+r)/(1-r)]$ antes de llevar a cabo las inferencias a nivel de grupo.

► Histología

Los cerebros inyectados de LPS y de NaCl se fijaron después de la perfusión salina transcardíaca seguida de paraformaldehído al 4%. Los cerebros completos se conservaron en el mismo paraformaldehído a 4°C y se transfirieron a sacarosa al 30% 24 horas después. Finalmente se cortaron crio-secciones (50 μm) que se almacenaron en solución crio-protectora a -20°C.

► conteo de vasos sanguíneos

Se eligieron cuatro secciones consecutivas de cada cerebro, abarcando el sitio de inyección, para su tinción y análisis con lectina conjugada con isotiocianato de tetrarrodamina (TRITC) para caracterizar la microvascularización (Sirinyan *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2005). Las secciones se incubaron a temperatura ambiente en 1% Triton X-100/ Tampón fosfato salino (PBS) al 1% durante 30 minutos, seguido de una incubación de 2 horas con lectina conjugada con TRITC de *Griffonia simplicifolia* (1:100; Sigma-Aldrich). Las rebanadas del cerebro fueron sujetas a baños de 10 minutos con PBS y se montaron en láminas de microscopio. Las secciones se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia (20x, Leica DMR con cámara Qimaging de Retiga 1300), y el esqueleto microvascular se analizó con AngioTool (Zudaire *et al.*, 2011). Este enfoque se empleó en lugar de una cuantificación de la superficie vascular, ya que el espesor aparente de los vasos se modificó por la presencia de macrófagos y la tinción con lectina en los cerebros expuestos a los LPS. Un total de veintiocho imágenes se tomaron por cada cerebro para cubrir las tres regiones de interés (corteza izquierda, derecha y cuerpo calloso). Cada imagen se procesó individualmente y se analizó mediante AngioTool para calcular la longitud de esqueleto total y promedio en los microcapilares de las regiones de interés.

► Análisis estadístico

La relevancia estadística en las mediciones basadas en imagenología y en morfometría microvascular se evaluaron mediante el test de Wilcoxon-Mann-Whitney. Ya que estas mediciones de histología y de SO_2 local se efectuaron en unas cuantas regiones planeadas *a priori*, no se hizo la corrección para múltiples comparaciones, de acuerdo a recomendaciones de la literatura (Rothman, 1990; Saville, 1990). En cambio, para la conectividad basada en regiones de interés, si se aplicó un ajuste FDR (Benjamini y Hochberg, 1995). Los valores de p ajustados para FDR se consideraron significativos para un nivel de $p < 0.05$. A fin de determinar si el género fue un factor de confusión, se empleó el método de media- P exacta de Fisher (Thorvaldsen *et al.*, 2010). Todos los datos se presentan como la media \pm el error estándar de la media (SEM).

RESULTADOS

► Saturación cortical local

Después de eliminar cuatro animales por movimiento excesivo (estos animales no se incluyeron en la población descrita arriba) la SO_2 promedio se midió tanto en la corteza izquierda (unilateral la inyección LPS), el cuerpo calloso (cc) y en la corteza derecha. Un ejemplo de la imagen en contraste SO_2 se muestra en la figura 34A en el apéndice II para el grupo control simulado (NaCl) y en la figura 34B para el grupo LPS. Los valores de SO_2 medidos en el cuerpo calloso y en la corteza izquierda disminuyeron de manera significativa en los LPS, comparados con los controles simulados, como se ilustra mediante la figura 34C; de manera más específica, la SO_2 de la corteza izquierda cambió de 53.3% para el grupo NaCl contra 49.4% en los LPS ($p=0.0203$). En el cuerpo calloso, la SO_2 disminuyó de 50.1% para los NaCl hasta 40.4% en el grupo LPS ($p=0.0002$). La figura 34C también muestra diferencias de SO_2 no significativas ($p=0.2060$) en la corteza derecha (contralateral al sitio de inyección). La asociación entre género y valores medios de SO_2 no resultó de relevancia estadística ($p=0.1089$).

► Cuantificación microvascular

Analizamos los cambios en la longitud de los capilares en los cerebros de cachorro de rata posinyección LPS usando tinción por lectina debido a su sensibilidad para detectar la microvascularización (Zhu *et al.*, 2005). Encontramos que la longitud promedio de los microvasos en la corteza izquierda de los cerebros inyectados con LPS se vio reducida de manera significativa en comparación con los cerebros inyectados con salina ($p=0.0093$; figura 35 en el apéndice II). No encontramos diferencias estadísticas ni en la corteza derecha ni en el cuerpo calloso. Además la longitud promedio de los capilares en la corteza izquierda está correlacionada de manera positiva con los valores regionales de SO_2 mediados mediante imágenes PAT como se muestra en la figura 36 en el apéndice II.

► Conectividad basada en regiones de interés

Después del procedimiento de limpieza se eliminó un total de cuatro adquisiciones debido al movimiento excesivo; (los mismos animales se removieron de los cálculos de SO_2). Los resultados mostrados en la figura 37 en el apéndice II muestran que los valores de fc bilateral disminuyen conforme la ROI se aleja de la parte superior del cráneo. No hubo diferencia estadística entre ambos grupos para ningún contraste (SO_2 , HbT, HbO_2 y HbR) aunque algunos contrastes muestran una tendencia consistente de conectividad aumentada en el grupo LPS (HbT).

DISCUSIÓN

► Saturación cortical local

La SO_2 local de ambos grupos para el cuerpo calloso y la corteza ipsolateral a la inyección resultaron significativamente diferentes, siendo menor la del grupo lesionado en comparación con el grupo control simulado. Este resultado coincide con la saturación de oxígeno en el tejido cerebral de infantes prematuros con PVL transitoria (Verhagen *et*

al., 2009). A fin de entender si hay un sustrato anatómico para estos resultados, estudiamos el impacto de los LPS en la microvascularización y encontramos que sólo en la región cortical izquierda se redujo la longitud capilar promedio. Esta reducción en el promedio de la longitud puede explicarse por la fragmentación de la microvascularización, como posible resultado de la habilidad de esta endotoxina para dañar el endotelio vascular (Clawson *et al.*, 1966; Young *et al.*, 1983). Al evaluar el impacto de la inflamación en la corteza encontramos una correlación significativa entre las mediciones no invasivas de la PAT y las evaluaciones histológicas que explican el 30% de los cambios entre la rarefacción de los capilares y la reducción en la saturación. Este resultado sugiere que las mediciones de la SO_2 a escala mesoscópica, se explican sólo parcialmente por los cambios microscópicos. Esta reducción en la SO_2 , en particular en el cuerpo caloso, contribuye potencialmente a la lesión de materia blanca observada en este modelo, con apoptosis, necrosis, hipomielinación y pérdida de materia blanca (Cai *et al.*, 2003). El cuerpo caloso, que tuvo la reducción más significativa en saturación, no mostró cambios cuantificables en el contenido microvascular. Esto podría reflejar el efecto de los LPS en la resistencia vascular, que no se evalúa por la tinción de lectina. Esto resalta la importancia de incluir mediciones *in vivo* de cambios fisiológicos que la histología no puede siempre identificar.

Además, estos resultados soportan el uso de la PAT como una herramienta no invasiva para estudiar modelos animales de PVL; debido a su naturaleza no invasiva y libre de agentes de contraste, la PAT podría aplicarse a estudios longitudinales.

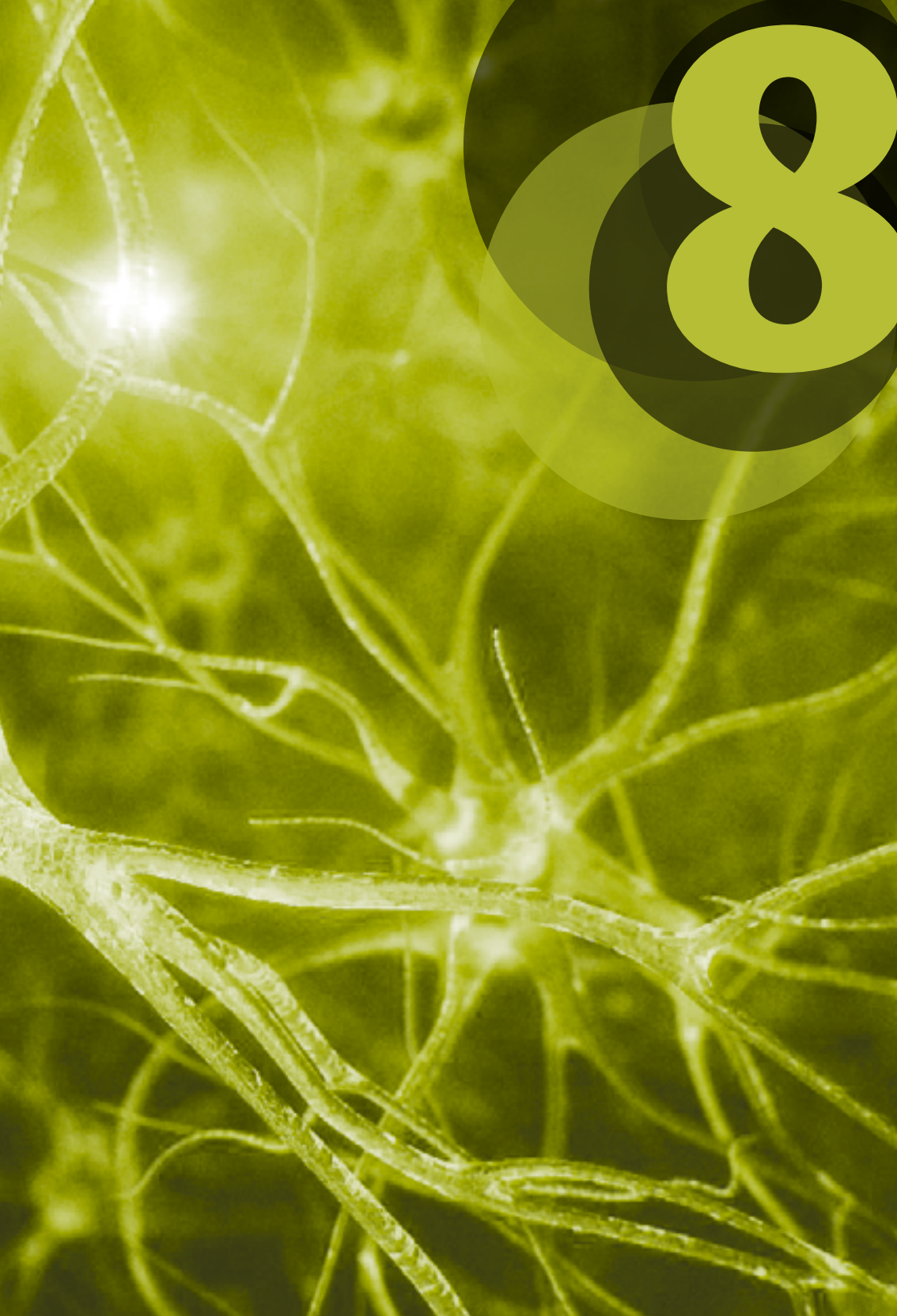
► Conectividad basada en regiones de interés

Al medir la conectividad bilateral, se encontró una fuerte correlación entre las ROI motrices y una menor correlación en las ROI S1 y S1BF cuyos valores medidos de correlación fueron similares a estudios anteriores (Kannurpatti *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008). Al comparar grupos, no se observaron diferencias significativas en la actividad en estado de reposo después de la aplicación de LPS. Esto podría explicarse por la

corta edad de los animales y el corto periodo entre la inyección LPS y la toma de imágenes PAT. Existen estudios previos que muestran la presencia de RSN en infantes prematuros (de 29 semanas de gestación) (Doria *et al.*, 2010), sin embargo, los valores de fc bilateral en las cortezas motriz y somatosensorial fueron más débiles y más variables en las primeras semanas. La marcada reducción de la actividad en reposo en infantes prematuros con lesión de materia blanca se describe en el trabajo de Smyser *et al.* (2013). Se sabe poco de las modificaciones agudizadas con la lesión en estos infantes. Nuestros resultados muestran que, a pesar de que se modifica la saturación de oxígeno con la lesión, en ambos hemisferios, al investigar la sincronía de fluctuaciones temporales, no se observó cambio alguno. Una hipótesis es que la reducción de la actividad en estado de reposo en esta población podría conducir a una amplia variabilidad de mediciones a nivel de población. Una segunda hipótesis, la cual se podría combinar con la primera, es que la SNR de la PAT no fue lo suficientemente alta para medir estas pequeñas fluctuaciones de manera homogénea a lo largo y ancho del cerebro. Ciertamente, encontramos una reducción en las correlaciones bilaterales en las ROI más alejadas de la parte superior del cráneo, lo que se atribuye a valores de SNR en regiones alejadas del transductor. Se cree que la evaluación de las RSN podría verse limitada en esas regiones por motivos técnicos. En un futuro trabajo, se podrían confirmar estos hallazgos con rsMRI o técnicas ópticas invasivas como la OIS en combinación con LSCI.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo exploratorio revelan valores de SO_2 menores en el grupo LPS, de manera más específica, valores reducidos en el cuerpo caloso y en la corteza izquierda, ipsilateral al lugar de la inyección. Nuestros hallazgos apoyan el uso de la PAT como una herramienta completamente no invasiva para la evaluación de los valores promedio de oxigenación *in vivo* en el cerebro neonato.



Discusión general

La conectividad funcional en el estado de reposo se ha empleado como herramienta de diagnóstico en investigación durante más de dos décadas; se ha llevado a cabo mediante una gran variedad de técnicas para la evaluación ya sea directa o indirecta de la actividad neural. Las numerosas ventajas empíricas y teóricas de esta modalidad la posicionan como una fuerte candidata para herramienta de diagnóstico. De ahí nuestra motivación para explorar la fc en un ambiente más controlado, como lo son los modelos roedores de condiciones neurológicas y cardiovasculares. No obstante, la fc no ha alcanzado el nivel de madurez para aplicarse de manera habitual a estudios clínicos, debido a varias razones.

En esta obra las fluctuaciones de señales hemodinámicas correlacionadas entre diversas regiones cerebrales se han interpretado como marcadores de fc. Los resultados aquí presentados sugieren que los patrones del estado de reposo tienen características espaciales que se asemejan de manera cualitativa a los patrones de activación y diversas zonas funcionales delineadas en la literatura (Fonoff *et al.*, 2009; Watson *et al.*, 2011). A pesar de que las grabaciones directas de actividad neural sugieren que esas oscilaciones surgen de la actividad neuronal subyacente, hay que tener presente varios factores de confusión, desde el ruido de los instrumentos hasta el movimiento y fluctuaciones de índole fisiológica. Estos resultados no implican que los patrones en estado de reposo sean de origen neuronal, ya que pudieran estar ligados a cambios locales de la fisiología, como la vascularización. Se

requerirían futuros estudios para caracterizar la influencia de los procesos fisiológicos en los hallazgos de fc.

APLICACIÓN DE LA FC A LA EPILEPSIA

En el estudio presentado en el capítulo 5 se usó un modelo animal de epilepsia para investigar si la actividad inducida altera la conectividad regional en reposo. Las crisis epilépticas se indujeron mediante la inyección unilateral de 4-AP en la corteza somatosensorial. Se utilizó una combinación de OIS y LSCI para monitorear la oxigenación cerebral y el flujo sanguíneo. Estas medidas se combinaron para investigar cambios en el metabolismo cerebral. En general esta metodología pretende ser un enfoque integral, ya que la combinación de dos técnicas ópticas para el estudio de las respuestas hemodinámicas y metabólicas en respuesta a la epilepsia, proporciona un panorama más completo que lo que se consigue con fMRI, la cual es primordialmente sensible a cambios en HbR.

Los resultados confirman que los cambios en la conectividad de HbO₂, HbR y CBF son bastante diferentes, sugiriendo así un posible desacople entre el metabolismo y la hemodinámica. Este hallazgo puede resultar de interés a la comunidad de neuroimagenología, considerando el creciente interés por utilizar rsfMRI en la investigación de la epilepsia.

► La conectividad regional bilateral se altera con la inyección de un agente epileptogénico local

La fc bilateral disminuyó en algunos contrastes y aumentó en otros, dependiendo de la región observada. Esta falta de consistencia puede explicarse en parte por los diversos factores de confusión, que no pueden descartarse del análisis. Primeramente, la variabilidad en la inyección de 4-AP: aunque el sitio se eligió cuidadosamente, hay una variabilidad inherente a la posición y profundidad exactas debido a que es un posicionamiento manual. Además la difusión del volumen inyectado varía debido a la tortuosidad del tejido cerebral en cada ra-

tón (Nicholson, 1985). Estas limitantes pueden servir de explicación al hecho de que solo cinco de los nueve ratones presentaron actividad de tipo epileptiforme.

Una segunda desventaja fue la heterogeneidad de los mapas de correlación, debida principalmente a la posición del electrodo de tungsteno. No obstante, este objeto extraño proporciona valiosa información acerca de la actividad neuronal subyacente, lo que nos permitió confirmar el tipo de actividad epileptiforme.

► Los cambios en fc se correlacionan con la duración de la crisis

Nuestra hipótesis sostenía que entre más durara la crisis, más se alteraría la conectividad. No se encontraron correlaciones fuertes ni en todas las regiones ni en todos los contrastes, debido a la gran variabilidad entre los animales y el número relativamente bajo (cinco de nueve) de animales que presentaron actividad clara de ataques. Sin embargo, dos de las seis regiones corticales exploradas mostraron una correlación significativa confirmando nuestra hipótesis: 1) la corteza somatosensorial, donde la fc disminuyó conforme la duración de la crisis, en el caso del contraste CBF y 2) la región retrosplenial, donde el decremento de fc también se correlacionó con la duración de la crisis, tanto en HbR, como en CBF. Los resultados en la corteza somatosensorial se explican principalmente por la inyección unilateral del agente epileptogénico precisamente en la zona izquierda de esta corteza. No obstante, la interpretación de los resultados en la región retrosplenial es complicada, debido a la proximidad del seno sagital a las ROIS, por lo que existe una gran contribución de los componentes vasculares a la medición.

APLICACIÓN DE LA FC A LA RIGIDEZ ARTERIAL

Este trabajo se incluye en el capítulo 6, cuyo objetivo fue usar métodos de fc para investigar los cambios de conectividad inducidos por un nuevo modelo roedor de rigidez arterial.

► Hay un desacople entre las mediciones hemodinámicas y la actividad metabólica en las correlaciones bilaterales funcionales

La falta de consistencia en los resultados sugiere un desacople entre las correlaciones bilaterales de HbO_2 , HbR , CBF y $CMRO_2$. En un trabajo previo (Sadekova *et al.*, 2013) se encontró que el lado del cerebro correspondiente a la arteria carótida calcificada mostró un incremento significativo en la pulsatilidad del flujo sanguíneo, después de la aplicación de $CaCl_2$. También se encontró evidencia de degeneración neuronal en el hipocampo. Por consiguiente, hay un componente vascular independiente del metabolismo y un declive neuronal localizado que potencialmente afectan la conectividad; ello puede explicar por qué diferentes contrastes van en diferentes direcciones.

► Las redes funcionales en estado de reposo derivadas de señales hemodinámicas se alteran después de la calcificación unilateral de la arteria carótida

La zona motriz ipsilateral a la arteria calcificada resultó afectada en mayor medida. En este nodo en particular, una medida de influencia, el grado de intermediación $CB_n(G)$ se incrementó en el grupo $CaCl_2$, mientras que una medida de segregación, el coeficiente de agrupamiento $CC_n(G)$ disminuyó. El incremento en la relativa importancia de este nodo puede explicarse por la pulsatilidad aumentada en la arteria media cerebral de ese mismo hemisferio. El cambio más evidente se presentó en las mediciones derivadas del $CMRO_2$, donde se encontra-

ron bordes negativos en el grupo CaCl_2 , a diferencia de las conexiones positivas del grupo control. Una pregunta que queda abierta es si esta alteración tiene un origen neural (degeneración en el hipocampo) o un origen vascular (pulsatilidad ipsilateral incrementada).

APLICACIÓN DE LA FC A LESIONES DE MATERIA BLANCA

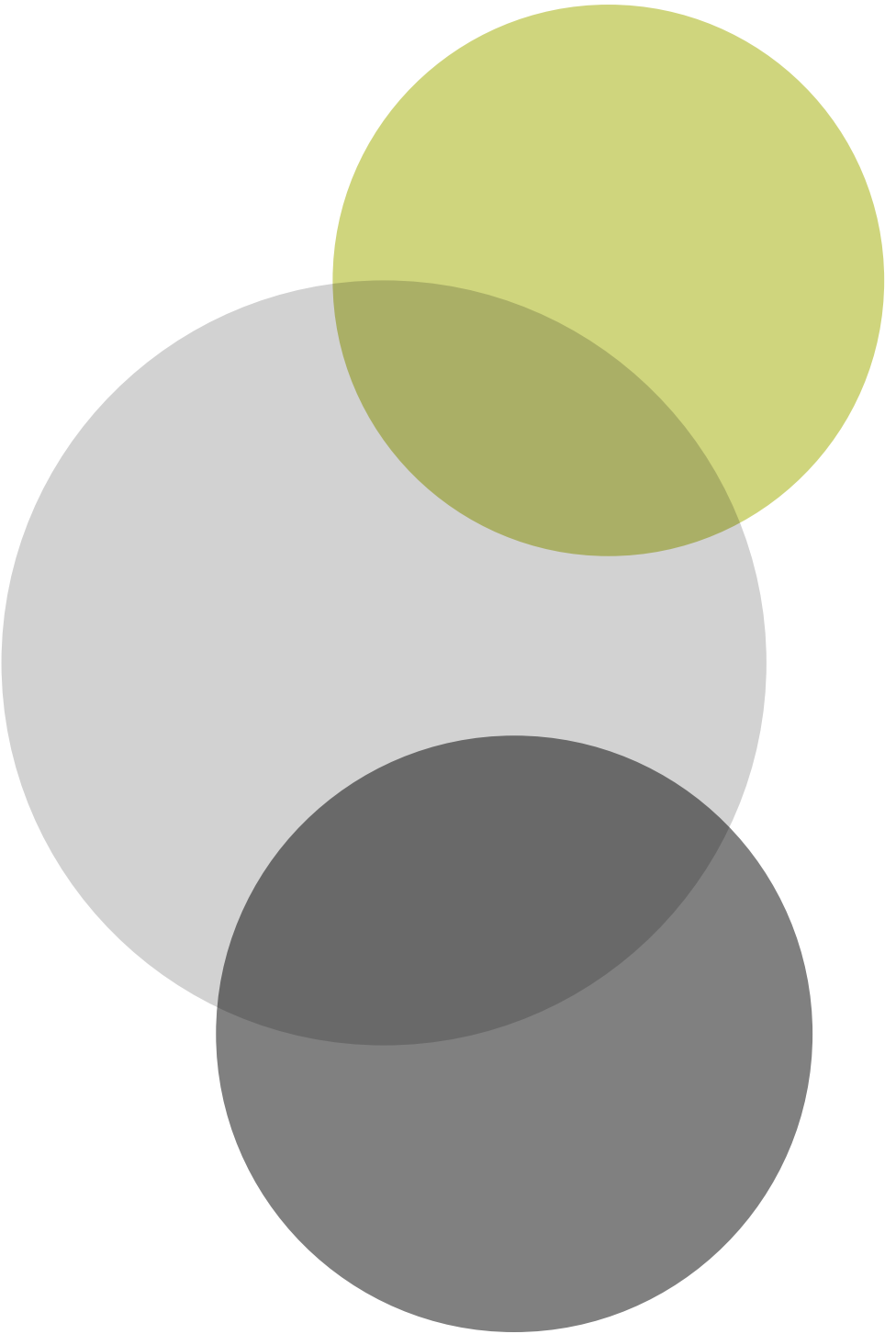
La última aplicación, presentada en el capítulo 7 pretendió usar la tomografía fotoacústica (PAT) en estado de reposo para evaluar el impacto de una lesión inflamatoria en el cerebro neonatal de la rata.

► Los valores locales de SO_2 son significativamente más bajos en el grupo lesionado, a comparación de los controles

La SO_2 en el tejido cerebral se decrementó de manera significativa en el cuerpo calloso (sitio de la inyección de LPS) y en la corteza izquierda (ipsilateral al *locus* de inyección), sin embargo esta reducción no se explicó plenamente con evidencia histológica. La inmuno química por lectina mostró vasos sanguíneos fragmentados sólo en la corteza izquierda, pero no en el cuerpo calloso. Este hallazgo puede apoyar la necesidad de tomar imágenes PAT como información complementaria a los análisis histológicos. Sin embargo, hay unos factores que podrían explicar la falta de consistencia. Primero, las diferencias espaciales entre las ROI analizadas *in vivo* y la porción de tejido examinada *ex vivo*; aún con marcadores anatómicos (como la posición de los ventrículos laterales) puede no haber una correspondencia exacta entre las rebanadas de tejido con las ROI, explicando así las discrepancias. Segundo, la pobre visualización del cuerpo calloso puede limitar esta técnica para cuantificar la microvascularización. Finalmente, ya que no todos los cerebros se procesaron para la histología, el menor tamaño de la muestra para análisis de lectina es otra clara limitante.

► La f_c bilateral disminuye de manera significativa con la leucomalacia periventricular

No se encontró diferencia alguna entre el grupo lesionado y el control simulado. Esto puede deberse a la ausencia de RSN en cachorros muy prematuros o a la presencia de RSN intactas aun en la ausencia del cuerpo calloso. El ruido del instrumento es, empero, una de las claras limitaciones de esta técnica. Aun después de remover diversos factores de confusión no se encontraron diferencias de conectividad entre ambos grupos. La gran cantidad de variación dentro del mismo grupo no permitió extraer resultados relevantes. El uso de la PAT como una tecnología no invasiva, sensible a la profundidad, se adapta mejor a la extracción de información promediada sobre grandes regiones de voxels con múltiples mediciones, para minimizar los efectos del ruido.



Conclusión y recomendaciones

En la presente obra se aplicaron diversas técnicas de conectividad funcional a través de la óptica para estudiar el efecto de las enfermedades en el cerebro en reposo. Los resultados obtenidos sugieren que existe una reorganización de las redes en reposo en modelos roedores de epilepsia y rigidez arterial; además, estos cambios no son consistentes en todos los contrastes, lo cual sugiere un potencial desacople de los parámetros hemodinámicos y la actividad metabólica. Finalmente, la conectividad funcional a través de la fotoacústica no se vio afectada por la presencia de una lesión en la sustancia blanca en el cerebro neonatal.

LIMITACIONES DE LAS APLICACIONES PROPUESTAS

▶ Frecuencia de muestreo de las imágenes

La remoción de factores de confusión fisiológicos solamente es posible mediante un periodo de muestreo suficientemente breve (Cordes *et al.*, 2001). En el ratón adulto, las componentes relacionadas con la frecuencia respiratoria (~ 2 Hz bajo anestesia de uretano) no aparecerán artificialmente debido a nuestra tasa de muestreo suficientemente alta ($f_s/2 = 2.5$ Hz). No obstante, las frecuencias cardíacas (8.3 - 10Hz) se replegarán en el rango de bajas frecuencias (Suckow *et al.*, 2001).

Respecto a la rata recién nacida, el ritmo cardíaco varía entre 4-6 Hz (Smotherman, Robinson, Ronca *et al.*, 1991) y la frecuencia respiratoria entre 2.5-2.8 Hz (Kroon *et al.*, 2011; Pendlebury *et al.*, 2008); debido a la baja frecuencia de muestreo ($f_s/2 = 0.45$ Hz) del sistema PAT, se espera que estas señales estén fuertemente replegadas en el espectro de bajas frecuencias.

Aun y con una frecuencia de adquisición adecuada, hay variaciones fisiológicas que no se pueden remover mediante el filtrado; tal es el caso de la concentración de CO_2 arterial y las variaciones de presión sanguínea, que ambas se encuentran en el mismo rango de frecuencia de las fluctuaciones en estado de reposo.

► Filtrado temporal

La elección de las frecuencias de corte del filtro pasa-banda (0.009-0.08 Hz) puede no resultar óptima para los modelos animales, aun y cuando se eligieron de la literatura existente en modelos roedores (Bero *et al.*, 2012; Guilfoyle *et al.*, 2013; Jonckers *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; White *et al.*, 2011). Sin embargo, las altas frecuencias no pueden considerarse como únicamente ruido; hay estudios recientes que muestran que hay información útil en estado de reposo a 0.2 o incluso a 0.5 Hz (Feinberg *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2013).

► Escala temporal

Las técnicas ópticas usadas para tomar imágenes de la covariación de la actividad hemodinámica en regiones distantes se enfocaron en variaciones lentas entre 12.5 y 111 segundos. De manera inversa, se acepta comúnmente que las oscilaciones electrofisiológicas pueden distinguirse en un rango de cinco décadas, de milisegundos hasta un segundo (Ganzetti y Mantini, 2013). Aunque se ha mostrado que la potencia del espectro gama está correlacionado con la señal hemodinámica reteniendo su coherencia espacial (He *et al.*, 2008). Un paso importante para un mejor entendimiento de las RDN funcionales es involucrar evidencia de estudios electrofisiológicos y hemodinámicos. Se ha

utilizado la imagenología multimodal para investigar correlatos entre las señales neuronales y hemodinámicas en el cerebro (He *et al.*, 2008; Nir *et al.*, 2008; Shmuel *et al.*, 2006).

► **Movimiento de la cabeza**

A pesar de que el movimiento en el ratón adulto está perfectamente restringido por el uso de un montaje estereotáctico en conjunto con la anestesia de uretano, no es el mismo caso para la rata recién nacida. Una anestesia ligera bajo isoflurano y un marco de fijación imperfecto permite los artefactos de movimiento. Cabe resaltar que la ausencia de dientes y la incompleta osificación de la cabeza representan un reto mayor para los aparatos usados para la restricción de movimientos.

► **Remover factores fisiológicos de confusión: ¿cuántos regresores son demasiados?**

En esta obra se eligió la regresión de una o más señales, ya sea la señal promedio de todos los píxeles del cerebro, la materia blanca profunda, los ventrículos laterales o los tres parámetros de movimiento rígido. Permanece la pregunta si se removió alguna señal de interés. Ciertamente este no es el caso para la materia blanca, los ventrículos laterales o los parámetros de movimiento, ya que no se espera que contengan alguna señal de interés. No obstante, el caso de la señal global es diferente. Se ha demostrado que la regresión de la señal global introduce anti-correlaciones artificiales donde no había ninguna (Murphy *et al.*, 2009; Weissenbacher *et al.*, 2009), pero algunos estudios muestran que una base neural para estas anticorrelaciones es probable (Chai *et al.*, 2012; Fox *et al.*, 2009). El uso de la señal global como regresor todavía está abierto a debate y depende de futuros estudios (Smith *et al.*, 2013), aunque no es recomendado por algunos trabajos recientes en fMRI (Murphy *et al.*, 2013).

► Ruido en las mediciones

La principal prueba de que el análisis de fc basado en regiones de interés revela las redes en estado de reposo es la notable similitud que guardan los mapas de correlación con áreas específicas delineadas en la corteza. Cuando observamos los mapas de HbO_2 y de HbR este parecido es evidente, pero no resulta así para todos los contrastes. Los mapas de fc obtenidos de mediciones de CBF no poseen ese parecido sorprendente con áreas funcionales bien definidas, de hecho, debido al ruido espacio-temporal, sólo los pixeles vecinos de la ROI están fuertemente correlacionados; esta situación hace que los mapas basados en el CBF sean de calidad sub-óptima y por consiguiente, los datos de ahí derivados, como los mapas de CMRO_2 . En la opinión del autor esta desventaja puede limitar seriamente el uso de LSCI como herramienta para el estudio de fc.

► Efectos de la anestesia en las redes en reposo

Las RSN en roedores han sido identificadas bajo diferentes agentes anestésicos, lo que sugiere que las fluctuaciones coherentes espontáneas en el cerebro trascienden los estados de conciencia. Se han encontrado resultados consistentes usando hidrocloreuro de medetomidina en estudios de fc en roedores (Pawela *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008), así también como ketamin/Xilazina (Bero *et al.*, 2012; White *et al.*, 2011), uretano (Li *et al.*, 2012) e isoflurano (Guilfoyle *et al.*, 2013). Un estudio reciente mostró que hay una disminución significativa en la fuerza de conectividad en el cerebro de la rata bajo anestesia (Liang *et al.*, 2012), aunque los rasgos topológicos del cerebro se siguen conservando. No obstante, todos los anestésicos alteran el flujo sanguíneo en el encéfalo y el metabolismo, por lo que su impacto en la fc no es del todo entendido.

MEJORAS Y PERSPECTIVAS A FUTURO

► Incrementar la frecuencia de muestreo de imágenes

Para mitigar o incluso suprimir el solapamiento de las frecuencias cardíacas y respiratorias se podrían hacer mejoras al montaje OIS/LSCI; ya que la velocidad de adquisición se ve principalmente limitada por la velocidad de transferencia de datos al disco duro, la más directa sería cambiar la computadora por una con mayor frecuencia de bus y un disco duro de estado sólido para almacenar los datos. En teoría, se podría así alcanzar la máxima tasa de cuadros del sistema ($f_s/2 = 10\text{Hz}$), y suprimir el repliegue de frecuencias.

► Optimizar las mediciones de CBF

Una medición precisa del contraste por granularidad depende de una serie de parámetros, tamaño de la granularidad, tamaño de la ventana, tiempo de integración y ruido de la cámara. En esta obra se probó el efecto del tamaño de la ventana en las imágenes de granularidad para diferentes tamaños desde 5 hasta 11 píxeles, concordando con el tamaño óptimo (7×7 píxeles) según la literatura (Boas y Dunn, 2010). El tamaño real de la ventana tiene un efecto despreciable en los mapas de correlación. La apertura de la cámara se eligió para hacer coincidir el tamaño de la granularidad con el del pixel, pero podría elaborarse una prueba donde se pudiera determinar empíricamente la mejor apertura. En un montaje experimental en particular, el contraste de granularidad se mide en función de la apertura de la cámara, y así se elige la apertura óptima donde el contraste es máximo. El tiempo de integración también se eligió para estar cerca del tiempo y decorrelación en los roedores (Yuan *et al.*, 2005), pero debería hacerse una prueba para determinar el tiempo óptimo de integración que proporcione el máximo contraste por granularidad. De manera similar se puede idear una prueba para encontrar la ganancia óptima de la cámara.

► Limitar el movimiento de la cabeza de los neonatos

Dada la levedad de la anestesia en las ratas neonatales, el movimiento involuntario representa un problema; un rediseño del montaje estereotáctico que impida el movimiento de manera efectiva a la vez que resulte inofensivo para el cachorro sería una mejora sustancial en las condiciones experimentales.

► Técnicas adicionales de limpieza

La remoción de factores fisiológicos de confusión puede conseguirse al grabarse de manera simultánea con las imágenes y aplicando técnicas de regresión estándar. Actualmente el sistema OIS/LSCI permite registrar múltiples variables (ECG, temperatura, presión sanguínea), las cuales podrían incluirse eventualmente como regresores, un método similar a aquellos usados en fMRI (Birn *et al.*, 2006). Agregar una estación de monitoreo fisiológico al sistema PAT nos permitiría hacer lo propio con esta técnica.

► Reducir la variabilidad en la colocación de ROI

A pesar de que la colocación manual de las ROI para cada sujeto tiene sus ventajas, por ejemplo: evitar vasos sanguíneos, ésta puede resultar engorrosa, además de introducir variabilidad a nuestros estudios. La adición de una etapa de preprocesado, donde todas las imágenes se alineen a un atlas simplificaría la colocación individual de las ROI, y eliminaría la variabilidad debido a diferencias de colocación de estas regiones. Otra opción sería adquirir un conjunto de datos de activación evocada en conjunto con los datos en estado de reposo. Enseguida, colocar las ROI en las coordenadas del grupo de píxeles con la activación máxima, así se tendría una decisión menos arbitraria para posicionar las ROI.

► Explorar diversas técnicas de conectividad funcional

La conectividad funcional basada en regiones de interés, a pesar de su facilidad de implementación e interpretación, también posee desventajas, tales como la dependencia en la definición *a priori* de las ROI. Aunque la técnica ampliamente utilizada de ICA muestra resultados similares a los de la fc basada en ROI (Van Dijk *et al.*, 2010), presenta ventajas y es digna de explorarse. Estas técnicas basadas en los datos como el ICA pueden verse afectadas en menor medida por los factores fisiológicos de confusión, aun y cuando estas frecuencias fisiológicas se traslapen al rango de bajas frecuencias de las fluctuaciones coherentes en el estado de reposo (Beckmann *et al.*, 2005).

APÉNDICE I

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIACIONES

Esta lista presenta en orden alfabético las abreviaciones y acrónimos usados en este texto, así como su significado en español y en inglés, entre paréntesis.

4-AP	4-aminopiridina (4-Aminopyridine)
ADC	Conversión analógica-digital (Analog to Digital Conversion)
AL	Láser apuntador (Aiming Laser)
BOLD	Nivel de oxigenación sanguínea (Blood Oxygenation Level Dependent)
BPD	Fotodetector balanceado (Balanced Photodetector)
CBF	Flujo sanguíneo cerebral (Cerebral Blood Flow)
CBV	Volumen sanguíneo cerebral (Cerebral Blood Volume)
CCD	Dispositivo de carga acoplada (Coupled Charge Device)
CHD	Enfermedades coronarias (Coronary Heart Diseases)
CIR	Circulador (Circulator)
CM	Microscopía confocal (Confocal Microscopy)
CMRO ₂	Consumo metabólico cerebral de oxígeno (Cerebral Metabolic Rate of Oxygen consumption)
CNR	Razón contraste a ruido (Contrast-to-Noise Ratio)
COL	Colimador (Collimator)
CVD	Enfermedad cardiovascular (Cardiovascular disease)
DAQ	Tarjeta de adquisición de datos (Data Acquisition board)
DCB	Bloque de compensación de dispersión (Dispersion Compensation Block)
DFT	Transformada de Fourier discreta (Discrete Fourier Transform)
DMN	Red neuronal por defecto (Default mode network)
DVARS	La D es por derivada temporal y VARS significa varianza RMS (media cuadrática) sobre los pixeles (D stands for temporal derivative and VARS standing for RMS variance over pixels)

EEG	Electroencefalografía (Electroencephalography)
fc	Conectividad funcional (Functional Connectivity)
FC	Acoplador de fibra (Fiber Coupler)
fcEEG	Conectividad funcional por electroencefalografía (Electroencephalography Functional Connectivity)
fcOIS	Conectividad funcional por imagenología óptica de señales intrínsecas (Functional Connectivity Optical Intrinsic Signal Imaging)
FD	Desplazamiento cuadro a cuadro (Framewise Displacement)
FDG	Fluorodesoxiglucosa (Fluorodeoxyglucose)
FD-OCT	Tomografía de coherencia óptica en el dominio de Fourier (Fourier-Domain Optical Coherence Tomography)
fMRI	Imagenología por resonancia magnética funcional (Functional Magnetic Resonance Imaging)
fNIRS	Espectroscopía en el cercano infrarrojo funcional (Functional Near-Infrared Spectroscopy)
FOV	Campo de visión (Field of View)
FPGA	Arreglo de compuertas programables en campo (Field-Programmable Gate Array)
f_s	Frecuencia de muestreo (Sampling Frequency)
FWHM	Anchura a media altura (Full Width at Half Maximum)
HbO ₂	Oxihemoglobina (Oxyhemoglobin)
HbR	Desoxihemoglobina (Deoxyhemoglobin)
HbT	Hemoglobina total (Total hemoglobin)
ICA	Análisis de componentes independientes (Independent Component Analysis)
LCCA	Arteria carótida común izquierda (Left Common Carotid Artery)
LFP	Potencial de campo local (Local Field Potential)
LOT	Tomografía óptica laminar (Laminar Optical Tomography)
LPS	Lipopolisacárido (Lipopolysaccharide)
LSCI	Imagenología de contraste por granularidad láser (Laser Speckle Contrast Imaging)
LSF	Función de dispersión de línea (Line Spread Function)
M	Espejo (Mirror)

Mbps	Megabits por segundo (Megabits per second)
MRI	Imagenología por resonancia magnética (Magnetic Resonance Imaging)
NA	Apertura numérica (Numerical Aperture)
NDF	Filtro de densidad neutra (Neutral Density Filter)
NIRS	Espectroscopía en el cercano infrarrojo (Near-Infrared Spectroscopy)
OCT	Tomografía de coherencia óptica (Optical Coherence Tomography)
OD	Densidad óptica (Optical Density)
OIS	Imagenología óptica de señales intrínsecas (Optical Imaging of Intrinsic Signals)
PAT	Tomografía foto-acústica (Photoacoustic Tomography)
PBS	Tampón fosfato salino (Phosphate-buffered saline)
PC	Controlador de polarización (Polarization Controller)
PCA	Análisis de componentes principales (Principal Component Analysis)
PET	Tomografía por emisión de positrones (Positron Emission Tomography)
PSF	Función de dispersión de punto (Point-Spread Function)
PVL	Leucomalacia periventricular (Periventricular Leukomalacia)
RCCA	Arteria carótida común derecha (Right Common Carotid Artery)
rsMRI	Imagenología por resonancia magnética en reposo (Resting-State Functional Magnetic Resonance Imaging)
RSN	Red en reposo (Resting-State Network)
RTE	Ecuación de transporte radiativo (Radiative Transfer Equation)
SCI	Lesión de la médula espinal (Spinal Cord Injury)
SEM	Error estándar de la media (Standard Error of the Mean)
SNR	Razón señal a ruido (Signal-to-Noise Ratio)
SO ₂	Saturación de oxígeno (Oxygen Saturation)
SPD	Dicroico pasa-cortas (Short-Pass Dichroic)

SPM	Mapeo estadístico paramétrico (Statistical Parametric Mapping)
SS-OCT	Tomografía de coherencia óptica por fuente de barrido (Swept Source Optical Coherence Tomography)
SVD	Descomposición en valores singulares (Singular Value Decomposition)
TCO	Objetivo telecéntrico (Telecentric Objective)
TD-OCT	Tomografía de coherencia óptica en el dominio del tiempo (Time-Domain Optical Coherence Tomography)
TRITC	Isotiacianato de tetrarrodamina (tetramethylrhodamine isothiocyanate)
US	Ultrasonido (Ultrasound)

APÉNDICE II

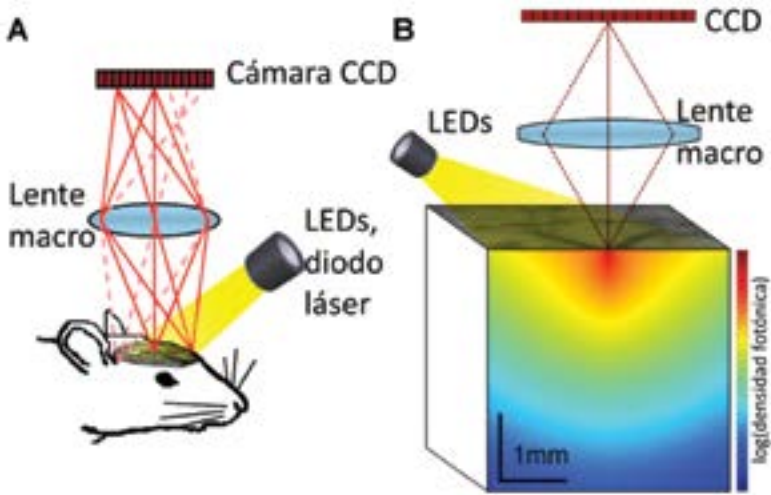


Figura 1.

Montaje OIS

(A) Montaje experimental de un sistema de imagenología óptica intrínseca. (B) Perfil de sensibilidad de un sistema OIS (longitud de onda $\lambda=625\text{nm}$).

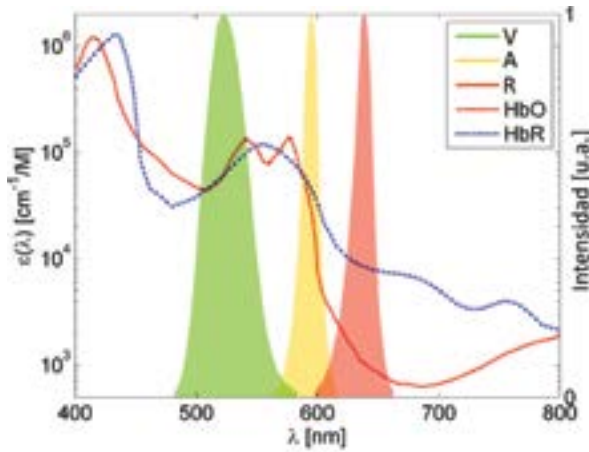


Figura 2.

Coefficientes de extinción molar de las hemoglobinas

Absorción óptica de la oxi- y desoxihemoglobina (HbO₂ y HbR) y el espectro de los LED (verde, amarillo y rojo) empleados en el sistema OIS.

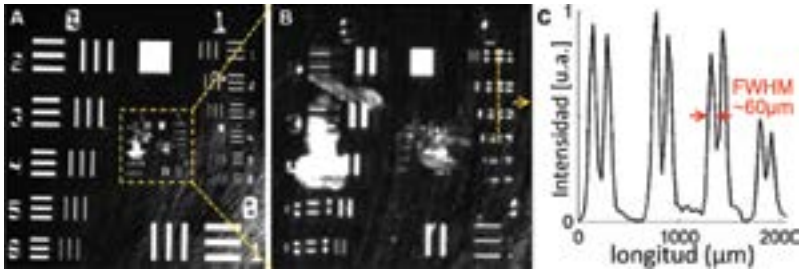


Figura 3.

Resolución

(A) FOV completo de la máscara de resolución ($20 \times 20 \text{ mm}^2$). (B) Acercamiento a la región marcada en líneas punteadas en A; La línea punteada vertical es de 2mm y se colocó sobre los rasgos más pequeños que se pudieron identificar. (C) Perfil de intensidad de los elementos señalados en B.

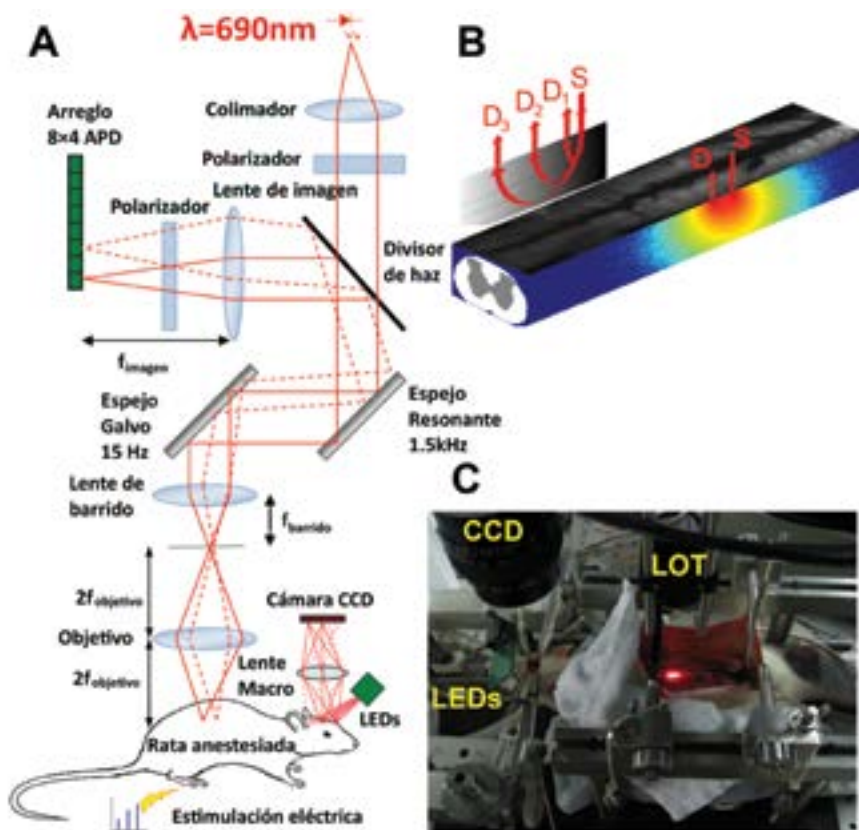


Figura 6.

Montaje multimodal

(A) Esquemático que ilustra el sistema de imagenología óptica multimodal, combinando la LOT con la OIS. (B) Representación de la matriz de sensibilidad para un par fuente-detector dado. (C) Montaje experimental.

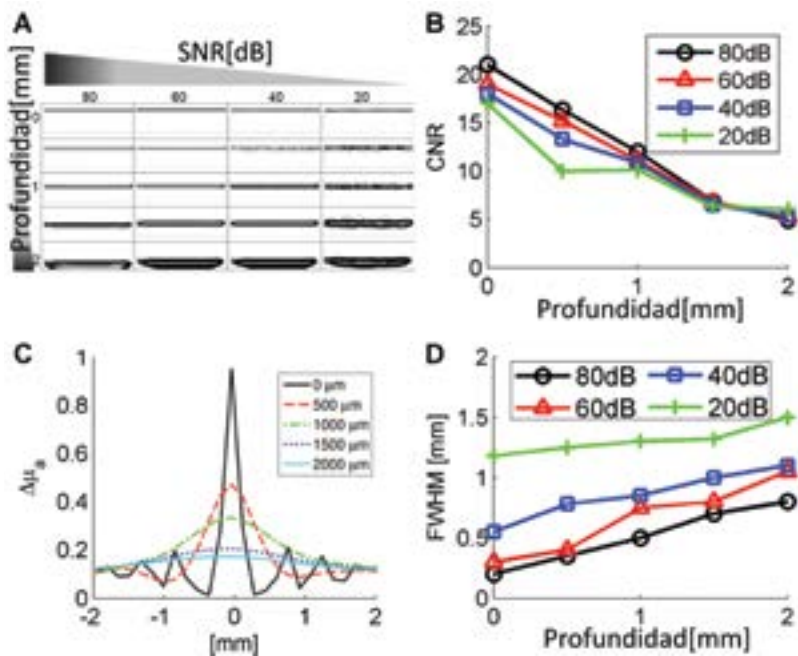


Figura 7.

Caracterización de la LOT

Soluciones regularizadas y figuras de mérito para una varilla absorbente a diferentes profundidades y a diferentes razones señal a ruido (SNR).

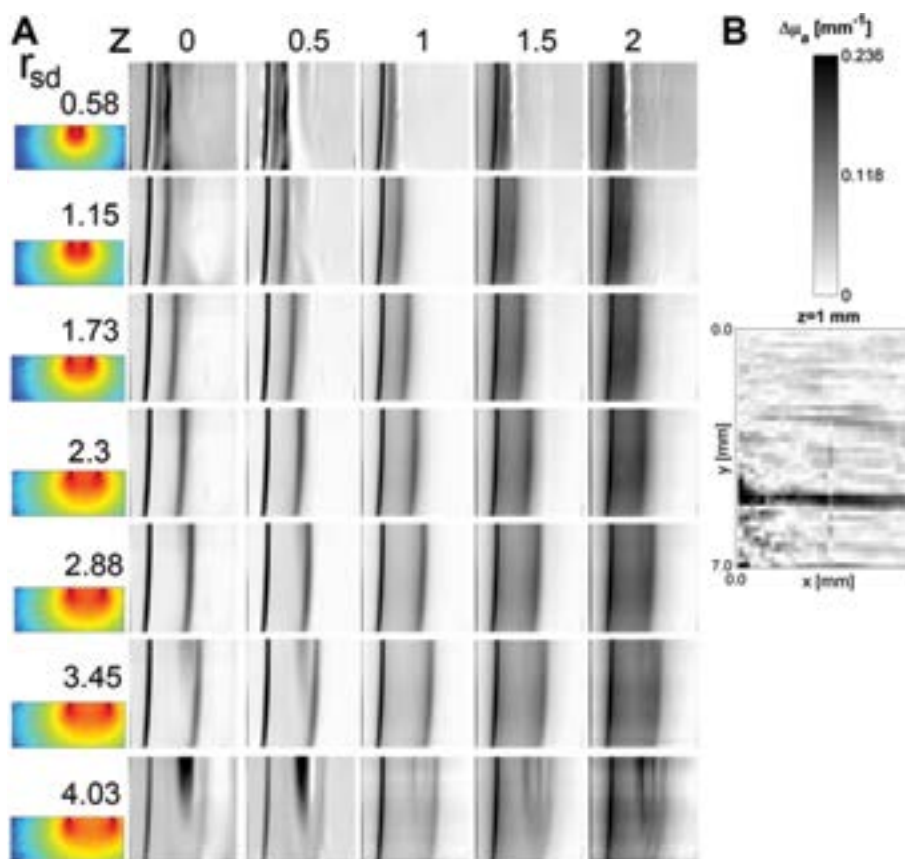


Figura 9.

Mediciones LOT in vitro

25. (A) Mediciones LOT a partir de un tubo de polietileno relleno de tinta ($\mu_a=0.1\text{mm}^{-1}$, $\mu_s=10\text{mm}^{-1}$ at 680nm). Cada columna muestra el tubo a diferentes profundidades z . Las funciones de sensibilidad para todas las distancias fuente-detector $r_{s,d}$ se muestran a la izquierda. Todo se indica en mm. (B) Sección representativa del volumen reconstruido, el alambre absorbente se colocó a lo largo del eje x a 1 mm de profundidad. Se pueden observar algunas heterogeneidades cerca de $x=0$, porque el tubo se encuentra ligeramente curvado por el borde del contenedor.

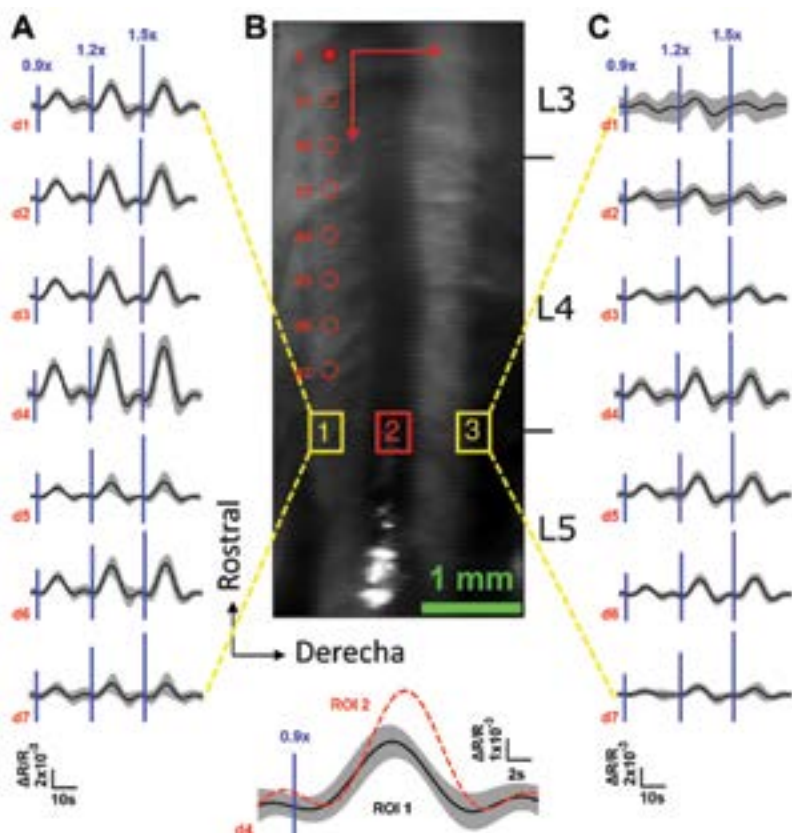


Figura 10.

Respuesta hemodinámica en la médula espinal

Respuesta hemodinámica LOT evocada por la estimulación de la pata trasera izquierda a diferentes intensidades de 0.9x, 1.2x y 1.5x veces el umbral muscular de la rata. (A) Se muestra el curso temporal promediado de la ROI 1, para todos los detectores, la cual es ipsilateral a los estímulos. (B) Arriba: Imagen de la médula espinal expuesta. Abajo: Trayectoria temporal promediada de la ROI 2 que muestra un retraso respecto a la activación ipsilateral. (C) La trayectoria temporal promediada de la ROI 3 para todos los detectores, contralateral a los estímulos.

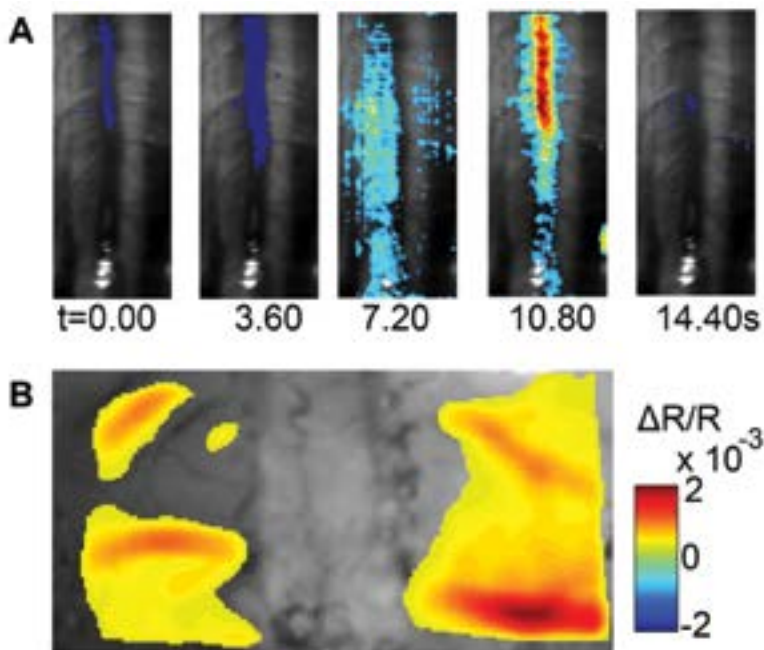


Figura 11.

Activación neuro-espinal simultánea

(A) Trayectoria temporal de las señales LOT evocadas por la estimulación de la pata trasera izquierda captadas por el detector 1 a lo largo de 15s a $0.9 \times$ el umbral muscular. (B) Máxima señal intrínseca medida de manera simultánea en la corteza somatosensorial.

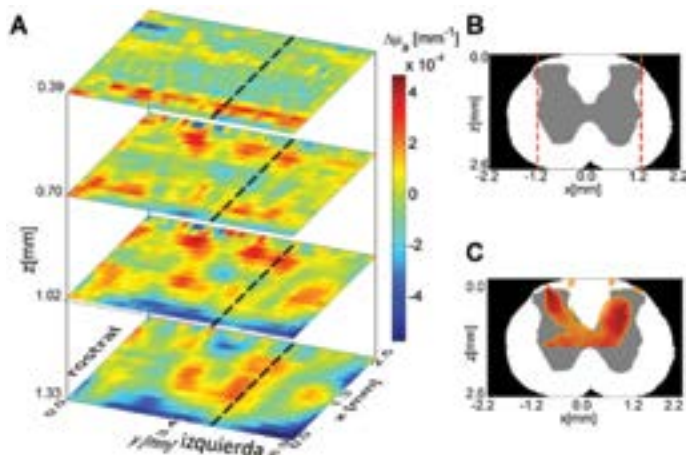


Figura 12.

Activación neural en 3-D

(A) Mapa 3D de la activación neural en la médula espinal inducida por la estimulación eléctrica de la pata trasera izquierda a $0.9 \times$ el umbral muscular. La activación ipsilateral alrededor de $z = 0.4$ mm es consistente con la activación de las interneuronas. (B) Modelo segmentado basado en histología de la médula espinal lumbar de la rata, el cual se usó en la simulación Monte Carlo de la propagación de la luz. Las líneas rojas punteadas indican la extensión del FOV. (C) Sección transversal a lo largo de la línea punteada en (A) que muestra la reconstrucción de la activación interneuronal.

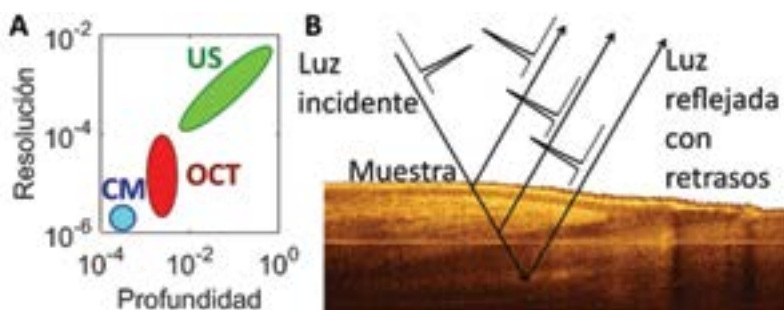


Figura 14.

Principios de la OCT

(A) Resolución de la OCT comparada con otras modalidades. (B) Ecos de luz.

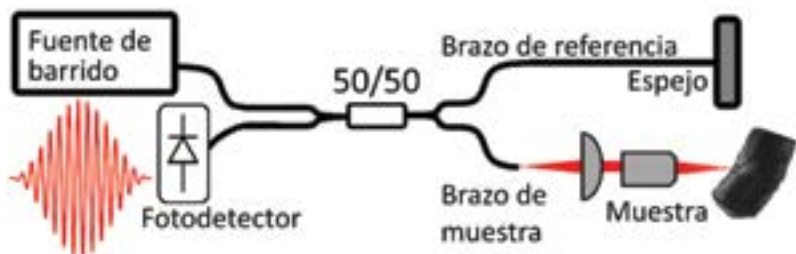


Figura 15.

Sistema OCT básico

Configuración básica de un sistema OCT a fuente de barrido. Inspirada por Bouma *et al.* (2008).

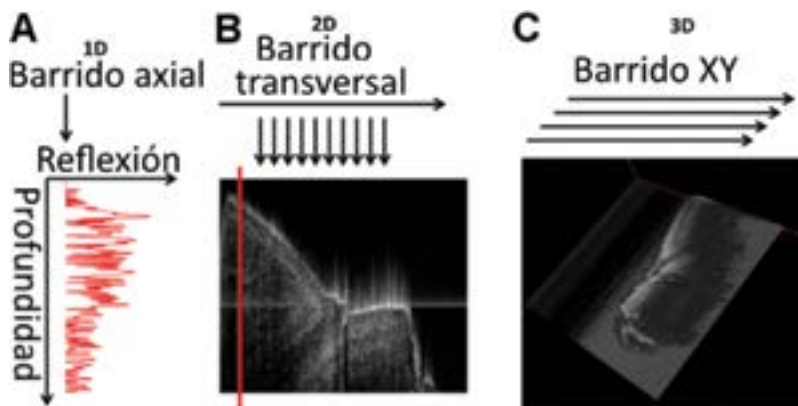


Figura 16.

Modos de barrido de la OCT

Modos de barrido de la OCT. (A) Línea-A. (B) Barrido-B. (C) OCT volumétrica.

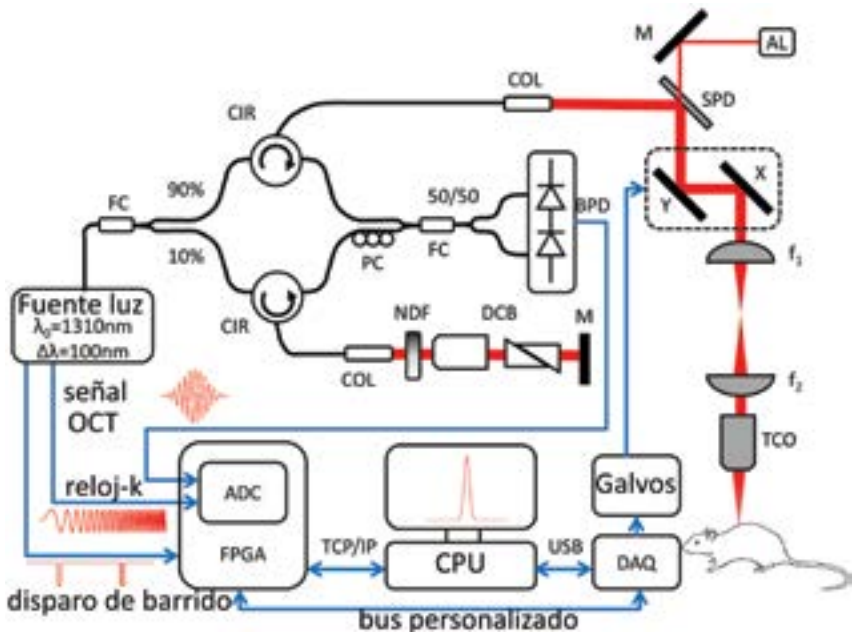


Figura 17.

Sistema OCT

Montaje OCT. ADC: Conversión analógica digital. AL: Láser apuntador. BPD: Fotodetector balanceado. CIR: Circulador. COL: Colimador. DAQ: Tarjeta de adquisición de datos. DCB: Bloque de compensación de dispersión. f_1 y f_2 : Relé óptico unitario. FC: Acoplador de fibra. FPGA: Arreglo de compuertas programable en campo. M: Espejo. NDF: Filtro neutro de densidad. PC: Controlador de polarización. SPD: Dicroico pasa-cortas. TCO: Objetivo telecéntrico. X y Y: Espejos galvanométricos.

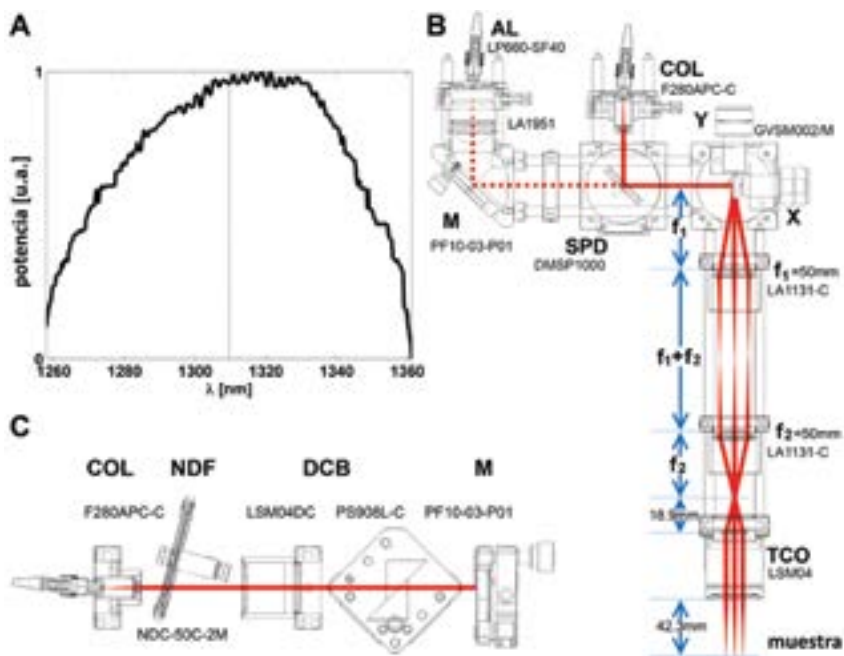


Figura 18.

Detalle del montaje OCT

(A) Espectro de la fuente de barrido láser promediado de 3 adquisiciones con el osciloscopio. (B) Esquemático del brazo de muestra. (C) Esquemático del brazo de referencia. Para detalles consulte la leyenda de la figura 17.

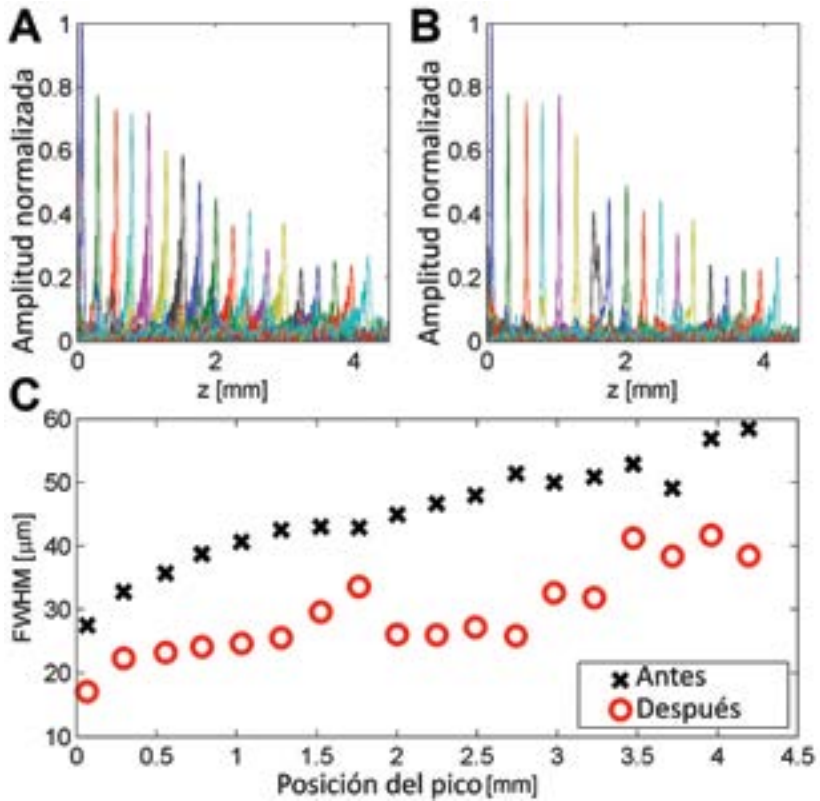


Figura 19.

Compensación de dispersión

Compensación de dispersión. (A) PSF axial medida a diferentes profundidades antes de la compensación. (B) Después de la compensación de dispersión. (C) FWHM en función de la profundidad.

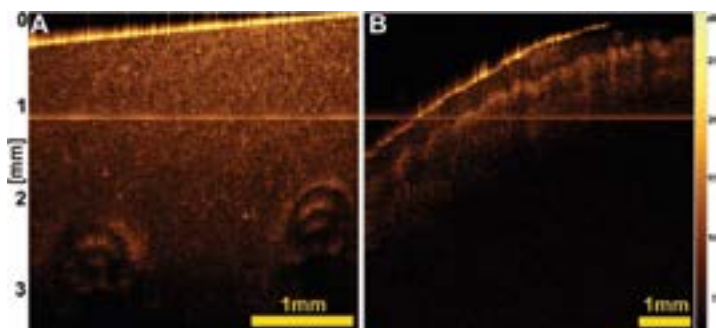


Figura 20.

Imágenes OCT

(A) Fantoma esparcidor a base de resina con dos tubos de polietileno. La máxima profundidad de imagen es de 3mm. (B) Imagen de la yema del dedo de un humano, en este caso la señal disminuye drásticamente a profundidades >1mm.

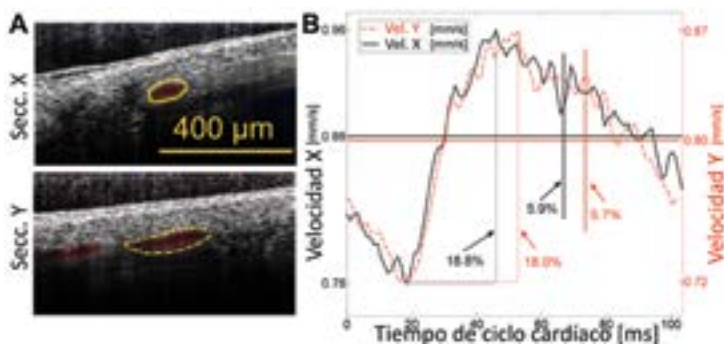


Figura 21.

Pulsatilidad del flujo sanguíneo

Ejemplo de pulsatilidad de flujo sanguíneo en una arteria de un ratón control: (A) Se muestran dos secciones a 90°. El flujo promedio en un ciclo cardíaco (en rojo-azul) se superpone a la imagen estructural (escala de grises). (B) La velocidad promedio es de 0.88 mm/s para la sección X (línea negra sólida) y de 0.80 mm/s para la sección Y (línea roja punteada) debido al tamaño diferente de las ROI (líneas amarillas). El perfil es muy similar para ambas secciones, lo que confirma que la variación observada se debe al latido del corazón. También se calcula la variación entre la máxima y mínima velocidad (líneas punteadas). Se define la variabilidad (líneas verticales continuas) como la desviación estándar dividida por la media.

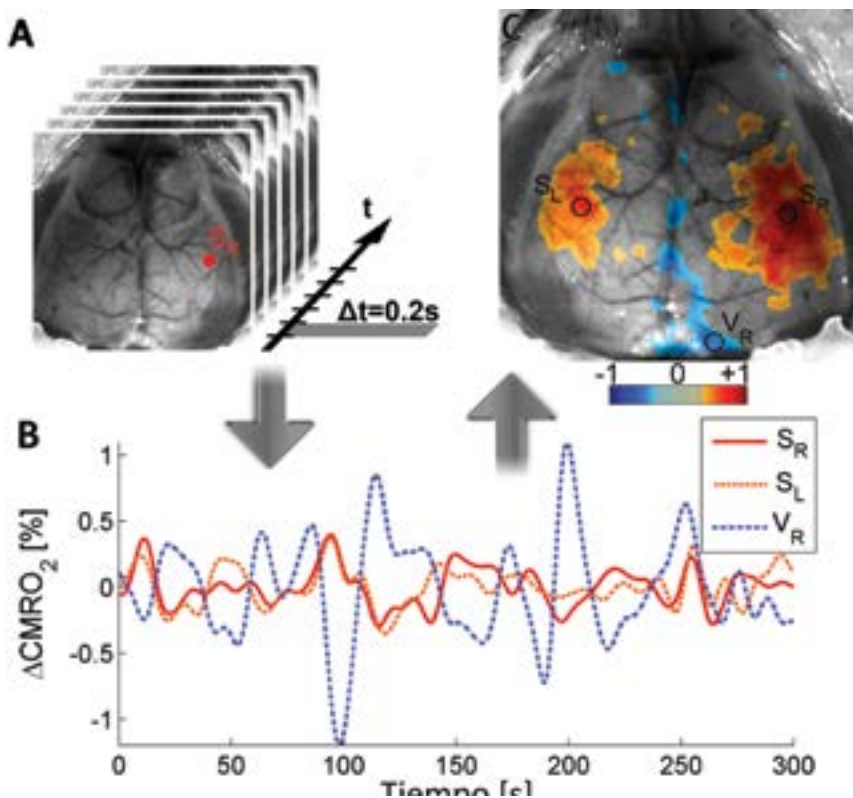


Figura 22.

fcl basada en regiones de interés

Principio de conectividad funcional basada en regiones de interés. (A) La señal temporal $\Delta CMRO_2$ se extrae de una región específica, en este caso la corteza somatosensorial derecha S_R . (B) Se muestra la trayectoria temporal en rojo para S_R , junto con una región correlacionada con su parte contralateral, la corteza somatosensorial izquierda (S_L , en naranja, $r = +0.6160$) y una región anticorrelacionada en la corteza visual derecha (V_R , en azul, $r = -0.5570$). (C) Se calculan los coeficientes de correlación entre la región S_R y el resto de los píxeles en el cerebro. La cartografía muestra tanto correlaciones (valores positivos en colores cálidos) como anticorrelaciones (valores negativos en colores fríos), a un umbral arbitrario de $|r| = 0.35$.

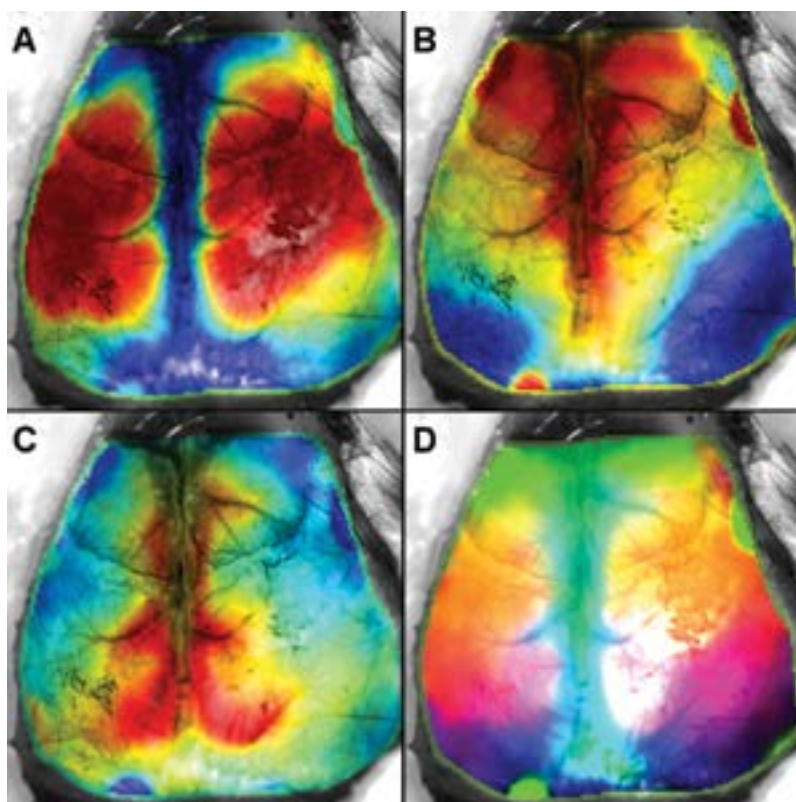


Figura 23.

Validación de fc mediante SVD

Descomposición en valores singulares de la matriz de conectividad de $CMRO_2$. Los primeros tres valores singulares validan el análisis de conectividad basado en ROI. (A) Una red sensorial-motriz muy fuerte. (B) Red cíngulo-frontal que se anticorrelaciona con la corteza visual. (C) Red cíngulo-retrosplenial. (D) Los primeros tres componentes ortogonales visualizados como una imagen compuesta rojo-verde-azul (RGB). Todas las imágenes se superpusieron a la imagen anatómica de la corteza adquirida a una longitud de onda $\lambda=525\text{nm}$.

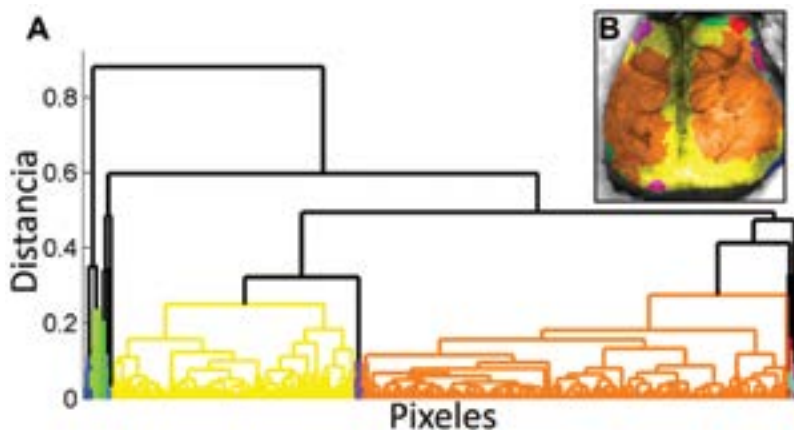


Figura 24.

Agrupamiento de píxeles

Agrupamiento jerárquico de mediciones de $CMRO_2$ ($N_{grupos} = 12$). (A) Dendrograma que muestra agrupamiento de los píxeles según su correlación entre sí. (B) Se puede observar un delineado claro de una red somatosensorial-motriz en naranja y una amplia red que incorpora a las cortezas cíngulo, retrosplenial y visual en amarillo. Los grupos se superpusieron a la imagen anatómica de la corteza, también adquirida a una longitud de onda $\lambda=525$ nm.

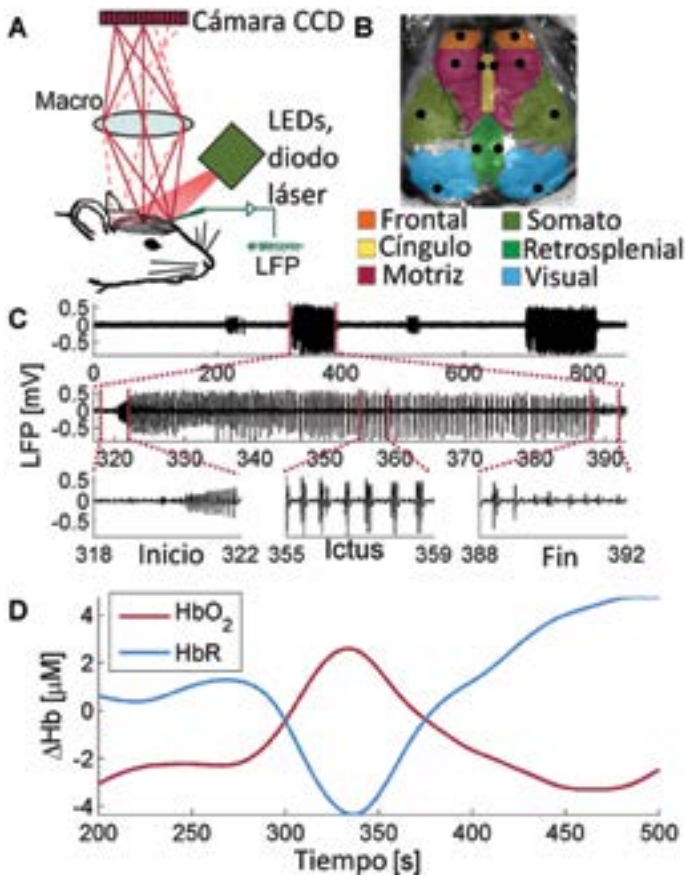


Figura 25.

Montaje multimodal y crisis epiléptica

(A) Esquema general del montaje óptico. Los LED y el diodo láser están sincronizados con el sistema de adquisición. Se usó un electrodo de tungsteno para grabar el LFP en la corteza somatosensorial izquierda. (B) Regiones funcionales en la corteza del ratón colocación de ROI, se construyó manualmente a partir de (Bero *et al.*, 2012). El círculo punteado muestra la colocación del electrodo LFP. (C) Electrofisiología de la crisis inducida por 4-AP. Arriba: Ejemplo de descargas post-inyección en tiempo 0. En medio: Acercamiento de una descarga ictal. Abajo: Vista expandida que muestra las diferentes fases de la descarga. (D) Trayectorias temporales de HbO₂ y HbR en el foco epiléptico al momento de la crisis.

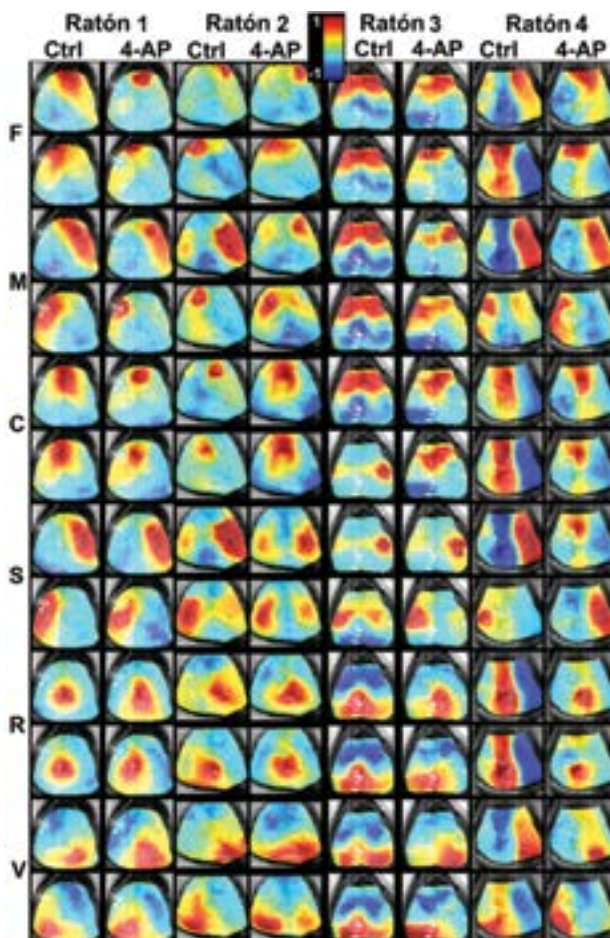


Figura 26.

Mapas de conectividad

Mapas de correlación de HbR basados en ROI para cuatro ratones. Se despliegan una sesión de control y una sesión post-inyección 4-AP para cada ratón. (F: corteza frontal, M: corteza motriz, C: cíngulo, S: corteza somatosensorial, R: corteza retrosplenial, V: corteza visual; los subíndices L y R se refieren al hemisferio izquierdo y derecho, respectivamente, mostrados de manera alternada en cada renglón). La escala para todos los mapas de correlación va de $r = -1$ a 1. Los mapas se muestran superpuestos a la imagen anatómica del cerebro, adquirida bajo luz de color verde. La colocación de las semillas y su tamaño se indican con círculos negros.

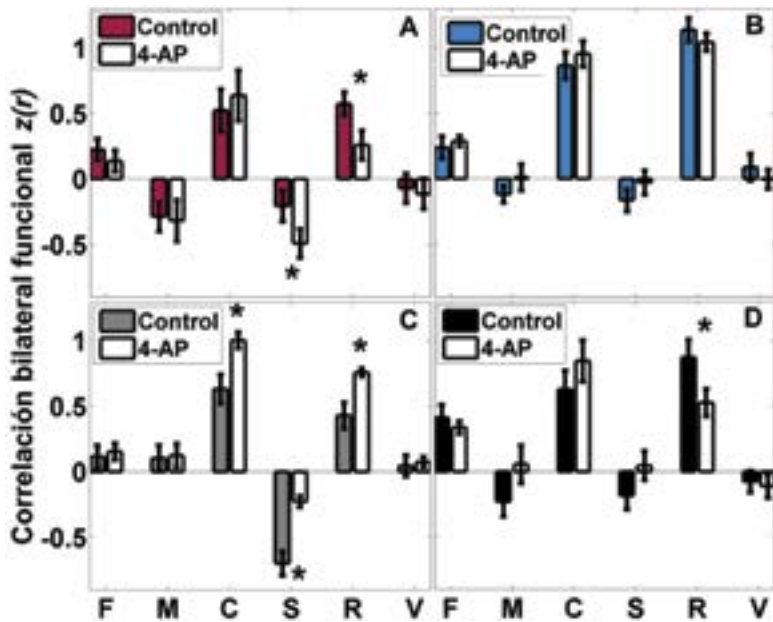


Figura 27.

Conectividad inter-hemisférica

Correlación bilateral funcional antes y después de la inyección de 4-AP, el análisis se efectuó para cada ROI y su parte contralateral. Se muestran cuatro diferentes contrastes (A) HbO₂, (B) HbR (C) CBF y (D) CMRO₂. * p<0.05, corregida para FDR. Se muestran las barras de error estándar (σ/\sqrt{N}), con N=9. Abreviaturas: F: corteza frontal, M: corteza motriz, C: corteza cingula, S: corteza somatosensorial R: corteza retrosplenial, V: corteza visual.

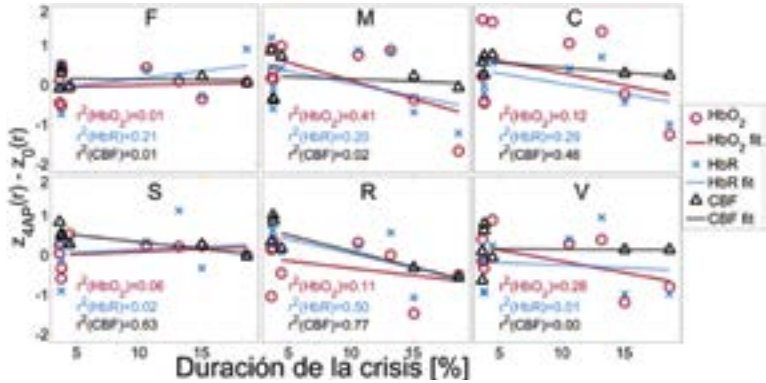


Figura 28.

Correlación entre conectividad y duración de la crisis

Cambios en la correlación bilateral funcional graficados vs. la duración de la crisis (expresada como porcentaje de la sesión); se muestran seis diferentes regiones corticales y cuatro diferentes contrastes, así también como la línea de ajuste (*fit*)



Figura 29

Montaje OIS y regiones de interés.

(A) Descripción general del sistema OIS. Los LED y el diodo láser están sincronizados al sistema de adquisición de modo que cada imagen corresponde a una sola longitud de onda de LED (525, 590, 625 nm) o de láser (785 nm). (B) La colocación de las ROI en la corteza del ratón, a partir del trabajo de Bero *et al.* (Bero *et al.*, 2012). Abreviaturas: F, frontal; M, motriz; C, cíngulo; S, somatosensorial; R, retrosplenial; V, visual.

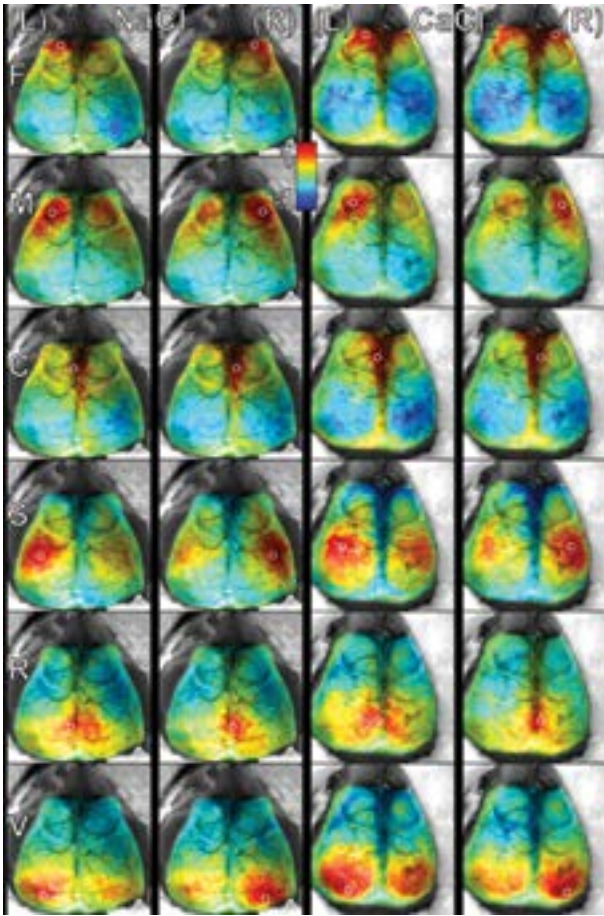


Figura 30.

Mapas de conectividad

Mapas de correlación basados en ROI. Las imágenes se alinearon manualmente a través de una transformación afín, empleando el *plugin* TurboReg del programa ImageJ (Thevenaz *et al.*, 1998). Se muestra el contraste HbO₂. La escala de todos los mapas de correlación es $-1 \leq r \leq 1$. Se superpusieron los mapas sobre la imagen anatómica de un ratón para referencia ($\lambda=525$ nm). Los círculos blancos denotan la posición de la ROI y su tamaño. Abreviaturas: F: corteza frontal, M: corteza motriz, C: corteza cíngulo, S: corteza somatosensorial, R: corteza retrosplenial, V: corteza visual, (L) región izquierda, (R) región derecha.

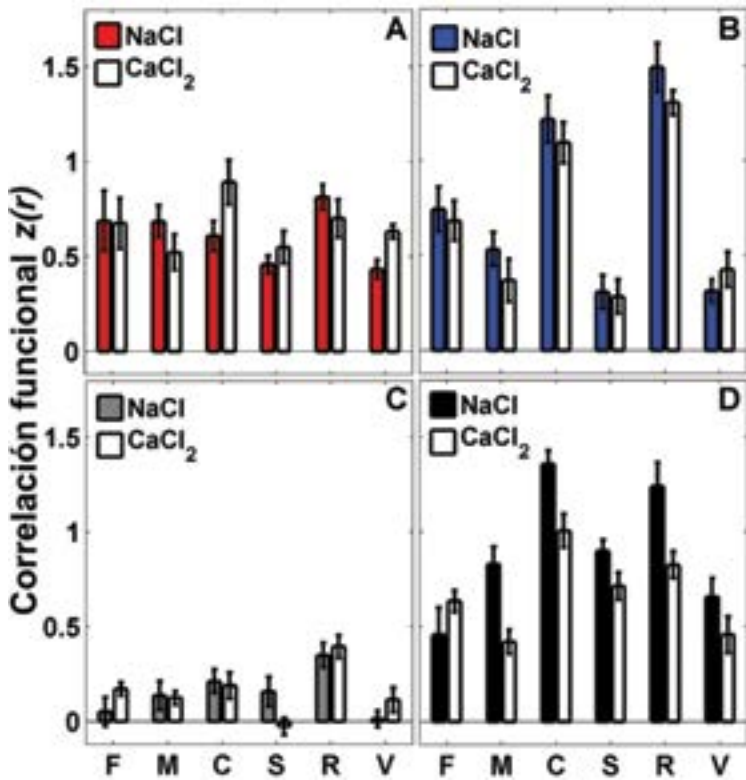


Figura 31.

Conectividad bilateral

Correlación funcional bilateral, comparando el grupo control NaCl y el grupo tratamiento CaCl₂; el análisis se hizo entre cada ROI y su parte contralateral. Los contrastes que se muestran son: (A) HbO₂, (B) HbR (C) CBF y (D) CMRO₂. Se muestran barras de error estándar. Abreviaturas: F: corteza frontal, M: corteza motriz, C: corteza cíngulo, S: corteza somatosensorial, R: corteza retrosplenial, V: corteza visual, (L) región izquierda, (R) región derecha.

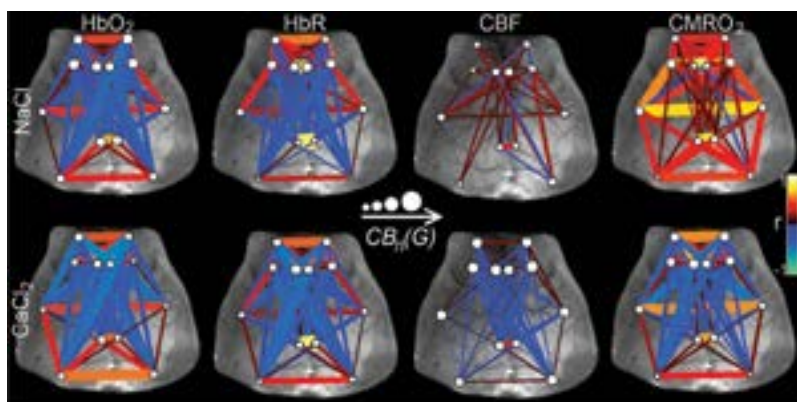


Figura 32.

Redes en estado de reposo

Diagramas de conectividad funcional para el grupo NaCl (fila superior) y para sujetos CaCl₂ (línea inferior). El ancho de los bordes depende de los coeficientes de correlación inter-regiones, y solo se muestran bordes con $|r| > 0.3$. El tamaño de los nodos es proporcional al grado de intermediación $CB_p(G)$ de cada ROI. Las correlaciones positivas se ilustran con colores tibios. Las correlaciones negativas se despliegan en colores fríos.

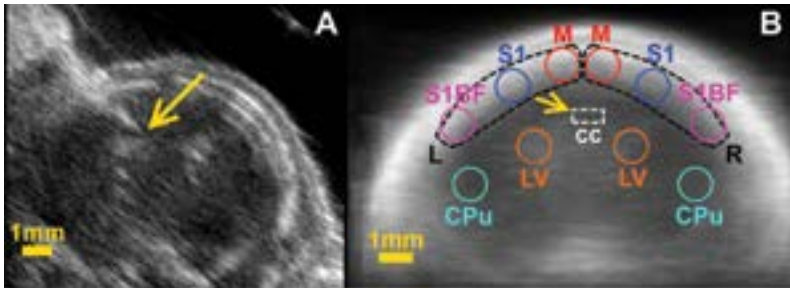


Figura 33.

Inyección y ROI

(A) La flecha marca el sitio de inyección. (B) Colocación de las regiones de interés superpuestas a un barrido-B coronal, promediado de 11 individuos. Abreviaturas: M, corteza motriz; S1, corteza somatosensorial primaria; S1BF, corteza somatosensorial de la corteza somatosensorial de las vibrisas; LV, ventrículo lateral; CPu, putamen caudado. La línea punteada negra indica las ROI de la corteza usada para medir la SO_2 . El rectángulo punteado blanco indica la ROI usada para medir la SO_2 en el cuerpo calloso. Barra de escala: 1mm.

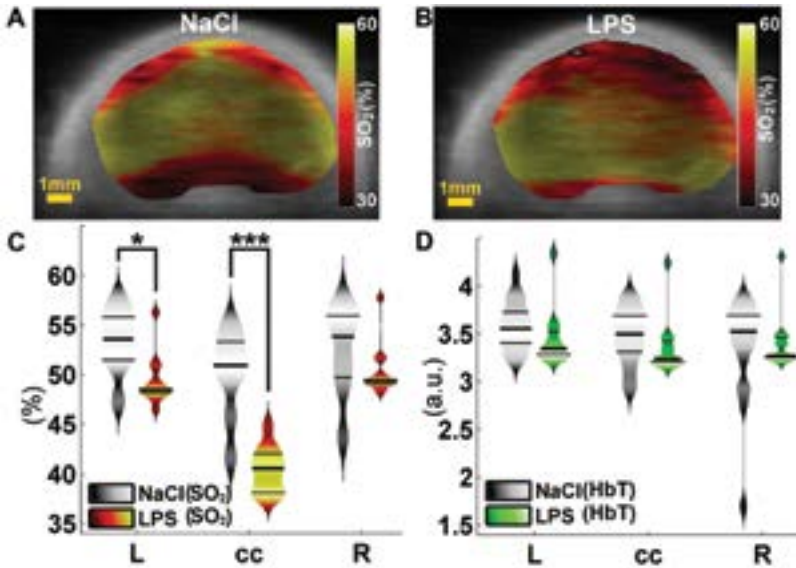


Figura 34.

Hemoglobina y saturación de oxígeno

Saturación local cortical (SO_2 %). (A) Imagen de SO_2 promediada para controles, barra de escala: 1mm- (B) Igual que (a) para el grupo LPS (C) Comparación de SO_2 entre el grupo LPS (N=11), y el grupo NaCl (N=8). Hubo una disminución significativa de SO_2 para el grupo lesionado en la corteza cerebral izquierda (L) y en el cuerpo calloso (cc). El hemisferio contralateral (R) a la inyección no mostró ninguna diferencia. *P<0.05, ***P<0.001 (D) en cambio el contraste HbT no mostró diferencia alguna entre ambos grupos.

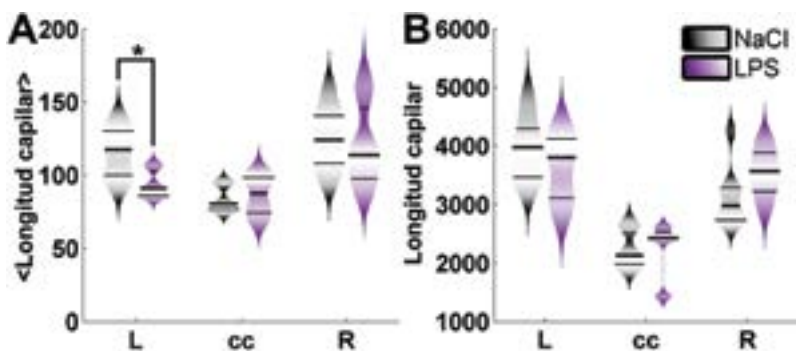


Figura 35.

Histoquímica

Mediciones de histoquímica con lectina conjugada con TRITC. (A) longitud capilar promedio. (B) Longitud capilar promedio total en secciones de cerebro pertenecientes a la corteza y al cuerpo calloso. Nótese la disminución significativa en la longitud capilar promedio en la corteza izquierda en el grupo LPS (* $P < 0.01$).

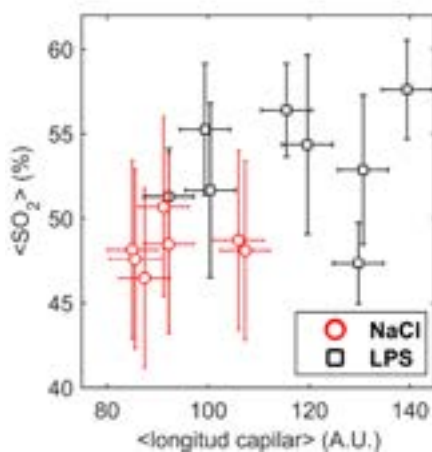


Figura 36.

Longitud capilar

En la corteza ipsilateral al sitio de inyección LPS las mediciones de SO_2 se correlacionan positivamente con la longitud capilar promedio ($r^2=0.3011$, * $P=0.0341$).

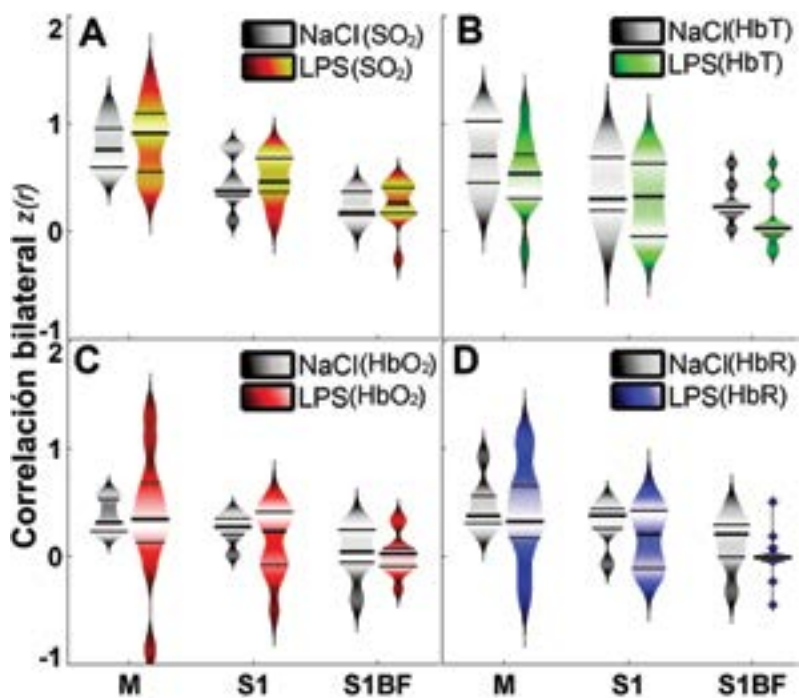


Figura 37.

Conectividad entre regiones homotópicas

Figura 75. Correlación bilateral funcional, entre el grupo LPS (N=11), y el grupo NaCl (control simulado, N=8); el análisis se efectuó para la trayectoria temporal de cada ROI y su parte contralateral. Contrastes mostrados: (A) SO_2 , (B) HbT (C) HbO_2 y (D) HbR. Abreviaturas: (M, corteza motriz; S1, corteza somatosensorial primaria; S1BF, corteza somatosensorial de las vibrisas).

REFERENCIAS

- Aarabi, A., Wallois, F., y Grebe, R. (2008). «Does spatiotemporal synchronization of EEG change prior to absence seizures?». *Brain Research*, 1188, 207-221. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.brares.2007.10.048>
- Abdelnour, F., Genovese, C., y Huppert, T. (2010). «Hierarchical Bayesian regularization of reconstructions for diffuse optical tomography using multiple priors». *Biomedical Optics Express*, 1(4), 1084-1103. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1364/BOE.1.001084>
- Achard, S., y Bullmore, E. (2007). «Efficiency and Cost of Economical Brain Functional Networks». *PLoS Comput Biol*, 3(2). En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030017>
- Alavi, A., Dann, R., Chawluk, J., Alavi, J., Kushner, M., y Reivich, M. (1986). «Positron emission tomography imaging of regional cerebral glucose metabolism». *Seminars in Nuclear Medicine*, 16(1), 2-34.
- Anderton, B.H. (2002). «Ageing of the brain». *Mechanisms of Ageing and Development*, 123(7), 811-817. En línea. Obtenido desde: [http://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00426-2](http://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00426-2)
- Anthonisse, J.M. (1971). *The Rush In A Directed Graph* (CWI Technical Report No. Stichting Mathematisch Centrum. Mathematische Besliskunde-BN 9/71). Stichting Mathematisch Centrum. En línea. Obtenido desde: <http://oai.cwi.nl/oai/asset/9791/9791A.pdf>
- Aronson, M.K., Ooi, W.L., Morgenstern, H., Hafner, A., Masur, D., Crystal, H., et al. «Women, myocardial infarction, and dementia in the very old». *Neurology*, 40(7), 1102-1106.
- Arridge, S.R., y Hebden, J.C. (1997). «Optical imaging in medicine: II. Modelling and reconstruction». *Physics in Medicine and Biology*, 42(5), 841-854. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/008>

- Baraghis, E., Bolduc, V., Lefebvre, J., Srinivasan, V. J., Boudoux, C., Thorin, E., y Lesage, F. (2011). «Measurement of cerebral microvascular compliance in a model of atherosclerosis with optical coherence tomography». *Biomedical Optics Express*, 2(11), 3079-3093. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1364/BOE.2.003079>
- Bassett, D. S., y Bullmore, E. (2006). «Small-world brain networks». *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 12(6), 512-523. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1177/1073858406293182>
- Beaumont, E., Brieu, N., Dubeau, S., y Lesage, F. (2008a). «Alteration of the neuronal and vascular response in the lumbar spinal cord 4 weeks after a T10 transection in rat». In *International 38th annual meeting for the Society of Neuroscience (SNF)*. Washington.
- Beaumont, E., Brieu, N., Dubeau, S., y Lesage, F. (2008b). «Characterization of the hemodynamic and metabolic response in the in-vivo rat lumbar spinal cord by intrinsic imaging». In *3rd National spinal cord injury conference*. Canadá.
- Beaumont, E., Guevara, E., Dubeau, S., Lesage, F., Nagai, M., y Popovic, M.R. (2014). «Functional electrical stimulation post spinal cord injury improves locomotion and increases afferent input into the central nervous system in rats». *Journal of Spinal Cord Medicine*, 37(1), 93-100. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1179/2045772313Y.0000000117>
- Beckmann, C.F., DeLuca, M., Devlin, J.T., y Smith, S.M. (2005). «Investigations into resting-state connectivity using independent component analysis». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1457), 1001-1013. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1098/rstb.2005.1634>
- Belanger, S., Abran, M., Intes, X., Casanova, C., y Lesage, F. (2010). «Real-time diffuse optical tomography based on structured illumination». *Journal of Biomedical Optics*, 15(1), 16006-7. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1117/1.3290818>
- Belliveau, J.W., Kennedy, D. N., Jr, McKinstry, R. C., Buchbinder, B. R., Weisskoff, R. M., Cohen, M. S., et al. «Functional mapping of the human visual cortex by magnetic resonance imaging». *Science (New York, N.Y.)*, 254(5032), 716-719.

- Benjamini, Y., y Hochberg, Y. (1995). «Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing». *Journal of the Royal Statistical Society. Series B. Methodological*, 57(1), 289-300.
- Benveniste, H., y Blackband, S. (2002). «MR microscopy and high resolution small animal MRI: applications in neuroscience research». *Progress in Neurobiology*, 67(5), 393-420.
- Bero, A. W., Bauer, A. Q., Stewart, F. R., White, B. R., Cirrito, J. R., Raichle, M. E., et al. (2012). «Bidirectional Relationship between Functional Connectivity and Amyloid- β Deposition in Mouse Brain». *The Journal of Neuroscience*, 32(13), 4334-4340. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5845-11.2012>
- Bettus, G., Ranjeva, J.P., Wendling, F., Bénar, C. G., Confort-Gouny, S., Régis, J., et al. (2011). «Interictal Functional Connectivity of Human Epileptic Networks Assessed by Intracerebral EEG and BOLD Signal Fluctuations». *PLoS ONE*, 6(5), e20071. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0020071>
- Bettus, G., Wendling, F., Guye, M., Valton, L., Régis, J., Chauvel, P., y Bartolomei, F. (2008). «Enhanced EEG functional connectivity in mesial temporal lobe epilepsy». *Epilepsy Research*, 81(1), 58-68. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2008.04.020>
- Bevilacqua, F., Pigué, D., Marquet, P., Gross, J. D., Tromberg, B. J., y Depeursinge, C. (1999). «*In vivo* Local Determination of Tissue Optical Properties: Applications to Human Brain». *Appl. Opt.*, 38(22), 4939-4950.
- Bifone, A., Gozzi, A., y Schwarz, A. J. (2010). «Functional connectivity in the rat brain: a complex network approach». *Magnetic Resonance Imaging*, 28(8), 1200-1209. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.mri.2010.07.001>
- Birn, R.M., Diamond, J.B., Smith, M.A., y Bandettini, P.A. (2006). «Separating respiratory-variation-related fluctuations from neuronal-activity-related fluctuations in fMRI». *NeuroImage*, 31(4), 1536-1548. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.02.048>
- Biswal, B.B., y Kannurpatti, S.S. (2009). «Resting-state functional connectivity in animal models: modulations by exsanguination». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 489, 255-274. En línea. Obtenido desde: http://doi.org/10.1007/978-1-59745-543-5_12
- Biswal, B.B., Mennes, M., Zuo, X.N., Gohel, S., Kelly, C., Smith, S.M., et al. (2010). «Toward discovery science of human brain function». *Pro-*

- ceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4734-4739. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1073/pnas.0911855107>
- Biswal, B., Yetkin, F. Z., Haughton, V. M., y Hyde, J. S. (1995). «Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI». *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 34(4), 537-541.
- Blumenthal, I. (2004). «Periventricular leucomalacia: a review». *European Journal of Pediatrics*, 163(8), 435-442. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1007/s00431-004-1477-y>
- Boas, D.A., Brooks, D.H., Miller, E.L., DiMarzio, C.A., Kilmer, M., Gaudette, R. J., y Quan, Z. (2001). «Imaging the body with diffuse optical tomography». *Signal Processing Magazine, IEEE*, 18(6), 57-75. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1109/79.962278>
- Boas, D.A., Culver, J., Stott, J., y Dunn, A. (2002). «Three dimensional Monte Carlo code for photon migration through complex heterogeneous media including the adult human head». *Optics Express*, 10(3), 159-170.
- Boas, D. A., y Dunn, A. K. (2010). «Laser speckle contrast imaging in biomedical optics». *Journal of Biomedical Optics*, 15(1), 11109. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1117/1.3285504>
- Bolduc, V., Baraghis, E., Duquette, N., Thorin-Trescases, N., Lambert, J., Lesage, F., y Thorin, E. (2012). «Catechin prevents severe dyslipidemia-associated changes in wall biomechanics of cerebral arteries in LDLr-/-:hApoB+/+ mice and improves cerebral blood flow». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 302(6), H1330-1339. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1152/ajpheart.01044.2011>
- Bonner, R., y Nossal, R. (1981). «Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue». *Applied Optics*, 20(12), 2097-2107. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1364/AO.20.002097>
- Bonvento, G., Charbonné, R., Corrèze, J. L., Borredon, J., Seylaz, J., y Lacombe, P. (1994). «Is alpha-chloralose plus halothane induction a suitable anesthetic regimen for cerebrovascular research?». *Brain Research*, 665(2), 213-221.
- Born, A.P., Miranda, M.J., Rostrup, E., Toft, P.B., Peitersen, B., Larsson, H.B., y Lou, H.C. (2000). «Functional magnetic resonance imaging of the normal and abnormal visual system in early life». *Neuropediatrics*,

- 31(1), 24-32. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1055/s-2000-15402>
- Born, P., Leth, H., Miranda, M.J., Rostrup, E., Stensgaard, A., Peitersen, B., et al. (1998). «Visual activation in infants and young children studied by functional magnetic resonance imaging». *Pediatric Research*, 44(4), 578-583. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1203/0006450-199810000-00018>
- Bouma, B.E., Tearney, G.J., Vakoc, B.J., y Yun, S.H. (2008). «Optical Frequency Domain Imaging». In P.D.W. Drexler y P.D.J.G. Fujimoto (Eds.), *Optical Coherence Tomography*. Springer Berlin Heidelberg. En línea. Obtenido desde: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-77550-8_7
- Bressler, S.L., Ding, M., y Yang, W. (1999). «Investigation of cooperative cortical dynamics by multivariate autoregressive modeling of event-related local field potentials». *Neurocomputing*, 26, 625-631.
- Breteler, M.M., Claus, J.J., Grobbee, D.E., y Hofman, A. (1994). «Cardiovascular disease and distribution of cognitive function in elderly people: the Rotterdam Study». *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 308(6944), 1604-1608.
- Brezinski, M.E. (2006). *Optical Coherence Tomography: Principles and Applications* (1st ed.). Londres: Academic Press.
- Briers, J.D. (2001). «Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging». *Physiological Measurement*, 22(4), R35-R66. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1088/0967-3334/22/4/201>
- Briers, J.D., y Webster, S. (1995). «Quasi real-time digital version of single-exposure speckle photography for full-field monitoring of velocity or flow fields». *Optics Communications*, 116(1-3), 36-42. En línea. Obtenido desde: [http://doi.org/10.1016/0030-4018\(95\)00042-7](http://doi.org/10.1016/0030-4018(95)00042-7)
- Briue, N., Beaumont, E., Dubeau, S., Cohen-Adad, J., y Lesage, F. (2010). «Characterization of the hemodynamic response in the rat lumbar spinal cord using intrinsic optical imaging and laser speckle». *Journal of Neuroscience Methods*, 191(2), 151-157. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.06.012>
- Briue, N., Beaumont, E., y Lesage, F. (2008). «Intrinsic optical imaging of the rat lumbar spinal cord». In *OSA Biomed*.

- Brookes, M.J., Hale, J.R., Zumer, J.M., Stevenson, C.M., Francis, S.T., Barnes, G.R., *et al.* (2011). «Measuring functional connectivity using MEG: methodology and comparison with fMRI». *NeuroImage*, 56(3), 1082-1104. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.02.054>
- Bruehl, C., Hagemann, G., y Witte, O.W. (1998). «Uncoupling of blood flow and metabolism in focal epilepsy». *Epilepsia*, 39(12), 1235-1242.
- Buckner, R.L., Andrews-Hanna, J.R., y Schacter, D.L. (2008). «The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease». *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1124, 1-38. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1196/annals.1440.011>
- Burgess, S.A., Baohong, Y., Radosevich, A.J., Bouchard, M.B., y Hillman, E.M.C. (2007). «High-resolution 3D imaging of tissue». In *Lasers and Electro-Optics Society, 2007. LEOS 2007. The 20th Annual Meeting of the IEEE*. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1109/LEOS.2007.4382246>
- Buxton, R.B. (2001). «The elusive initial dip». *NeuroImage*, 13(6 Pt 1), 953-958. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1006/nimg.2001.0814>
- Buxton, R.B., Uludag, K., Dubowitz, D.J., y Liu, T.T. (2004). «Modeling the hemodynamic response to brain activation». *NeuroImage*, 23 (Supplement 1), S220-S233. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.07.013>
- Cai, Z., Pang, Y., Lin, S., y Rhodes, P.G. (2003). «Differential roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat». *Brain Research*, 975(1-2), 37-47.
- Cang, J., Kalatsky, V.A., Löwel, S., y Stryker, M.P. (2005). «Optical Imaging of the Intrinsic Signal as a Measure of Cortical Plasticity in the Mouse». *Visual Neuroscience*, 22(5), 685-691. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1017/S0952523805225178>
- Cauli, B., Tong, X.K., Rancillac, A., Serluca, N., Lambolez, B., Rossier, J., y Hamel, E. (2004). «Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(41), 8940-8949. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3065-04.2004>

- Chai, X.J., Castañón, A.N., Ongür, D., y Whitfield-Gabrieli, S. (2012). «Anticorrelations in resting state networks without global signal regression». *NeuroImage*, 59(2), 1420-1428. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.08.048>
- Chen, J.J., y Pike, G.B. (2009). «Origins of the BOLD post-stimulus undershoot». *NeuroImage*, 46(3), 559-568. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.03.015>
- Cheng, H.L., Lin, C.J., Soong, B.W., Wang, P.N., Chang, F.C., Wu, Y.T., et al. (2012). «Impairments in cognitive function and brain connectivity in severe asymptomatic carotid stenosis». *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 43(10), 2567-2573. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.645614>
- Choi, E.K., Park, D., Kim, T. K., Lee, S. H., Bae, D.K., Yang, G., et al. (2011). «Animal models of periventricular leukomalacia». *Laboratory Animal Research*, 27(2), 77-84. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.5625/lar.2011.27.2.77>
- Church, J.A., Fair, D.A., Dosenbach, N.U.F., Cohen, A.L., Miezin, F.M., Petersen, S.E., y Schlaggar, B.L. (2009). «Control networks in paediatric Tourette syndrome show immature and anomalous patterns of functional connectivity». *Brain: A Journal of Neurology*, 132(Pt 1), 225-238. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1093/brain/awn223>
- Clawson, C.C., Hartmann, J.F., y Vernier, R.L. (1966). «Electron microscopy of the effect of gram-negative endotoxin on the blood-brain barrier». *The Journal of Comparative Neurology*, 127(2), 183-198. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1002/cne.901270204>
- Cohen, D. (1972). «Magnetoencephalography: detection of the brain's electrical activity with a superconducting magnetometer». *Science (New York, N.Y.)*, 175(4022), 664-666.
- Cole, D.M., Smith, S.M., y Beckmann, C.F. (2010). «Advances and pitfalls in the analysis and interpretation of resting-state fMRI data». *Frontiers in Systems Neuroscience*, 4, 8. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.3389/fnsys.2010.00008>
- Cordes, D., Haughton, V., Carew, J. D., Arfanakis, K., & Maravilla, K. (2002). «Hierarchical clustering to measure connectivity in fMRI resting-state data». *Magnetic Resonance Imaging*, 20(4), 305-317.
- Cordes, D., Haughton, V.M., Arfanakis, K., Carew, J. D., Turski, P. A., Moritz, C. H., et al. (2001). «Frequencies contributing to functional connec-

tivity in the cerebral cortex in “resting-state” data». *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 22(7), 1326-1333.

- Cox, S.B., Woolsey, T.A., y Rovainen, C.M. (1993). «Localized dynamic changes in cortical blood flow with whisker stimulation corresponds to matched vascular and neuronal architecture of rat barrels». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 13(6), 899-913. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.113>
- Culver, J.P., Choe, R., Holboke, M.J., Zubkov, L., Durduran, T., Slemp, A., et al. (2003). «Three-dimensional diffuse optical tomography in the parallel plane transmission geometry: Evaluation of a hybrid frequency domain/continuous wave clinical system for breast imaging». *Medical Physics*, 30(2), 235-247. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1118/1.1534109>
- Dalitz, P., Harding, R., Rees, S.M., y Cock, M.L. (2003). «Prolonged reductions in placental blood flow and cerebral oxygen delivery in preterm fetal sheep exposed to endotoxin: possible factors in white matter injury after acute infection». *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 10(5), 283-290.
- Damaraju, E., Phillips, J.R., Lowe, J.R., Ohls, R., Calhoun, V.D., y Caprihan, A. (2010). «Resting-state functional connectivity differences in premature children». *Frontiers in Systems Neuroscience*, 4. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.3389/fnsys.2010.00023>
- Dammann, O., Kuban, K.C.K., y Leviton, A. (2002). «Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage, and cognitive limitations in children born preterm». *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 8(1), 46-50. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1002/mrdd.10005>
- Dammann, O., y Leviton, A. (2004). «Inflammatory brain damage in preterm newborns-dry numbers, wet lab, and causal inferences». *Early Human Development*, 79(1), 1-15. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2004.04.009>
- Damoiseaux, J.S., Beckmann, C.F., Arigita, E.J.S., Barkhof, F., Scheltens, P., Stam, C.J., et al. (2008). «Reduced resting-state brain activity in the “default network” in normal aging». *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 18(8), 1856-1864. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1093/cercor/bhm207>

- Damoiseaux, J.S., Rombouts, S. A. R.B., Barkhof, F., Scheltens, P., Stam, C.J., Smith, S.M., y Beckmann, C.F. (2006). «Consistent resting-state networks across healthy subjects». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13848-13853. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1073/pnas.0601417103>
- De Luca, M., Beckmann, C.F., De Stefano, N., Matthews, P.M., y Smith, S.M. (2006). «fMRI resting state networks define distinct modes of long-distance interactions in the human brain». *NeuroImage*, 29(4), 1359-1367. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.08.035>
- Deco, G., y Corbetta, M. (2011). «The dynamical balance of the brain at rest». *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 17(1), 107-123. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1177/1073858409354384>
- Delpy, D.T., Cope, M., Zee, P. van der, Arridge, S., Wray, S., y Wyatt, J. (1988). «Estimation of optical pathlength through tissue from direct time of flight measurement». *Physics in Medicine and Biology*, 33(12), 1433-1442. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1088/0031-9155/33/12/008>
- Devor, A., Dunn, A.K., Andermann, M.L., Ulbert, I., Boas, D.A., y Dale, A. M. (2003). «Coupling of total hemoglobin concentration, oxygenation, and neural activity in rat somatosensory cortex». *Neuron*, 39(2), 353-359.
- Dharmarajan, S., y Schuster, D.P. (2012). «Molecular Imaging of Pulmonary Gene Expression with Positron Emission Tomography [other]». En línea. Obtenido el 21 de abril de 2013 desde: <http://www.atsjournals.org/doi/full/10.1513/pats.200507-068DS>
- Ding, M., Bressler, S.L., Yang, W., y Liang, H. (2000). «Short-window spectral analysis of cortical event-related potentials by adaptive multivariate autoregressive modeling: data preprocessing, model validation, and variability assessment». *Biological Cybernetics*, 83(1), 35-45.
- Doria, V., Beckmann, C.F., Arichi, T., Merchant, N., Groppo, M., Turkheimer, F.E., et al. (2010). «Emergence of resting state networks in the pre-term human brain». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46), 20015-20020. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1073/pnas.1007921107>

- Douw, L., de Groot, M., van Dellen, E., Aronica, E., Heimans, J.J., Klein, M., et al. (2013). «Local MEG networks: The missing link between protein expression and epilepsy in glioma patients?». *NeuroImage*, 75C, 203-211. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.02.067>
- Douw, L., de Groot, M., van Dellen, E., Heimans, J.J., Ronner, H. E., Stam, C.J., y Reijneveld, J. C. (2010). «Functional Connectivity Is a Sensitive Predictor of Epilepsy Diagnosis after the First Seizure». *PLoS ONE*, 5(5), e10839. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0010839>
- Draper, B.A., Baek, K., Bartlett, M.S., y Beveridge, J.R. (2003). «Recognizing faces with PCA and ICA». *Computer Vision and Image Understanding*, 91(1-2), 115-137. En línea. Obtenido desde: [http://doi.org/10.1016/S1077-3142\(03\)00077-8](http://doi.org/10.1016/S1077-3142(03)00077-8)
- Dubeau, S., Ferland, G., Gaudreau, P., Beaumont, E., y Lesage, F. (2011). «Cerebrovascular hemodynamic correlates of aging in the Lou/C rat: A model of healthy aging». *NeuroImage*, 56(4), 1892-1901. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.03.076>
- Duncan, D.D., y Kirkpatrick, S.J. (2008). «Can laser speckle flowmetry be made a quantitative tool?». *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision*, 25(8), 2088-2094.
- Duncan, J.R., Cock, M.L., Suzuki, K., Scheerlinck, J.P.Y., Harding, R., y Rees, S.M. (2006). «Chronic endotoxin exposure causes brain injury in the ovine fetus in the absence of hypoxemia». *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 13(2), 87-96. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.jsfgi.2005.12.003>
- Dunn, A. K., Bolay, H., Moskowitz, M. A., y Boas, D. A. (2001). «Dynamic Imaging of Cerebral Blood Flow Using Laser Speckle». *J Cereb Blood Flow Metab*, 21(3), 195-201. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1097/00004647-200103000-00002>
- Dunn, A.K., Devor, A., Bolay, H., Andermann, M.L., Moskowitz, M.A., Dale, A.M., y Boas, D. A. (2003). «Simultaneous imaging of total cerebral hemoglobin concentration, oxygenation, and blood flow during functional activation». *Optics Letters*, 28(1), 28-30. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1364/OL.28.000028>
- Dunn, A. K., Devor, A., Dale, A. M., y Boas, D.A. (2005). «Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional acti-

- vation of the rat somatosensory cortex». *NeuroImage*, 27(2), 279-290. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.04.024>
- Elwell, C.E., Springett, R., Hillman, E., y Delpy, D.T. (1999). «Oscillations in cerebral haemodynamics. Implications for functional activation studies». *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 471, 57-65.
- Ephrat, P., Needles, A., Bilan, C., Trujillo, A., Theodoropoulos, C., Hirson, D., y Foster, S. (2012). *Photoacoustic Imaging of Murine Tumors Using the Vevo® 2100 Micro-Ultrasound System* (White Paper No. Ver 1.0). Toronto, ON, Canadá: VisualSonics Inc. En línea. Obtenido desde: http://www.visualsonics.com/online-file-request.php?f=media&p=WP_2100_Cb_Photoacoustic_Imaging_ver1.o.pdf
- Euler, L. (1741). «Solutio problematis ad geometriam situs pertinentis». *Commentarii academiae scientiarum Petropolitanae*, 8, 128-140.
- European Commission Workshop. (2010). «Of mice and men-are mice relevant models for human disease?». In *European Commission workshop*. Londres.
- Fabene, P.F., Weiczner, R., Marzola, P., Nicolato, E., Calderan, L., Andrioli, A., et al. (2006). «Structural and functional MRI following 4-aminopyridine-induced seizures: a comparative imaging and anatomical study». *Neurobiology of Disease*, 21(1), 80-89. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.06.013>
- Fair, D.A., Cohen, A.L., Dosenbach, N.U.F., Church, J.A., Miezin, F.M., Barch, D.M., et al. (2008). «The maturing architecture of the brain's default network». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 4028-4032. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1073/pnas.0800376105>
- Fair, D.A., Dosenbach, N.U.F., Church, J.A., Cohen, A.L., Brahmbhatt, S., Miezin, F.M., et al. (2007). «Development of distinct control networks through segregation and integration». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(33), 13507-13512. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1073/pnas.0705843104>
- Faraci, F.M. (2011). «Protecting against vascular disease in brain». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 300(5), H1566-1582. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1152/ajpheart.01310.2010>

- Feinberg, D.A., Moeller, S., Smith, S.M., Auerbach, E., Ramanna, S., Gunther, M., et al. (2010). «Multiplexed echo planar imaging for sub-second whole brain fMRI and fast diffusion imaging». *PLoS One*, 5(12), e15710. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015710>
- Fercher, A.F., Hitzenger, C.K., Kamp, G., y El-Zaiat, S.Y. (1995). Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry. *Optics Communications*, 117(1-2), 43-48. En línea. Obtenido desde: [http://doi.org/10.1016/0030-4018\(95\)00119-5](http://doi.org/10.1016/0030-4018(95)00119-5)
- Fonoff, E.T., Pereira, J.F., Jr, Camargo, L.V., Dale, C.S., Pagano, R.L., Ballester, G., y Teixeira, M.J. (2009). «Functional mapping of the motor cortex of the rat using transdural electrical stimulation». *Behavioural Brain Research*, 202(1), 138-141. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.03.018>
- Fox, M.D., y Raichle, M.E. (2007). «Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging». *Nature Reviews Neuroscience*, 8(9), 700-711. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1038/nrn2201>
- Fox, M.D., Snyder, A.Z., Zacks, J.M., y Raichle, M.E. (2006). «Coherent spontaneous activity accounts for trial-to-trial variability in human evoked brain responses». *Nature Neuroscience*, 9(1), 23-25. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1038/nn1616>
- Fox, M.D., Zhang, D., Snyder, A.Z., y Raichle, M.E. (2009). «The Global Signal and Observed Anticorrelated Resting State Brain Networks». *Journal of Neurophysiology*, 101(6), 3270-3283. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1152/jn.90777.2008>
- Fransson, P., Skiöld, B., Horsch, S., Nordell, A., Blennow, M., Lagercrantz, H., y Aden, U. (2007). «Resting-state networks in the infant brain». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15531-15536. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1073/pnas.0704380104>
- Freeman, L.C. (1977). «A Set of Measures of Centrality Based on Betweenness». *Sociometry*, 40(1), 35. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.2307/3033543>
- Frings, L., Schulze-Bonhage, A., Spreer, J., y Wagner, K. (2009). «Remote effects of hippocampal damage on default network connectivity in

- the human brain». *Journal of Neurology*, 256(12), 2021-2029. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1007/s00415-009-5233-0>
- Friston, K.J. (2011). «Functional and effective connectivity: a review». *Brain Connectivity*, 1(1), 13-36. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1089/brain.2011.0008>
- Friston, K.J., Ashburner, J.T., Kiebel, S.J., Nichols, T.E., y Penny, W.D. (2006). *Statistical Parametric Mapping: The Analysis of Functional Brain Images* (1ª ed.). Gran Bretaña: Academic Press.
- Friston, K.J., Frith, C.D., Liddle, P.F., y Frackowiak, R.S. (1993). «Functional connectivity: the principal-component analysis of large (PET) data sets». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 13(1), 5-14. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.4>
- Frostig, R.D., Lieke, E.E., Ts'o, D.Y., y Grinvald, A. (1990). «Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by *in vivo* high-resolution optical imaging of intrinsic signals». *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(16), 6082-6.
- Fujimoto, J.G., Pitris, C., Boppart, S.A., y Brezinski, M.E. (2000). «Optical Coherence Tomography: An Emerging Technology for Biomedical Imaging and Optical Biopsy». *Neoplasia*, 2(1-2), 9-25.
- Gallagher, A., Lassonde, M., Bastien, D., Vannasing, P., Lesage, F., Grova, C., et al. (2008). «Non-invasive pre-surgical investigation of a 10 year-old epileptic boy using simultaneous EEG-NIRS». *Seizure: The Journal of the British Epilepsy Association*, 17(6), 576-582. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.seizure.2008.01.009>
- Ganzetti, M., y Mantini, D. (2013). «Functional connectivity and oscillatory neuronal activity in the resting human brain». *Neuroscience*, 240, 297-309. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.032>
- Gelikonov, V.M., Kasatkina, I.V., y Shilyagin, P.A. (2010). «Suppression of image artifacts in the spectral-domain optical coherence tomography». *Radiophysics and Quantum Electronics*, 52(11), 810-821. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1007/s11141-010-9188-x>
- Ghafoori-Shiraz, H., y Okoshi, T. (1985). «Optical-fiber diagnosis using optical-frequency-domain reflectometry». *Optics Letters*, 10(3), 160-162.

- Chafoori-Shiraz, H., y Okoshi, T. (1986). «Fault location in optical fibers using optical frequency domain reflectometry». *Lightwave Technology, Journal of*, 4(3), 316-322. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1109/JLT.1986.1074720>
- Gibbs, F.A., Gibbs, E.L., y Lennox, W.G. (1937). «Epilepsy: A Paroxysmal Cerebral Dysrhythmia». *Brain*, 60(4), 377-388. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1093/brain/60.4.377>
- Gili, T., Cercignani, M., Serra, L., Perri, R., Giove, F., Maraviglia, B., et al. (2011). «Regional brain atrophy and functional disconnection across Alzheimer's disease evolution». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 82(1), 58-66. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1136/jnnp.2009.199935>
- Glisky, E.L. (2007). Changes in Cognitive Function in Human Aging. En D. Riddle (Ed.), *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*. Estados Unidos: CRC Press.
- Gonçalves, M.S., y Hall, D.A. (2003). «Connectivity analysis with structural equation modelling: an example of the effects of voxel selection». *NeuroImage*, 20(3), 1455-1467.
- Gotman, J., Grova, C., Bagshaw, A., Kobayashi, E., Aghakhani, Y., y Dubeau, F. (2005). «Generalized epileptic discharges show thalamocortical activation and suspension of the default state of the brain». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(42), 15236-15240. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1073/pnas.0504935102>
- Granger, C.W. (1969). «Investigating causal relations by econometric models and cross-spectral methods». *Econometrica: Journal of the Econometric Society*, 37(3), 424-438.
- Green, J.B., Sora, E., Bialy, Y., Ricamato, A., y Thatcher, R.W. (1998). «Cortical sensorimotor reorganization after spinal cord injury: an electroencephalographic study». *Neurology*, 50(4), 1115-1121.
- Greicius, M.D., Flores, B.H., Menon, V., Glover, G.H., Solvason, H.B., Kenna, H., et al. (2007). «Resting-state functional connectivity in major depression: abnormally increased contributions from subgenual cingulate cortex and thalamus». *Biological Psychiatry*, 62(5), 429-437. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.09.020>
- Greicius, M.D., Krasnow, B., Reiss, A.L., y Menon, V. (2003). «Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode

- hypothesis». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1), 253-258. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1073/pnas.0135058100>
- Greicius, M.D., Srivastava, G., Reiss, A.L., y Menon, V. (2004). «Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: evidence from functional MRI». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), 4637-4642. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1073/pnas.0308627101>
- Grinvald, A., Lieke, E., Frostig, R.D., Gilbert, C.D., y Wiesel, T.N. (1986). «Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals». *Nature*, 324(6095), 361-364. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1038/324361a0>
- Grubb, R.L., Jr, Raichle, M.E., Eichling, J.O., y Ter-Pogossian, M.M. (1974). «The effects of changes in PaCO₂ on cerebral blood volume, blood flow, and vascular mean transit time». *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 5(5), 630-639.
- Guevara, E., Abran, M., Belanger, S., Ouakli, N., y Lesage, F. (2010). Comparison of the performance of two depth-resolved optical imaging systems: laminar optical tomography and spatially modulated imaging. In A. P. Wax y V. Backman (Eds.), *Biomedical Applications of Light Scattering IV*. San Francisco, California: SPIE.
- Guevara, E., Berti, R., Londono, I., Xie, N., Bellec, P., Lesage, F., y Lodygensky, G.A. (2013). «Imaging of an inflammatory injury in the newborn rat brain with photoacoustic tomography». *PLoS ONE*, 8(12), e83045. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0083045>
- Guevara, E., Pouliot, P., Nguyen, D.K., y Lesage, F. (2013). «Optical imaging of acute epileptic networks in mice». *Journal of Biomedical Optics*, 18(7), 076021-076021. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1117/1.JBO.18.7.076021>
- Guevara, E., Sadekova, N., Girouard, H., y Lesage, F. (2013). «Optical imaging of resting-state functional connectivity in a novel arterial stiffness model». *Biomedical Optics Express*, 4(11), 2332-2346. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1364/BOE.4.002332>
- Guilfoyle, D.N., Gerum, S.V., Sanchez, J.L., Balla, A., Sershen, H., Javitt, D.C., y Hoptman, M. J. (2013). «Functional connectivity fMRI in mouse brain at 7T using isoflurane». *Journal of Neuroscience Methods*, 214(2),

144-148. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.01.019>

- Gusnard, D.A., Raichle, M.E., y Raichle, M.E. (2001). «Searching for a baseline: functional imaging and the resting human brain». *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10), 685-694. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1038/35094500>
- Hagberg, H., Mallard, C., y Jacobsson, B. (2005). «Role of cytokines in pre-term labour and brain injury». *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 112, 16-18. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2005.00578.x>
- Häusler, G., y Lindner, M.W. (1998). «“Coherence radar” and “spectral radar” - new tools for dermatological diagnosis». *Journal of Biomedical Optics*, 3(1), 21-31. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1117/1.429899>
- He, B.J., Snyder, A.Z., Zempel, J.M., Smyth, M.D., y Raichle, M.E. (2008). «Electrophysiological correlates of the brain's intrinsic large-scale functional architecture». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(41), 16039-16044. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1073/pnas.0807010105>
- He, Y., Chen, Z., Gong, G., y Evans, A. (2009). «Neuronal networks in Alzheimer's disease». *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 15(4), 333-350. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1177/1073858409334423>
- Hillman, E.M.C. (2006). Laminar optical tomography: high-resolution 3D functional imaging of superficial tissues. En *Proceedings of SPIE*. San Diego, CA.
- Hillman, E.M.C. (2007). «Optical brain imaging *in vivo*: techniques and applications from animal to man». *Journal of Biomedical Optics*, 12(5), 51402.
- Hillman, E.M.C., Boas, D.A., Dale, A.M., y Dunn, A.K. (2004). «Laminar optical tomography: Demonstration of millimeter-scale depth-resolved imaging in turbid media». *Opt. Lett.*, 29(14), 1650-2. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1364/ol.29.001650>
- Hillman, E.M.C., Bouchard, M., Devor, A., Crespigny, A. de, y Boas, D.A. (2006). Functional optical imaging of brain activation: a multi-scale, multi-modality approach. En *Life Science Systems and Applications Workshop, 2006. IEEE/NLM*. Bethesda, MD. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1109/LSSA.2006.250368>

- Hillman, E.M.C., y Burgess, S. A. (2008). «Sub-millimeter resolution 3D optical imaging of living tissue using laminar optical tomography». *Laser & Photonics Review*, 3(1-2), 159-179. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1002/lpor.200810031>
- Hillman, E.M.C., Devor, A., Bouchard, M.B., Dunn, A.K., Krauss, G. W., Skoch, J., et al. (2007). «Depth-resolved optical imaging and microscopy of vascular compartment dynamics during somatosensory stimulation». *NeuroImage*, 35(1), 89-104.
- Hinkley, L.B.N., Owen, J.P., Fisher, M., Findlay, A.M., Vinogradov, S., y Nagarajan, S.S. (2010). «Cognitive Impairments in Schizophrenia as Assessed Through Activation and Connectivity Measures of Magnetoencephalography (MEG) Data». *Frontiers in Human Neuroscience*, 3, 73. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.3389/neuro.09.073.2009>
- Honoré, J.C., Kooli, A., Hamel, D., Alquier, T., Rivera, J.C., Quiniou, C., et al. (2013). «Fatty acid receptor Gpr40 mediates neuromicrovascular degeneration induced by transarachidonic acids in rodents». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(5), 954-961. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300943>
- Horstmann, M.T., Bialonski, S., Noennig, N., Mai, H., Prusseit, J., Wellmer, J., et al. (2010). «State dependent properties of epileptic brain networks: comparative graph-theoretical analyses of simultaneously recorded EEG and MEG». *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 121(2), 172-185. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.clinph.2009.10.013>
- Huang, D., Swanson, E.A., Lin, C.P., Schuman, J.S., Stinson, W.G., Chang, W., et al. (1991). «Optical coherence tomography». *Science*, 254(5035), 1178-1181. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1126/science.1957169>
- Hubel, D.H., y Wiesel, T.N. (1962). «Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex». *The Journal of Physiology*, 160(1), 106-154.2.
- Hutchison, R.M., Mirsattari, S.M., Jones, C.K., Gati, J.S., y Leung, L.S. (2010). «Functional Networks in the Anesthetized Rat Brain Revealed by Independent Component Analysis of Resting-State fMRI». *Journal of Neurophysiology*, 103(6), 3398-3406. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1152/jn.00141.2010>

- Iadecola, C. (2004). «Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease». *Nature Reviews Neuroscience*, 5(5), 347-360. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1038/nrn1387>
- Iadecola, C. (2010). «The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia». *Acta Neuropathologica*, 120(3), 287-296. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1007/s00401-010-0718-6>
- Jonckers, E., Van Audekerke, J., De Visscher, G., Van der Linden, A., y Verhoye, M. (2011). «Functional Connectivity fMRI of the Rodent Brain: Comparison of Functional Connectivity Networks in Rat and Mouse». *PLoS ONE*, 6(4), e18876. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0018876>
- Jones, M., Berwick, J., Johnston, D., y Mayhew, J. (2001). «Concurrent optical imaging spectroscopy and laser-Doppler flowmetry: the relationship between blood flow, oxygenation, and volume in rodent barrel cortex». *NeuroImage*, 13(6 Pt 1), 1002-1015. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1006/nimg.2001.0808>
- Jones, P.B., Shin, H.K., Boas, D.A., Hyman, B.T., Moskowitz, M.A., Ayata, C., y Dunn, A.K. (2008). «Simultaneous multispectral reflectance imaging and laser speckle flowmetry of cerebral blood flow and oxygen metabolism in focal cerebral ischemia». *Journal of Biomedical Optics*, 13(4), 44007. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1117/1.2950312>
- Kalthoff, D., Seehafer, J. U., Po, C., Wiedermann, D., y Hoehn, M. (2011). «Functional connectivity in the rat at 11.7T: Impact of physiological noise in resting state fMRI». *NeuroImage*, 54(4), 2828-2839. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.10.053>
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., y Jessell, T.M. (1991). *Principles of neural science* (3ª ed.). Nueva York: Elsevier.
- Kannurpatti, S.S., Biswal, B.B., Kim, Y.R., y Rosen, B.R. (2008). «Spatio-temporal characteristics of low-frequency BOLD signal fluctuations in isoflurane-anesthetized rat brain». *NeuroImage*, 40(4), 1738-1747. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.05.061>
- Kim, A.D., y Schotland, J.C. (2006). «Self-consistent scattering theory for the radiative transport equation». *J. Opt. Soc. Am. A*, 23(3), 596-602. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1364/JOSAA.23.000596>

- Kohl, M., Lindauer, U., Royl, G., Kuhl, M., Gold, L., Villringer, A., y Dirnagl, U. (2000). «Physical model for the spectroscopic analysis of cortical intrinsic optical signals». *Physics in Medicine and Biology*, 45(12), 3749-3764.
- Kroon, A.A., Wang, J., Kavanagh, B., Huang, Z., Kuliszewski, M., van Goudoever, J. B., y Post, M. (2011). «Prolonged Mechanical Ventilation Induces Cell Cycle Arrest in Newborn Rat Lung». *PLoS ONE*, 6(2), e16910. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0016910>
- Kwong, K.K., Belliveau, J.W., Chesler, D.A., Goldberg, I.E., Weisskoff, R.M., Poncelet, B.P., et al. (1992). «Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12), 5675-5679.
- la Iglesia-Vaya, M. de, Molina-Mateo, J., Jose, M., S., A., y Marti-Bonmati, L. (2013). «Brain Connections - Resting State fMRI Functional Connectivity. In K. Fountas (Ed.)». *Novel Frontiers of Advanced Neuroimaging*. InTech. En línea. Obtenido desde: <http://www.intechopen.com/books/novel-frontiers-of-advanced-neuroimaging/brain-connections-resting-state-fmri-functional-connectivity>
- Latora, V., y Marchiori, M. (2001). «Efficient Behavior of Small-World Networks». *Physical Review Letters*, 87(19), 198701. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1103/PhysRevLett.87.198701>
- Lawrie, S. M., Buechel, C., Whalley, H. C., Frith, C. D., Friston, K. J., y Johnstone, E. C. (2002). «Reduced frontotemporal functional connectivity in schizophrenia associated with auditory hallucinations». *Biological Psychiatry*, 51(12), 1008-1011.
- Le, T. T., Yue, S., y Cheng, J.X. (2010). «Shedding new light on lipid biology with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy». *Journal of Lipid Research*, 51(11), 3091-3102. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1194/jlr.R008730>
- Leitgeb, R., Wojtkowski, M., Kowalczyk, A., Hitzinger, C. K., Sticker, M., y Fercher, A.F. (2000). «Spectral measurement of absorption by spectroscopic frequency-domain optical coherence tomography». *Optics Letters*, 25(11), 820-822.
- Lesage, F., Brieu, N., Dubeau, S., y Beaumont, E. (2009). «Optical imaging of vascular and metabolic responses in the lumbar spinal cord after

- T10 transection in rats». *Neuroscience Letters*, 454(1), 105-109. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.02.060>
- Lexer, F., Hitzenberger, C.K., Fercher, A.F., y Kulhavy, M. (1997). «Wavelength-tuning interferometry of intraocular distances». *Appl. Opt.*, 36(25), 6548-6553. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1364/AO.36.006548>
- Li, B., Zhou, F., Luo, Q., y Li, P. (2012). «Altered resting-state functional connectivity after cortical spreading depression in mice». *NeuroImage*, 63(3), 1171-1177. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.08.024>
- Liang, Z., King, J., y Zhang, N. (2012). «Intrinsic organization of the anesthetized brain». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(30), 10183-10191. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1020-12.2012>
- Liao, C.H., Worsley, K.J., Poline, J.B., Aston, J. A. D., Duncan, G.H., y Evans, A.C. (2002). «Estimating the delay of the fMRI response». *NeuroImage*, 16(3 Pt 1), 593-606.
- Liao, S.M., Ferradal, S.L., White, B.R., Gregg, N., Inder, T.E., y Culver, J.P. (2012). «High-density diffuse optical tomography of term infant visual cortex in the nursery». *Journal of Biomedical Optics*, 17(8), 0814141-0814147. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1117/1.JBO.17.8.081414>
- Liao, W., Zhang, Z., Pan, Z., Mantini, D., Ding, J., Duan, X., et al. (2011). «Default mode network abnormalities in mesial temporal lobe epilepsy: a study combining fMRI and DTI». *Human Brain Mapping*, 32(6), 883-895. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1002/hbm.21076>
- Liu, B., y Brezinski, M.E. (2007). «Theoretical and practical considerations on detection performance of time domain, Fourier domain, and swept source optical coherence tomography». *Journal of Biomedical Optics*, 12(4), 44007. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1117/1.2753410>
- Liu, W.C., Flax, J.F., Guise, K.G., Sukul, V., y Benasich, A.A. (2008). «Functional connectivity of the sensorimotor area in naturally sleeping infants». *Brain Research*, 1223, 42-49. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.05.054>
- Liu, Y., Liang, M., Zhou, Y., He, Y., Hao, Y., Song, M., et al. (2008). «Disrupted small-world networks in schizophrenia». *Brain: A Journal of*

- Neurology*, 131(Pt 4), 945-961. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1093/brain/awn018>
- Liu, Z., Fukunaga, M., de Zwart, J.A., y Duyn, J.H. (2010). «Large-scale spontaneous fluctuations and correlations in brain electrical activity observed with magnetoencephalography». *NeuroImage*, 51(1), 102-111. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.01.092>
- Lodygensky, G.A., West, T., Stump, M., Holtzman, D.M., Inder, T.E., y Neil, J.J. (2010). «*In vivo* MRI analysis of an inflammatory injury in the developing brain». *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(5), 759-767. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.11.005>
- Lowe, M. J., Dzemidzic, M., Lurito, J. T., Mathews, V. P., y Phillips, M. D. (2000). «Correlations in low-frequency BOLD fluctuations reflect cortico-cortical connections». *NeuroImage*, 12(5), 582-587. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1006/nimg.2000.0654>
- Lu, C.M., Zhang, Y.J., Biswal, B.B., Zang, Y.F., Peng, D.L., y Zhu, C.Z. (2010). «Use of fNIRS to assess resting state functional connectivity». *Journal of Neuroscience Methods*, 186(2), 242-249. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.11.010>
- Luckl, J., Baker, W., Sun, Z.-H., Durduran, T., Yodh, A.G., y Greenberg, J.H. (2010). «The biological effect of contralateral forepaw stimulation in rat focal cerebral ischemia: a multispectral optical imaging study». *Frontiers in Neuroenergetics*, 2, pii: 19. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.3389/fnene.2010.00019>
- Luo, C., Qiu, C., Guo, Z., Fang, J., Li, Q., Lei, X., *et al.* (2012). «Disrupted Functional Brain Connectivity in Partial Epilepsy: A Resting-State fMRI Study». *PLoS ONE*, 7(1), e28196. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0028196>
- Luo, W., Li, P., Chen, S., Zeng, S., y Luo, Q. (2007). «Differentiating hemodynamic responses in rat primary somatosensory cortex during non-noxious and noxious electrical stimulation by optical imaging». *Brain Research*, 1133(1), 67-77. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.09.111>
- Magill, P. J., Pogosyan, A., Sharott, A., Csicsvari, J., Bolam, J. P., y Brown, P. (2006). «Changes in Functional Connectivity within the Rat Striato-pallidal Axis during Global Brain Activation *In vivo*». *The Journal of Neuroscience*, 26(23), 6318-6329. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0620-06.2006>

- Magnuson, M., Majeed, W., y Keilholz, S. D. (2010). «Functional connectivity in blood oxygenation level-dependent and cerebral blood volume-weighted resting state functional magnetic resonance imaging in the rat brain». *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI*, 32(3), 584-592. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1002/jmri.22295>
- Malonek, D., y Grinvald, A. (1996). «Interactions Between Electrical Activity and Cortical Microcirculation Revealed by Imaging Spectroscopy: Implications for Functional Brain Mapping». *Science*, 272(5261), 551-554. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1126/science.272.5261.551>
- Mankinen, K., Jalovaara, P., Paakki, J.J., Harila, M., Rytty, S., Tervonen, O., et al. (2012). «Connectivity disruptions in resting-state functional brain networks in children with temporal lobe epilepsy». *Epilepsy Research*, 100(1-2), 168-178. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2012.02.010>
- Margulies, D. S., Böttger, J., Long, X., Lv, Y., Kelly, C., Schäfer, A., et al. (2010). «Resting developments: a review of fMRI post-processing methodologies for spontaneous brain activity». *Magma (Nueva York)*, 23(5-6), 289-307. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1007/s10334-010-0228-5>
- Marshall, R.S., y Lazar, R.M. (2011). «Pumps, aqueducts, and drought management: vascular physiology in vascular cognitive impairment». *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 42(1), 221-226. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.595645>
- Marshall, R.S., Lazar, R.M., Pile-Spellman, J., Young, W.L., Duong, D.H., Joshi, S., y Ostapovich, N. (2001). «Recovery of brain function during induced cerebral hypoperfusion». *Brain: A Journal of Neurology*, 124(Pt 6), 1208-1217.
- Mayhew, J., Johnston, D., Berwick, J., Jones, M., Coffey, P., y Zheng, Y. (2000). «Spectroscopic Analysis of Neural Activity in Brain: Increased Oxygen Consumption Following Activation of Barrel Cortex». *NeuroImage*, 12(6), 664-675. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1006/nimg.2000.0656>
- McKeown, M. J., Hansen, L. K., y Sejnowski, T. J. (2003). «Independent component analysis of functional MRI: what is signal and what is noise?». *Current Opinion in Neurobiology*, 13(5), 620-629. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.conb.2003.09.012>

- Mesquita, R.C., Franceschini, M. A., y Boas, D.A. (2010). «Resting state functional connectivity of the whole head with near-infrared spectroscopy». *Biomedical Optics Express*, 1(1), 324-336. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1364/BOE.1.000324>
- Moeller, S., Nallasamy, N., Tsao, D.Y., y Freiwald, W.A. (2009). «Functional connectivity of the macaque brain across stimulus and arousal states». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(18), 5897-5909. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0220-09.2009>
- Moldestad, O., Karlsen, P., Molden, S., y Storm, J. F. (2009). «Tracheotomy improves experiment success rate in mice during urethane anesthesia and stereotaxic surgery». *Journal of Neuroscience Methods*, 176(2), 57-62. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.08.015>
- Mormann, F., Kreuz, T., Andrzejak, R.G., David, P., Lehnertz, K., y Elger, C.E. (2003). «Epileptic seizures are preceded by a decrease in synchronization». *Epilepsy Research*, 53(3), 173-185.
- Morrell, F., y de Toledo-Morrell, L. (1999). «From mirror focus to secondary epileptogenesis in man: an historical review». *Advances in Neurology*, 81, 11-23.
- Mosso, A. (1884). «Applicazione della bilancia allo studio della circolazione sanguigna dell'uomo». *Atti Della R Acad Lincei Mem Cl Sci Fis Mat Nat*, 19, 531-543.
- Murphy, K., Birn, R.M., y Bandettini, P.A. (2013). «Resting-state fMRI confounds and cleanup». *NeuroImage*, 80, 349-359. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.04.001>
- Murphy, K., Birn, R.M., Handwerker, D.A., Jones, T.B., y Bandettini, P.A. (2009). «The impact of global signal regression on resting state correlations: Are anti-correlated networks introduced?». *NeuroImage*, 44(3), 893-905. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.09.036>
- Nguyen, D.K., Tremblay, J., Pouliot, P., Vannasing, P., Florea, O., Carmant, L., et al. (2012). «Non-invasive continuous EEG-fNIRS recording of temporal lobe seizures». *Epilepsy Research*, 99(1-2), 112-126. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.10.035>

- Nicholson, C. (1985). «Diffusion from an injected volume of a substance in brain tissue with arbitrary volume fraction and tortuosity». *Brain Research*, 333(2), 325-329.
- Nir, Y., Mukamel, R., Dinstein, I., Privman, E., Harel, M., Fisch, L., *et al.* (2008). «Interhemispheric correlations of slow spontaneous neuronal fluctuations revealed in human sensory cortex». *Nature Neuroscience*, 11(9), 1100-1108.
- Niu, H., Khadka, S., Tian, F., Lin, Z.J., Lu, C., Zhu, C., y Liu, H. (2011). «Resting-state functional connectivity assessed with two diffuse optical tomographic systems». *Journal of Biomedical Optics*, 16(4), 46006. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1117/1.3561687>
- Obrig, H., Neufang, M., Wenzel, R., Kohl, M., Steinbrink, J., Einhäupl, K., y Villringer, A. (2000). «Spontaneous low frequency oscillations of cerebral hemodynamics and metabolism in human adults». *NeuroImage*, 12(6), 623-639. <http://doi.org/10.1006/nimg.2000.0657>
- Ogawa, S., Lee, T. M., Kay, A. R., y Tank, D. W. (1990). «Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(24), 9868-9872.
- Ogawa, S., Tank, D.W., Menon, R., Ellermann, J.M., Kim, S.G., Merkle, H., y Ugurbil, K. (1992). «Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13), 5951-5955.
- O'Leary, M.A., Boas, D.A., Chance, B., y Yodh, A.G. (1995). «Experimental images of heterogeneous turbid media by frequency-domain diffusing-photon tomography». *Optics Letters*, 20(5), 426-428. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1364/OL.20.000426>
- Oppenheim, A.V., Schafer, R.W., y Buck, J.R. (1999). *Discrete-time signal processing* (2ª ed.). Upper Saddle River: Prentice Hall. En línea. Obtenido desde: <http://www.amazon.ca/Discrete-Time-Signal-Processing-Alan-Oppenheim/dp/0137549202>
- Ouakli, N., Guevara, E., Dubeau, S., Beaumont, E., y Lesage, F. (2010). «Laminar optical tomography of the hemodynamic response in the lumbar spinal cord of rats». *Optics Express*, 18(10), 10068-10077. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1364/OE.18.010068>

- Pang, Y., Cai, Z., y Rhodes, P.G. (2003). «Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide». *Brain Research. Developmental Brain Research*, 140(2), 205-214.
- Pase, M.P., Herbert, A., Grima, N.A., Pipingas, A., y O'Rourke, M. F. (2012). «Arterial stiffness as a cause of cognitive decline and dementia: a systematic review and meta-analysis». *Internal Medicine Journal*, 42(7), 808-815. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2011.02645.x>
- Pasquale, F. de, Penna, S. D., Snyder, A. Z., Lewis, C., Mantini, D., Marzetti, L., et al. (2010). «Temporal dynamics of spontaneous MEG activity in brain networks». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(13), 6040-6045. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1073/pnas.0913863107>
- Pawela, C. P., Biswal, B.B., Cho, Y.R., Kao, D.S., Li, R., Jones, S. R., et al. (2008). «Resting-state functional connectivity of the rat brain». *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 59(5), 1021-1029. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1002/mrm.21524>
- Pawela, C.P., Biswal, B.B., Hudetz, A.G., Li, R., Jones, S.R., Cho, Y.R., et al. (2010). «Interhemispheric neuroplasticity following limb deafferentation detected by resting-state functional connectivity magnetic resonance imaging (fcMRI) and functional magnetic resonance imaging (fMRI)». *NeuroImage*, 49(3), 2467-2478. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.09.054>
- Pawela, C.P., Biswal, B.B., Hudetz, A.G., Schulte, M.L., Li, R., Jones, S.R., et al. (2009). «A protocol for use of medetomidine anesthesia in rats for extended studies using task-induced BOLD contrast and resting-state functional connectivity». *NeuroImage*, 46(4), 1137-1147. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.03.004>
- Paxinos, G., y Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6ª ed.). Londres: Academic Press.
- Peltier, S.J., Polk, T.A., y Noll, D.C. (2003). «Detecting low-frequency functional connectivity in fMRI using a self-organizing map (SOM) algorithm». *Human Brain Mapping*, 20(4), 220-226. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1002/hbm.10144>

- Pendlebury, J.D., Wilson, R.J.A., Bano, S., Lumb, K.J., Schneider, J.M., y Hasan, S. U. (2008). «Respiratory Control in Neonatal Rats Exposed to Prenatal Cigarette Smoke». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177(11), 1255-1261. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1164/rccm.200711-1739OC>
- Petrella, J.R. (2011). «Use of Graph Theory to Evaluate Brain Networks: A Clinical Tool for a Small World?». *Radiology*, 259(2), 317-320. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1148/radiol.11110380>
- Petzold, G.C., y Murthy, V.N. (2011). «Role of astrocytes in neurovascular coupling». *Neuron*, 71(5), 782-797. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.009>
- Ponten, S.C., Bartolomei, F., y Stam, C.J. (2007). «Small-world networks and epilepsy: graph theoretical analysis of intracerebrally recorded mesial temporal lobe seizures». *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 118(4), 918-927. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.clinph.2006.12.002>
- Pouliot, P., Tremblay, J., Robert, M., Vannasing, P., Lepore, F., Lassonde, M., et al. (2012). «Nonlinear hemodynamic responses in human epilepsy: a multimodal analysis with fNIRS-EEG and fMRI-EEG». *Journal of Neuroscience Methods*, 204(2), 326-340. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.11.016>
- Power, J.D., Barnes, K.A., Snyder, A.Z., Schlaggar, B.L., y Petersen, S.E. (2012). «Spurious but systematic correlations in functional connectivity MRI networks arise from subject motion». *NeuroImage*, 59(3), 2142-2154. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.10.018>
- Prahl, S. (1999). «Optical Absorption of Hemoglobin». En línea. Obtenido el 8 de octubre de 2009 desde: <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/>
- Prince, J.L., y Links, J. (2005). *Medical Imaging Signals and Systems* (1ª ed.). Upper Saddle River: Prentice Hall.
- Pukelsheim, F. (1994). «The Three Sigma Rule». *The American Statistician*, 48(2), 88. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.2307/2684253>
- Raichle, M.E. (1998). «Behind the scenes of functional brain imaging: A historical and physiological perspective». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(3), 765-772.

- Raichle, M.E. (2010). «Two views of brain function». *Trends in Cognitive Sciences*, 14(4), 180-190. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.tics.2010.01.008>
- Raichle, M.E. (2011). «The Restless Brain». *Brain Connectivity*, 1(1), 3-12. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1089/brain.2011.0019>
- Raichle, M. E., MacLeod, A.M., Snyder, A. Z., Powers, W. J., Gusnard, D. A., y Shulman, G.L. (2001). «A default mode of brain function». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(2), 676-682. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1073/pnas.98.2.676>
- Ramachandra, R., y Subramanian, T. (2011). *Atlas of the Neonatal Rat Brain* (1ª ed.). CRC Press.
- Ren, H., Sun, T., MacDonald, D. J., Cobb, M.J., y Li, X. (2006). «Real-time *in vivo* blood-flow imaging by moving-scatterer-sensitive spectral-domain optical Doppler tomography». *Optics Letters*, 31(7), 927-929. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1364/OL.31.000927>
- Righi, M., Barcaro, U., Starita, A., Karakonstantaki, E., y Micheloyannis, S. (2008). «Detection of signs of brain dysfunction in epileptic children by recognition of transient changes in the correlation of seizure-free EEG». *Brain Topography*, 21(1), 43-51. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1007/s10548-008-0057-2>
- Roberts, R.O., Knopman, D.S., Geda, Y.E., Cha, R.H., Roger, V.L., y Petersen, R.C. (2010). «Coronary heart disease is associated with non-amnesic mild cognitive impairment». *Neurobiology of Aging*, 31(11), 1894-1902. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.10.018>
- Rombouts, S.A.R.B., Damoiseaux, J.S., Goekoop, R., Barkhof, F., Scheltens, P., Smith, S.M., y Beckmann, C.F. (2009). «Model-free group analysis shows altered BOLD fMRI networks in dementia». *Human Brain Mapping*, 30(1), 256-266. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1002/hbm.20505>
- Rothman, K.J. (1990). «No adjustments are needed for multiple comparisons». *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 1(1), 43-46.
- Saad, Z.S., DeYoe, E.A., y Ropella, K.M. (2003). «Estimation of fMRI response delays». *NeuroImage*, 18(2), 494-504.
- Saad, Z.S., Ropella, K.M., DeYoe, E.A., y Bandettini, P.A. (2003). «The spatial extent of the BOLD response». *NeuroImage*, 19(1), 132-144.

- Sadekova, N., Vallerand, D., Guevara, E., Lesage, F., y Girouard, H. (2013). «Carotid calcification in mice: a new model to study the effects of arterial stiffness on the brain». *Journal of the American Heart Association*, 2(3), e000224. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1161/JAHA.113.000224>
- Salvador, R., Martínez, A., Pomarol-Clotet, E., Sarró, S., Suckling, J., y Bullmore, E. (2007). «Frequency based mutual information measures between clusters of brain regions in functional magnetic resonance imaging». *NeuroImage*, 35(1), 83-88. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.12.001>
- Sandrone, S., Bacigaluppi, M., Galloni, M.R., Cappa, S.F., Moro, A., Catani, M., et al. (2013). «Weighing brain activity with the balance: Angelo Mosso's original manuscripts come to light». *Brain: A Journal of Neurology*. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1093/brain/awt091>
- Sanz-Arigita, E.J., Schoonheim, M.M., Damoiseaux, J.S., Rombouts, S.A.R.B., Maris, E., Barkhof, F., et al. (2010). «Loss of "Small-World" Networks in Alzheimer's Disease: Graph Analysis of fMRI Resting-State Functional Connectivity». *PLoS ONE*, 5(11), e13788. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0013788#pone.0013788-Watts1>
- Saramäki, J., Kivela, M., Onnela, J.P., Kaski, K., y Kertész, J. (2007). «Generalizations of the clustering coefficient to weighted complex networks». *Physical Review E*, 75(2), 27105. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1103/PhysRevE.75.027105>
- Sasai, S., Homae, F., Watanabe, H., y Taga, G. (2011). «Frequency-specific functional connectivity in the brain during resting state revealed by NIRS». *NeuroImage*, 56(1), 252-257. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.12.075>
- Sasaki, S., Sato, K., Shinomiya, K., y Momose-Sato, Y. (2003). «Postnatal changes in intrinsic optical responses to peripheral nerve stimulation in the *in vivo* rat spinal cord». *NeuroImage*, 20(4), 2126-2134. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2003.08.005>
- Sasaki, S., Yazawa, I., Miyakawa, N., Mochida, H., Shinomiya, K., Kamino, K., et al. (2002). «Optical Imaging of Intrinsic Signals Induced by Peripheral Nerve Stimulation in the *in vivo* Rat Spinal Cord». *NeuroImage*, 17(3), 1240-1255. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1006/nimg.2002.1286>

- Saville, D.J. (1990). «Multiple Comparison Procedures: The Practical Solution». *The American Statistician*, 44(2), 174. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.2307/2684163>
- Schindler, K., Leung, H., Elger, C.E., y Lehnertz, K. (2007). «Assessing seizure dynamics by analysing the correlation structure of multichannel intracranial EEG». *Brain: A Journal of Neurology*, 130(Pt 1), 65-77. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1093/brain/awl304>
- Schroeter, M.L., Schmiedel, O., y von Cramon, D.Y. (2004). «Spontaneous low-frequency oscillations decline in the aging brain». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 24(10), 1183-1191. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1097/01.WCB.0000135231.90164.40>
- Seghier, M.L., Lazeyras, F., y Huppi, P.S. (2006). «Functional MRI of the newborn». *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 11(6), 479-488. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.siny.2006.07.007>
- Shmuel, A., Augath, M., Oeltermann, A., y Logothetis, N.K. (2006). «Negative functional MRI response correlates with decreases in neuronal activity in monkey visual area V1». *Nature Neuroscience*, 9(4), 569-577. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1038/nn1675>
- Shmuel, A., y Leopold, D.A. (2008). «Neuronal correlates of spontaneous fluctuations in fMRI signals in monkey visual cortex: Implications for functional connectivity at rest». *Human Brain Mapping*, 29(7), 751-761. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1002/hbm.20580>
- Singh-Manoux, A., Britton, A.R., y Marmot, M. (2003). «Vascular disease and cognitive function: evidence from the Whitehall II Study». *Journal of the American Geriatrics Society*, 51(10), 1445-1450.
- Sirinyan, M., Sennlaub, F., Dorfman, A., Sapielha, P., Gobeil, F., Jr, Hardy, P., et al. (2006). «Hyperoxic exposure leads to nitrate stress and ensuing microvascular degeneration and diminished brain mass and function in the immature subject». *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 37(11), 2807-2815. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1161/01.STR.0000245082.19294.ff>
- Sizonenko, S. V., Sirimanne, E., Mayall, Y., Gluckman, P.D., Inder, T., y Williams, C. (2003). «Selective cortical alteration after hypoxic-ischemic injury in the very immature rat brain». *Pediatric Research*, 54(2), 263-269. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1203/01.PDR.0000072517.01207.87>

- Smith, S.M., Beckmann, C.F., Andersson, J., Auerbach, E.J., Bijsterbosch, J., Douaud, G., *et al.* (2013). «Resting-state fMRI in the Human Connectome Project». *NeuroImage*, 80, 144-168. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.05.039>
- Smotherman, W.P., Robinson, S.R., Ronca, A.E., Alberts, J. R., y Hepper, P.G. (1991). Heart rate response of the rat fetus and neonate to a chemosensory stimulus. *Physiology & Behavior*, 50(1), 47-52.
- Smyser, C.D., Inder, T.E., Shimony, J. S., Hill, J.E., Degnan, A.J., Snyder, A.Z., y Neil, J.J. (2010). «Longitudinal analysis of neural network development in preterm infants». *Cerebral Cortex*, 20(12), 2852-2862. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1093/cercor/bhq035>
- Smyser, C.D., Snyder, A.Z., y Neil, J.J. (2011). «Functional Connectivity MRI in Infants: Exploration of the Functional Organization of the Developing Brain». *NeuroImage*, 56(3), 1437-1452. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.02.073>
- Smyser, C.D., Snyder, A.Z., Shimony, J.S., Blazey, T.M., Inder, T.E., y Neil, J.J. (2013). «Effects of white matter injury on resting state FMRI measures in prematurely born infants». *PLoS One*, 8(7), e68098. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0068098>
- Srinivasan, V. J., Sakadžić, S., Gorczynska, I., Ruvinskaya, S., Wu, W., Fujimoto, J.G., y Boas, D.A. (2010). «Quantitative cerebral blood flow with optical coherence tomography». *Optics Express*, 18(3), 2477-2494.
- Stam, C.J., Jones, B.F., Nolte, G., Breakspear, M., y Scheltens, P. (2007). «Small-World Networks and Functional Connectivity in Alzheimer's Disease». *Cerebral Cortex*, 17(1), 92-99. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1093/cercor/bhj127>
- Stam, C.J., y Reijneveld, J.C. (2007). «Graph theoretical analysis of complex networks in the brain». *Nonlinear Biomedical Physics*, 1(1), 3. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1186/1753-4631-1-3>
- Stevenson, I.H., y Körding, K.P. (2010). «On the Similarity of Functional Connectivity between Neurons Estimated across Timescales». *PLoS ONE*, 5(2), e9206. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0009206>
- Suckow, M.A., Danneman, P., y Brayton, C. (2001). *The laboratory mouse*. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- Sun, J., Tong, S., y Yang, G.Y. (2011). «Reorganization of Brain Networks in Aging and Age-related Diseases». *Aging and Disease*, 3(2), 181-193.

- Sun, Y., Qin, L., Zhou, Y., Xu, Q., Qian, L., Tao, J., y Xu, J. (2011). «Abnormal functional connectivity in patients with vascular cognitive impairment, no dementia: a resting-state functional magnetic resonance imaging study». *Behavioural Brain Research*, 223(2), 388-394. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.05.006>
- Taga, G., Konishi, Y., Maki, A., Tachibana, T., Fujiwara, M., y Koizumi, H. (2000). «Spontaneous oscillation of oxy- and deoxy- hemoglobin changes with a phase difference throughout the occipital cortex of newborn infants observed using non-invasive optical topography». *Neuroscience Letters*, 282(1-2), 101-104.
- Tearney, G.J., Brezinski, M.E., Bouma, B.E., Boppart, S.A., Pitris, C., Southern, J.F., y Fujimoto, J.G. (1997). «*In vivo* Endoscopic Optical Biopsy with Optical Coherence Tomography». *Science*, 276(5321), 2037-2039. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1126/science.276.5321.2037>
- Teichert, T., Grinband, J., Hirsch, J., y Ferrera, V.P. (2010). «Effects of heart-beat and respiration on macaque fMRI: implications for functional connectivity». *Neuropsychologia*, 48(7), 1886-1894. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2009.11.026>
- Thatcher RW, Krause PJ, y Hrybyk M. (1986). «Cortico-cortical associations and EEG coherence: a two-compartmental model». *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 64(2), 123-43.
- The FIL methods group. (2010). SPM - Statistical Parametric Mapping. En línea. Obtenido el 26 de marzo de 2010 desde: <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>
- Thevenaz, P., Ruttimann, U.E., y Unser, M. (1998). «A pyramid approach to subpixel registration based on intensity». *IEEE Transactions on Image Processing*, 7(1), 27-41. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1109/83.650848>
- Thorvaldsen, S., Flå, T., y Willassen, N.P. (2010). «DeltaProt: a software toolbox for comparative genomics». *BMC Bioinformatics*, 11(1), 573. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1186/1471-2105-11-573>
- Toronov, V., Franceschini, M.A., Filiaci, M., Fantini, S., Wolf, M., Michalos, A., y Gratton, E. (2000). «Near-infrared study of fluctuations in cerebral hemodynamics during rest and motor stimulation: temporal analysis and spatial mapping». *Medical Physics*, 27(4), 801-815.
- Ts'o, D.Y., Frostig, R.D., Lieke, E.E., y Grinvald, A. (1990). «Functional organization of primate visual cortex revealed by high resolution opti-

- cal imaging». *Science*, 249(4967), 417-420. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1126/science.2165630>
- van den Heuvel, M. P., & Hulshoff Pol, H. E. (2010). «Exploring the brain network: A review on resting-state fMRI functional connectivity». *European Neuropsychopharmacology*, 20(8), 519-534. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2010.03.008>
- Van Dijk, K.R.A., Hedden, T., Venkataraman, A., Evans, K. C., Lazar, S.W., y Buckner, R.L. (2010). «Intrinsic Functional Connectivity As a Tool For Human Connectomics: Theory, Properties, and Optimization». *Journal of Neurophysiology*, 103(1), 297-321. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1152/jn.00783.2009>
- Van Dijk, K.R.A., Sabuncu, M.R., y Buckner, R.L. (2012). «The influence of head motion on intrinsic functional connectivity MRI». *NeuroImage*, 59(1), 431-438. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.07.044>
- van Meer, M.P.A., van der Marel, K., Otte, W.M., Berkelbach van der Sprenkel, J.W., y Dijkhuizen, R.M. (2010). «Correspondence between altered functional and structural connectivity in the contralesional sensorimotor cortex after unilateral stroke in rats: a combined resting-state functional MRI and manganese-enhanced MRI study». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30(10), 1707-1711. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.124>
- van Norden, A.G., de Laat, K.F., Gons, R.A., van Uden, I.W., van Dijk, E.J., van Oudheusden, L. J., et al. (2011). «Causes and consequences of cerebral small vessel disease. The RUN DMC study: a prospective cohort study. Study rationale and protocol». *BMC Neurology*, 11, 29. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1186/1471-2377-11-29>
- Verhagen, E.A., Keating, P., ter Horst, H.J., Martijn, A., y Bos, A. F. (2009). «Cerebral oxygen saturation and extraction in preterm infants with transient periventricular echodensities». *Pediatrics*, 124(1), 294-301. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1542/peds.2008-2057>
- Vincent, J.L., Patel, G.H., Fox, M.D., Snyder, A.Z., Baker, J.T., Van Essen, D.C., et al. (2007). «Intrinsic functional architecture in the anaesthetized monkey brain». *Nature*, 447(7140), 83-86. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1038/nature05758>

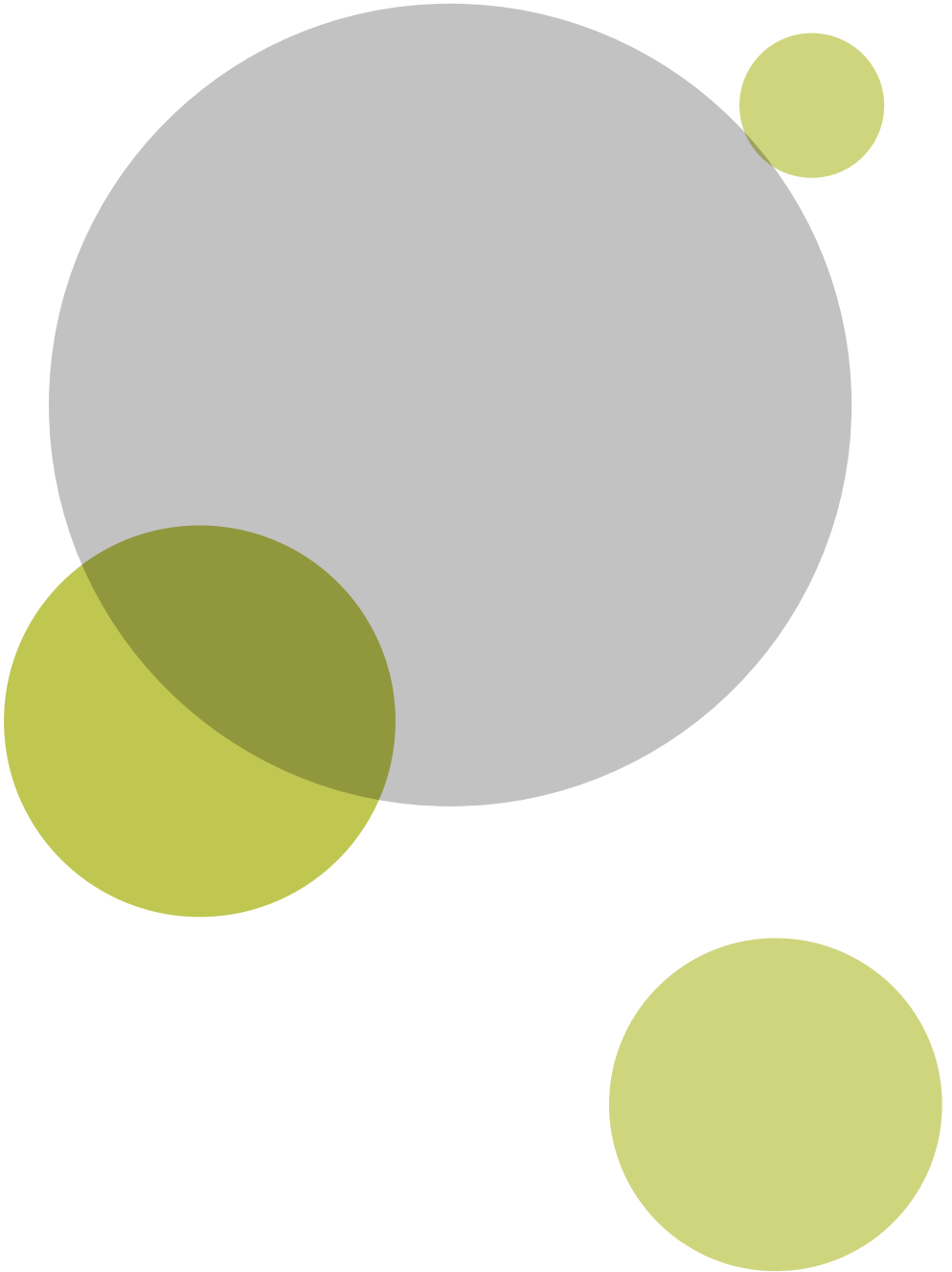
- Vogel, C.R. (2002). *Computational methods for inverse problems*. Philadelphia: Society for Industrial and Applied Mathematics.
- Voges, N., Blanchard, S., Wendling, F., David, O., Benali, H., Papadopoulou, T., et al. (2012). «Modeling of the neurovascular coupling in epileptic discharges». *Brain Topography*, 25(2), 136-156. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1007/s10548-011-0190-1>
- Waites, A.B., Briellmann, R.S., Saling, M.M., Abbott, D.F., y Jackson, G.D. (2006). «Functional connectivity networks are disrupted in left temporal lobe epilepsy». *Annals of Neurology*, 59(2), 335-343. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1002/ana.20733>
- Wang, K.C., Fan, L.W., Kaizaki, A., Pang, Y., Cai, Z., y Tien, L.T. (2013). «Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats». *Neuroscience*, 234, 146-157. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.049>
- Wang, L.V., y Hu, S. (2012). «Photoacoustic Tomography: *In vivo* Imaging from Organelles to Organs». *Science*, 335(6075), 1458-1462. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1126/science.1216210>
- Wang, L.V., y Wu, H.I. (2007). *Biomedical Optics: Principles and Imaging*. Estados Unidos: John Wiley & Sons.
- Wang, X., Pang, Y., Ku, G., Xie, X., Stoica, G., y Wang, L.V. (2003). «Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional *in vivo* imaging of the brain». *Nature Biotechnology*, 21(7), 803-806. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1038/nbt839>
- Wang, X., Xie, X., Ku, G., Wang, L.V., y Stoica, G. (2006). «Noninvasive imaging of hemoglobin concentration and oxygenation in the rat brain using high-resolution photoacoustic tomography». *Journal of Biomedical Optics*, 11(2), 24015. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1117/1.2192804>
- Wang, Z., Lu, G., Zhang, Z., Zhong, Y., Jiao, Q., Zhang, Z., et al. (2011). «Altered resting state networks in epileptic patients with generalized tonic-clonic seizures». *Brain Research*, 1374, 134-141. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.034>
- Watson, C., Paxinos, G., y Puelles, L. (2011). *The Mouse Nervous System*. Burlington: Elsevier Science. En línea. Obtenido desde: <http://public.eblib.com/EBLPublic/PublicView.do?ptilID=787248>

- Weissenbacher, A., Kasess, C., Gerstl, F., Lanzenberger, R., Moser, E., y Windischberger, C. (2009). «Correlations and anticorrelations in resting-state functional connectivity MRI: a quantitative comparison of preprocessing strategies». *NeuroImage*, 47(4), 1408-1416. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.05.005>
- Wendling, F., Hernández, A., Bellanger, J.J., Chauvel, P., y Bartolomei, F. (2005). «Interictal to ictal transition in human temporal lobe epilepsy: insights from a computational model of intracerebral EEG». *Journal of Clinical Neurophysiology: Official Publication of the American Electroencephalographic Society*, 22(5), 343-356.
- White, B.R. (2012). *Developing High-Density Diffuse Optical Tomography for Neuroimaging* (PhD dissertation). Missouri, Estados Unidos: Washington University in St. Louis.
- White, B.R., Bauer, A.Q., Snyder, A.Z., Schlaggar, B.L., Lee, J.M., y Culver, J.P. (2011). «Imaging of functional connectivity in the mouse brain». *PLoS ONE*, 6(1), e16322. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0016322>
- White, B.R., Liao, S.M., Ferradal, S.L., Inder, T.E., y Culver, J.P. (2012). «Bedside optical imaging of occipital resting-state functional connectivity in neonates». *NeuroImage*, 59(3), 2529-2538. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.08.094>
- White, B.R., Snyder, A.Z., Cohen, A.L., Petersen, S.E., Raichle, M.E., Schlaggar, B.L., y Culver, J.P. (2009). «Resting-state functional connectivity in the human brain revealed with diffuse optical tomography». *NeuroImage*, 47(1), 148-156. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.03.058>
- Whitfield-Gabrieli, S., y Nieto-Castanon, A. (2012). «Conn: a functional connectivity toolbox for correlated and anticorrelated brain networks». *Brain Connectivity*, 2(3), 125-141. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1089/brain.2012.0073>
- Whitfield-Gabrieli, S., Thermenos, H.W., Milanovic, S., Tsuang, M.T., Faraone, S.V., McCarley, R.W., et al. (2009). «Hyperactivity and hyperconnectivity of the default network in schizophrenia and in first-degree relatives of persons with schizophrenia». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), 1279-1284. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1073/pnas.0809141106>

- Willis, W.D., y Coggeshall, R.E. (1991). *Sensory mechanisms of the spinal cord* (2ª ed.). Nueva York: Plenum Press.
- Wojtkowski, M., Leitgeb, R., Kowalczyk, A., Bajraszewski, T., y Fercher, A.F. (2002). «*In vivo* human retinal imaging by Fourier domain optical coherence tomography». *Journal of Biomedical Optics*, 7(3), 457. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1117/1.1482379>
- Wojtkowski, M., Srinivasan, V., Ko, T., Fujimoto, J., Kowalczyk, A., y Duker, J. (2004). «Ultrahigh-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation». *Optics Express*, 12(11), 2404-2422. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1364/OPEX.12.002404>
- Wolf, U., Toronov, V., Choi, J. H., Gupta, R., Michalos, A., Gratton, E., y Wolf, M. (2011). «Correlation of functional and resting state connectivity of cerebral oxy-, deoxy-, and total hemoglobin concentration changes measured by near-infrared spectrophotometry». *Journal of Biomedical Optics*, 16(8). En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1117/1.3615249>
- World Health Organization. (2006). *Neurological Disorders: Public Health Challenges*. Geneva: WHO Press. En línea. Obtenido desde: http://www.who.int/mental_health/publications/neurological_disorders_ph_challenges/en/
- World Health Organization. (2012). *World Health Statistics 2012*. Geneva: WHO Press. Retrieved from http://www.who.int/healthinfo/EN_WHS_2012_Full.pdf
- Worsley, K.J., Chen, J.I., Lerch, J., y Evans, A.C. (2005). «Comparing functional connectivity via thresholding correlations and singular value decomposition». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1457), 913-920. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1098/rstb.2005.1637>
- Xiang, L., Ji, L., Zhang, T., Wang, B., Yang, J., Zhang, Q., et al. (2012). «Noninvasive real time tomographic imaging of epileptic foci and networks». *NeuroImage*, 66C, 240-248. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.10.077>
- Yaroslavsky, A.N., Schulze, P.C., Yaroslavsky, I.V., Schober, R., Ulrich, F., y Schwarzmaier, H.-J. (2002). «Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues *in vitro* in the visible and near infrared

- spectral range». *Physics in Medicine and Biology*, 47(12), 2059-2073. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1088/0031-9155/47/12/305>
- Young, R.S.K., Yagel, S.K., y Towfighi, J. (1983). «Systemic and Neuropathologic Effects of E. coli Endotoxin in Neonatal Dogs». *Pediatric Research*, 17(5), 349-353. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1203/00006450-198305000-00008>
- Yu, H., Schummers, J., y Sur, M. (2010). The Influence of Astrocyte Activation on Hemodynamic Signals for Functional Brain Imaging. In A. W. Roe (Ed.), *Imaging the Brain with Optical Methods*. Nueva York. En línea. Obtenido desde: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-0452-2_3
- Yuan, B., Burgess, S.A., Iranmahboob, A., Bouchard, M.B., Lehrer, N., Bordier, C., y Hillman, E.M.C. (2009). «A system for high-resolution depth-resolved optical imaging of fluorescence and absorption contrast». *Review of Scientific Instruments*, 80(4), 43706. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1063/1.3117204>
- Yuan, S., Devor, A., Boas, D.A., y Dunn, A.K. (2005). «Determination of optimal exposure time for imaging of blood flow changes with laser speckle contrast imaging». *Applied Optics*, 44(10), 1823-1830.
- Zago, S., Lorusso, L., Ferrucci, R., y Priori, A. (2012). Functional Neuroimaging: A Historical Perspective. In P. Bright (Ed.), *Neuroimaging - Methods*. InTech. En línea. Obtenido desde: <http://www.intechopen.com/books/neuroimaging-methods/the-origins-of-functional-neuroimaging-techniques>
- Zappe, A.C., Uludag, K., Oeltermann, A., Ugurbil, K., y Logothetis, N.K. (2008). «The Influence of Moderate Hypercapnia on Neural Activity in the Anesthetized Nonhuman Primate». *Cereb. Cortex*, 18(11), 2666-2673. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1093/cercor/bhno23>
- Zhang, H., Zhang, Y.J., Lu, C.-M., Ma, S.Y., Zang, Y.F., y Zhu, C.Z. (2010). «Functional connectivity as revealed by independent component analysis of resting-state fNIRS measurements». *NeuroImage*, 51(3), 1150-1161. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.02.080>
- Zhang, Z., Lu, G., Zhong, Y., Tan, Q., Yang, Z., Liao, W., et al. (2009). «Impaired attention network in temporal lobe epilepsy: a resting fMRI study». *Neuroscience Letters*, 458(3), 97-101. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.04.040>

- Zhao, F., Zhao, T., Zhou, L., Wu, Q., y Hu, X. (2008). «BOLD study of stimulation-induced neural activity and resting-state connectivity in medetomidine-sedated rat». *NeuroImage*, 39(1), 248-260. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.07.063>
- Zhao, M., Ma, H., Suh, M., y Schwartz, T.H. (2009). «Spatiotemporal Dynamics of Perfusion and Oximetry during Ictal Discharges in the Rat Neocortex». *The Journal of Neuroscience*, 29(9), 2814-2823. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4667-08.2009>
- Zhao, M., Nguyen, J., Ma, H., Nishimura, N., Schaffer, C.B., y Schwartz, T.H. (2011). «Preictal and ictal neurovascular and metabolic coupling surrounding a seizure focus». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(37), 13292-13300. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2597-11.2011>
- Zhao, M., Suh, M., Ma, H., Perry, C., Geneslaw, A., y Schwartz, T.H. (2007). «Focal increases in perfusion and decreases in hemoglobin oxygenation precede seizure onset in spontaneous human epilepsy». *Epilepsia*, 48(11), 2059-2067. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01229.x>
- Zhu, Y., Lee, C., Shen, F., Du, R., Young, W.L., y Yang, G.Y. (2005). «Angiopoietin-2 facilitates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in the mature mouse brain». *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 36(7), 1533-1537. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1161/01.STR.0000170712.46106.2e>
- Zudaire, E., Gambardella, L., Kurcz, C., y Vermeren, S. (2011). «A computational tool for quantitative analysis of vascular networks». *PLoS One*, 6(11), e27385. En línea. Obtenido desde: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0027385>



SEMBLANZA DEL AUTOR

Edgar Guevara es actualmente Profesor Asociado del departamento de computación, electrónica y mecatrónica de la Universidad de las Américas Puebla. Sus áreas de investigación son la imagenología óptica, conectividad funcional, espectroscopía y procesado de señales biomédicas. El estudio de la epilepsia y lesiones de la sustancia blanca cerebral en neonatos se encuentran entre sus intereses actuales de investigación. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) nivel I. Le fueron otorgadas dos becas CONACYT para realizar sus estudios de posgrado y un estímulo de repatriación. Ha sido responsable técnico de un proyecto sobre telemedicina (proinnova 2015) y de un proyecto de cooperación bilateral México-Quebec (2016-2018). Cuenta con experiencia industrial como supervisor de mantenimiento e ingeniero de proyectos. Recibió su Doctorado en Ingeniería Biomédica en la École Polytechnique de Montréal en 2014. Tiene una Maestría en Ciencias Aplicadas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Se tituló como Ingeniero Electrónico del Instituto Tecnológico de San Luis Potosí con el mejor promedio del 2003.

EDITORIAL UDLAP

Izraim Marrufo Fernández

Director

Rosa Quintanilla Martínez

Jefa editorial

Angélica González Flores

Guillermo Pelayo Olmos

Coordinadores de diseño

Andrea Garza Carbajal

Aldo Chiquini Zamora

Coordinadores de corrección

Carolina Tepetla Briones

Coordinadora administrativa

Andrea Monserrat Flores Santaella

Coordinadora de pre prensa

Guadalupe Salinas Martínez

Coordinadora de producción

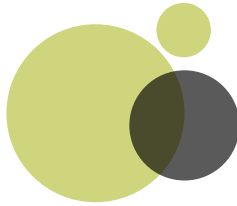
José de Jesús López Castillo

José Enrique Ortega Oliver

Impresores

María del Rosario Montiel Sánchez

Encuadernadora



EL CEREBRO EN REPOSO

A TRAVÉS DE LA ÓPTICA

fue preparado por el Departamento de Publicaciones
de la Universidad de las Américas Puebla para su publicación
electrónica en diciembre de 2019.

El propósito de este libro es dar un panorama general del estudio del cerebro en reposo a través de distintas técnicas de imagenología óptica. Aun cuando aparentemente no estamos haciendo nada, nuestro cerebro muestra una elevada actividad metabólica: a pesar de que sólo representa el 2% de la masa corporal, consume el 20% de energía. Esta voracidad desproporcionada representa una ventana de oportunidad, tanto empírica, como teórica, para el estudio de diferentes padecimientos y su efecto en el cerebro.

El descubrimiento de la sincronía de actividad cerebral entre áreas del cerebro, que aunque remotas, se encontraban conectadas funcionalmente, dio lugar al término «conectividad funcional». La medición de estas fluctuaciones lentas, pero espontáneas, puede ayudar a comprender los procesos neuronales que constituyen la mayor parte de la actividad metabólica cerebral y, por consiguiente, convertirse en una vasta fuente de información sobre los efectos de padecimientos en el encéfalo.

Se sabe que la hemodinámica del cerebro sufre modificaciones debido a ciertas enfermedades y condiciones neurológicas. En esta obra se presentan diferentes técnicas de imagenología óptica que nos permiten analizar estos cambios en la conectividad funcional en reposo, debido a un padecimiento. El autor contempla a mediano-largo plazo que el estudio del cerebro en reposo se convierta en un biomarcador no invasivo en el diagnóstico de ciertas condiciones neurológicas como epilepsia, lesiones en la materia blanca, entre otras.

UDLAP[®]

ISBN: 978-607-7690-55-9



9 786077 1690559