

Estudio de los cambios metabólicos en la corteza cerebral de personas con ceguera total y la relación de estos con la neuroplasticidad.

Trabajo de Fin de máster

Máster en Biomedicina

Universidad de La Laguna

Curso académico 2019/2020

Autor: J. Elizabeth González Soria

Tutores: Dr. José Luis González Mora

Dr. Cristián Modroño Pascual

Grupo de investigación: Laboratorio de Neuroquímica y Neuroimagen.

Dra /Dr José Luis González Mora, componente/coordinador del Grupo de Investigación Neuroquímica y Neuroimagen adscrito a las Titulaciones que aparecen en el encabezamiento

CERTIFICO

- Que el Trabajo Fin de Máster (TFM) titulado Estudio de los cambios metabólicos en la corteza cerebral de personas con ceguera total y la relación de estos con la neuroplasticidad, ha sido realizado bajo mi supervisión por D^a/D J. Elizabeth González Soria, matriculada/o en el Máster en Biomedicina, durante el curso académico 2019/2020.
- Que una vez revisada la memoria final del TFM, doy mi consentimiento para ser presentado a la evaluación (lectura y defensa) por el Tribunal designado por la Comisión Académica de la Titulación.

Para que conste, firmo el presente certificado en La Laguna a 03/07/2020.

José Luis González Mora

Firmado digitalmente por José Luis González Mora
Nombre de reconocimiento (DN): cn=José Luis González Mora,
o=Universidad de La Laguna, ou=ULL, email=jlgonzal@ull.edu.es, c=ES
Fecha: 2020.07.05 20:52:12 +01'00'

Dra/ Dr José Luis González Mora.

Resumen

En este trabajo se ha estudiado las diferencias de concentración de metabolitos presentes en la corteza primaria del cerebro en 7 pacientes que presentan ceguera total respecto a 8 controles sanos. Se realizó a través del uso de resonancia magnética (MR) usando tanto imagen por resonancia magnética (MRI) para observar si existían anomalías en las regiones a estudiar, así como espectroscopia de resonancia magnética (MRS), especialmente la de protón, (^1H -MRS), para registrar las concentraciones moleculares presentes en el tejido biológico usando las propiedades magnéticas de los átomos de hidrogeno localizados en dichas zonas cuando se ven expuestos a un campo magnético. Se ha tenido en cuenta trabajos anteriores en la preparación de esta investigación, ya que en estos se muestran los cambios neuroquímicos en la corteza visual mostrando diferencias en los metabolitos estudiados, aunque no hay respuestas claras sobre cómo se producen estos cambios ni como los procesos de neuroplasticidad pueden intervenir. Este trabajo pretende estudiar y aclarar los cambios producidos en un mayor número de metabolitos que los que presentan bibliografías anteriores, en ambos hemisferios cerebrales. Realizando distintos de análisis estadístico se obtuvo que los cambios metabolitos se producían en Glc, GPC, NAA, GPC+PCh, NAA+NAAG y Cr+PCr. No obteniendo diferencias significativas en los estudios de variables como el sexo, la edad y tiempo de aparición. Por último, se realizó un estudio para comprobar que los hemisferios derecho e izquierdo forman parte de un área homogénea del cerebro. En conclusión, con las variaciones obtenidas logró dar respuestas a los cambios metabólicos y la relación que guarda con la neuroplasticidad.

Abstract

In this work, the differences in metabolite concentration present in the primary cortex of the brain in 7 patients with total blindness compared to 8 healthy controls have been studied. It was performed through the use of magnetic resonance (MR) using both magnetic resonance imaging (MRI) to observe if there were abnormalities in the regions to be studied, as well as magnetic resonance spectroscopy (MRS), especially that of proton, (^1H -MRS), to record the molecular concentrations present in biological tissue using the magnetic properties of the hydrogen atoms located in these areas when exposed to a magnetic field. Previous work has been taken into account in the preparation of this research, since these show the neurochemical changes in the visual cortex showing differences in the metabolites studied, although there are no clear answers on how these changes occur or how the processes of neuroplasticity can intervene. This work tries to study and clarify the changes produced in a greater number of metabolites than those presented in previous bibliographies, in both cerebral hemispheres. Carrying out different statistical analyzes, it was obtained that the metabolite changes occurred in Glc, GPC, NAA, GPC + PCh, NAA + NAAG and Cr + PCr. Not obtaining significant differences in the studies of variables such as sex, age and time of onset. Finally, a study was carried out to verify that the right and left hemispheres are part of a homogeneous area of the brain. In conclusion, with the variations obtained, it was able to provide responses to metabolic changes and the relationship it has with neuroplasticity.

Índice

Introducción.....	6
Hipótesis y Objetivos	13
Hipótesis del trabajo.....	13
1.- Objetivo principal	14
2.-Objetivos Secundarios:	14
Materiales y Métodos	16
Sujetos experimentales.....	21
Metabolitos.....	22
Software y Hardware para procesamiento de datos.....	23
Análisis Estadístico: Test no paramétricos.	23
Resultados	26
• Sexo y Edad	29
• Tiempo de aparición	31
• Tipo de ceguera.....	32
• Estudio de hemisferios.....	36
• Estudio ciegos y controles	38
Discusión	41
Conclusiones	48
Bibliografía.....	50

Anexo I

Tabla de Figuras

Figura 1. a) Representación de una FID, esta se transforma mediante transformaciones de Fourier en la representación del espectro de frecuencias (b).....	7
Figura 2. Muestra la información que llega a cada hemisferio cerebral proveniente de las retinas y como esa información es distinta par cada uno de ellos.....	12
Figura 3. Esquema del proceso de obtención de señales MRS. En el proceso de relajación de los núcleos, se induce una f.e.m. en los canales de la bobina receptora del escáner de MR. La f.e.m. es percibida como señales amortiguadoras en el tiempo (FIDs) las cuales se combinan y da como resultado una representación en el dominio de las frecuencias (FFT) correspondiente con el espectro de MRS.....	17
Figura 4. Identificación de las señales de los metabolitos estudiados debido a que los núcleos de ^1H se ven afectados por el entorno químico en el que se encuentran, es decir por los distintos grupos funcionales y por tanto aparecen distintos picos a distintas frecuencias.	18
Figura 5. Localización de los 2 voxels de la zona de interés para los sujetos que participan en este estudio, en la corteza visual izquierda (A) y derecha (B). Cada vóxel tiene un tamaño de 20x20x20 mm.....	19
Figura 6. Ejemplo de archivo almacenado con el formato raw PROBE v12 multicoil (archivos *.7).....	20
Figura 7. Representación de la diferencia de concentración en los metabolitos de ciegos y controles sanos respecto al sexo.	30
Figura 8. Representación mediante gráfico de barras de los resultados del estudio estadístico realizado para las diferencias entre ciegos y controles sanos, teniendo en cuenta el sexo y la edad.	31
Figura 9. Representación mediante gráfico de barras de las diferencias de concentración de los metabolitos de ciegos congénitos y ciegos con ceguera adquirida a lo largo de los años.....	33
Figura 10. Representación mediante gráfico de barras de las diferencias de concentración de los metabolitos de ciegos congénitos y ciegos con ceguera adquirida a lo largo de los años, en este caso usando las concentraciones sin normalizar por creatina.	36
Figura 11. Se muestra el proceso por el cual se toma la información del campo visual hasta llegar al hemisferio correspondiente. Imagen tomada de: https://slideplayer.com/slide/13701047/	37
Figura 12. Representación de los resultados del estudio estadístico para diferencias de metabolitos entre ciegos y controles sanos.....	40

Tablas de información

Tabla 1. Información de los pacientes con ceguera total que participaron en este estudio.	21
Tabla 2. Información de los pacientes sanos (controles) que participaron en este estudio.	22
Tabla 3. Metabolitos estudiados en la corteza visual.	23
Tabla 4. Pruebas no paramétricas realizadas en el estudio estadístico.	25
Tabla 5. Resultados del estudio estadístico, presentando los p valor para el estudio de diferencias entre ciegos y controles sanos respecto al sexo.	29
Tabla 6. Resultados del estudio estadístico, presentando los p valor para el estudio de diferencias en los metabolitos entre ciegos y controles respecto al sexo.	29
Tabla 7. Resultados del estudio estadístico, presentando los p valor para el estudio de diferencias entre ciegos y controles respecto a la edad.	31
Tabla 8. P valor obtenido para el estudio del tiempo de aparición de la ceguera temprana y tardía.	32
Tabla 9. P valor obtenido en el estudio tipo de ceguera (congénita y adquirida)	32
Tabla 10. P valor obtenido para las diferencias de metabolitos en el estudio tipo de ceguera (congénita y adquirida).	33
Tabla 11. P valor obtenido para la diferencia de metabolitos en el estudio de ciegos congénitos y ciegos adquiridos, teniendo en cuenta que las concentraciones no están normalizadas por creatina en este caso.	35
Tabla 12. P valor obtenidos en las pruebas de normalidad realizadas en el estudio de homogeneidad de hemisferios.	37
Tabla 13. Resultados del estudio estadístico, presentando los p valor para el estudio de las diferencias de concentración de los metabolitos en ciegos y controles. (Normalizados por creatina (//Cr+PCr))	38
Tabla 14. Resultados del estudio estadístico, presentando los p valor para el estudio de diferencias de metabolitos entre ciegos y controles sanos. Los valores que han superado la False Discovery Rate (FDR) se muestran con ***, mientras que los valores con p menor a 0,05 se indican con *.	38

Introducción

La imagen por resonancia magnética (MRI), así como la espectroscopía por resonancia magnética (MRS) son recursos esenciales en la investigación en el ámbito médico, usada desde su invención en los años 80. Estas herramientas permiten observar la anatomía de distintas partes del cuerpo humano de forma no invasiva (MRI) y detectar cambios tanto en la distribución como en la concentración de los compuestos químicos de interés en las zonas que se quieran estudiar (MRS).

Mientras que la MRI permite realizar imágenes estructurales del cuerpo permitiendo observar diferencias o anomalías presentes en las regiones donde se realice el estudio, la MRS se encarga de registrar las concentraciones de moléculas presentes en un tejido biológico haciendo un uso de las propiedades magnéticas de los átomos de hidrógeno que se encuentran en dichas zonas cuando estos se ven expuestos a un campo magnético muy elevado. (Cecil, 2006; Tesis Carlos Majós, Barcelona 1999)

El fundamento de esta técnica está basado en la propiedad que tienen ciertos núcleos atómicos para absorber de distinta manera la energía de radiofrecuencia cuando son sometidos a un campo magnético, por tanto, en el caso de la espectroscopía de resonancia magnética, se estudia las propiedades magnéticas de una muestra macroscópica cuando es sometida a cambios en los momentos magnéticos de los núcleos atómicos que la forman. Cuando se produce la perturbación de los momentos magnéticos se genera un momento magnético neto que puede inducir una fuerza electromotriz (f.e.m.) sobre la muestra generando la señal MRS. Las señales se encuentran en el rango de las radiofrecuencias, generalmente entre los 10 y 400 MHz para las aplicaciones médicas. (Tesis Francisco José Marcano, La Laguna 2015)

Primeramente, se obtiene un conjunto de señales de las distintas repeticiones que se realizan al paciente para evitar errores en las mediciones debidos a movimientos fisiológicos e involuntarios (por ejemplo: respiración, ritmo cardiaco, etc.) Esas señales se suman y se obtiene la FID, definida como una señal que evoluciona con el tiempo. La transformación de esta señal da como resultado un espectro con picos situados a diferentes frecuencias que deberán ser identificados ya que corresponden a los metabolitos que se encuentran en la zona de interés.

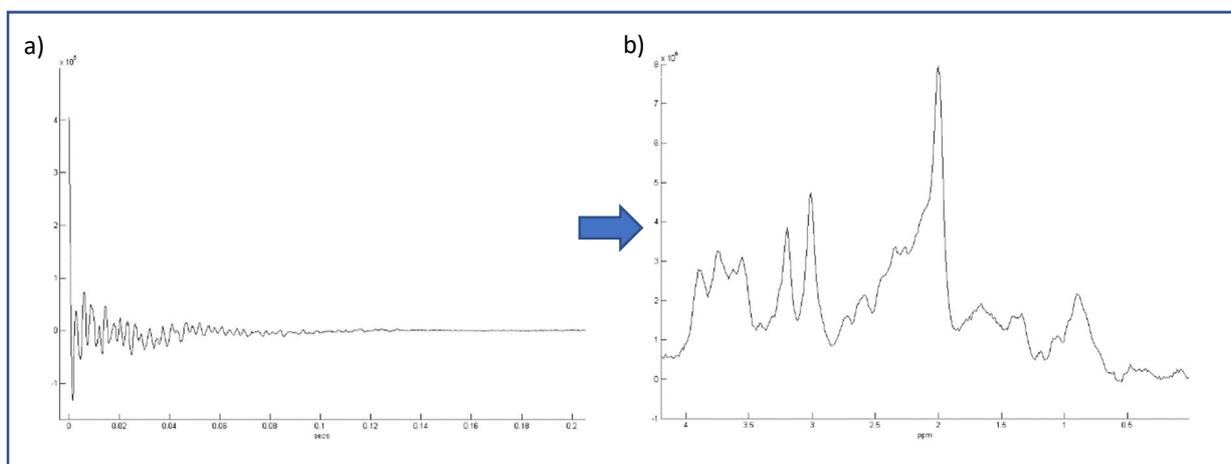


Figura 1. a) Representación de una FID, esta se transforma mediante transformaciones de Fourier en la representación del espectro de frecuencias (b).

Para poder determinar los picos de las señales correspondientes a los distintos metabolitos, nos podemos preguntar qué es lo que diferencia las señales para que estas se encuentren localizadas a distintas frecuencias. Como se sabe este fenómeno no solo dependen del núcleo, sino que está influenciado por el entorno químico en el cual se encuentran. El desplazamiento químico proporciona información acerca del entorno químico que rodea al núcleo permitiendo asociar los picos en las distintas frecuencias en el espectro con las moléculas presentes en la muestra.

Los núcleos de hidrógeno situados en cada metabolito presentan distintas frecuencias dependiendo de los grupos funcionales a los que esté unido, también es posible obtener del área bajo la curva la concentración de

los metabolitos por lo que la MRS es una técnica usada también para la cuantificación de sustancias. (Tesis Francisco José Marcano, La Laguna 2015; Departamento de Química Física, 2011)

Debido a los motivos nombrados anteriormente estas técnicas resultan útiles para el estudio de la composición química del cerebro y sus diferencias al comparar distintos grupos.

Este estudio se centrará en la composición y los cambios metabólicos producidos en la corteza visual primaria de los hemisferios derechos e izquierdos de pacientes con ceguera total, así como en los procesos de neuroplasticidad, definido según (Elaine, 2008), como la capacidad de las neuronas de incrementar sus conexiones con otras neuronas por medio de estimulación, dicho de otro modo, es la capacidad de las áreas cerebrales o de los grupos neuronales de compensar las deficiencias funcionales correspondientes a la lesión que presente. Un pionero en este fue Ramón y Cajal que postuló que el cerebro cambia de forma permanente, por tanto, permite adquirir y eliminar datos de manera continua, fue apoyado por Lugano quién usó el término “plasticidad cortical” para referirse a la capacidad que presenta el sistema nervioso para adaptarse a los cambios, aunque no fue hasta el año 1973 cuando se encontraron evidencias que apoyaran el supuesto de Ramón y Cajal, estas evidencias fueron encontradas por el premio Nobel Jhon Eccles. Otros autores como Cohen, Pascual-Leone entre otros, demostraron que el sistema nervioso posee una notable capacidad de modulación debido a la estimulación sensitiva, sensorial, endocrina o motora. (Dayan & Cohen, 2011; Mehta et al., 2019; Prieto et al., 2011)

Antes de la realización de esta investigación, se comprobó la existencia de estudios previos que ya daban una visión sobre las diferencias significativas entre ciegos y controles como (Wu et al., 2013) en este estudio

se observó usando la técnica de MRS como variaba la concentración de distintos metabolitos en ciegos y controles. Se realizó el estudio en 2 grupos con dos integrantes en cada uno, formado por monos sanos y monos a los cuales se realizó una transección del nervio óptico para que los sujetos presentaran ceguera binocular. Se compararon los metabolitos que presentaban ciegos y controles, observando las diferencias entre ambos grupos, obteniéndose los siguientes resultados: reducción drástica del N-acetil-aspartato (NAA) en el grupo compuesto por macacos con ceguera. El NAA es un derivado de aminoácidos sintetizado en las neuronas y transportado por los axones, por lo que una reducción de este compuesto sugiere pérdida neuronal en la zona. También se produjo un aumento de la colina (precursor del neurotransmisor de acetilcolina) en los casos de ceguera, este resultado puede sugerir la activación de la corteza visual debido a procesos de plasticidad neuronal y liberación de colina al medio extracelular debido a la desmielinización de axones por degeneración neuronal, o puede deberse a la proliferación de neuronas y glía. Por otro lado, el aumento de las concentraciones de metabolitos como el glutamato y la glutamina en ciegos podría ser justificado por procesos de neuroplasticidad o por desequilibrio en el ciclo en el que están implicado estos metabolitos, es decir, el ciclo glutamato-glutamina podría deberse a alteraciones en las neuronas o en los astrocitos. Como se puede observar estos estudios no dan respuestas claras a los motivos por los que surgen estos cambios, por tanto, se deben realizar investigaciones más profundas y exhaustivas para aportar claridad a las cuestiones planteadas sobre este tema.

Otro estudio realizado fue (Bernabeu et al., 2009) en este se investigó usando MRS los cambios asociados a las alteraciones que se producían en la actividad neuronal y en la experiencia sensorial de los ciegos, respecto a los controles. De este experimento se obtuvo un aumento significativo de

mioinositol, que actúa como marcador glial. Este compuesto es un azúcar que forma parte de un tipo de lípidos denominados fosfatidilinositol y también forma parte de un grupo de mensajeros, inositol polifosfatos (Cecil, 2006) . Se encuentra dentro de los astrocitos y el aumento que presenta este metabolito en los pacientes ciegos puede ser debido a la proliferación glial o a un aumento de tamaño de dichas células. Por tanto, este estudio ayuda a comprender la complejidad de los mecanismos involucrados en la plasticidad cerebral, sugiriendo también un papel importante de las células gliales en la reorganización del cerebro cuando se produce la privación visual. Este aumento de mioinositol también se comprobó en trabajos como (Weaver et al., 2013) por lo que respalda la hipótesis que sugirió Bernabeu, en la cual la glía prolifera con la supresión de la visión.

Estos trabajos sirven para comprobar que la plasticidad de las neuronas y la glía modifican las funciones de la corteza cerebral, pudiendo adquirir funciones distintas a las suyas propias. Por este motivo se puede observar cómo personas con deficiencia o pérdida de la visión pueden desarrollar en la corteza visual respuesta a estímulos diferentes, aumentando la capacidad de percepción de modalidades sensoriales debido a la ceguera.

Por los trabajos previos ya comentados se sabe que en personas ciegas la pérdida de visión incrementa la plasticidad neuronal. Como se ha comentado anteriormente, debido a esta carencia se comienza a desarrollar respuestas a estímulos diferentes, esto se puede comprobar al someter a personas con ceguera a estímulos auditivos o táctiles de manera periódica, por lo que las áreas encargadas de captar esos estímulos usaran neuronas que pertenecen a áreas del cerebro que no estén en funcionamiento (ej: región occipital encargada de la visión), este fenómeno es conocido como reclutamiento neuronal. Esto permite que las personas ciegas puedan captar una mayor información en otro tipo de modalidades sensoriales puesto que

no son capaces de percibir estos estímulos a través de la visión. (Kupers & Ptito, 2014)

Algunos de los trabajos que se citarán a continuación muestran dicho suceso, por ejemplo (Rowan, 2013), se estudió si la audición y en particular la audición de ecos podía ayudar a personas invidentes a adquirir habilidad para la navegación espacial. Rowan, investigador del trabajo citado, afirma que: <<Los resultados demostraron que tanto las personas con visión normal como las ciegas con un buen oído, aunque no tengan experiencia en ecolocalización, pueden usar los ecos para determinar dónde están los objeto>>. También se pudo comprobar un comportamiento similar con el estudio (González-Mora et al., 1999), se comprobó una nueva forma de percepción global y simultánea del espacio tridimensional a través de un sentido diferente a la vista, permitiendo una mejora en el conocimiento del entorno de personas ciegas, aportando mayor independencia, orientación y movilidad en pacientes que tengan pérdida total de la visión.

Estos trabajos han sido de gran ayuda como base en la preparación de esta investigación, ya que en estos se muestran los cambios neuroquímicos en la corteza visual mostrando diferencias en los metabolitos estudiados, aunque no hay respuestas claras sobre cómo se producen estos cambios ni como los procesos de neuroplasticidad pueden intervenir. Este trabajo pretende estudiar y aclarar los cambios producidos en un mayor número de metabolitos, en ambos hemisferios cerebrales. Aunque cada uno de estos hemisferios tiene una función diferente. Esto se debe a que la información que proviene del entorno llega hasta la retina diferenciándose dos zonas dentro de esta, el aspecto temporal y el aspecto medial. El ojo izquierdo recibe información en la parte derecha o medial de la retina del campo visual izquierdo, al contrario que el ojo derecho que recibe información en la parte izquierda de la retina (aspecto medial) a partir del campo visual derecho. En

las retinas se forma una imagen invertida, la información que proviene de las retinas es transportada por los nervios ópticos hasta el quiasma óptico donde se entrecruza la información, llegando al hemisferio derecho la información que proviene del ojo izquierdo y en el hemisferio derecho la información que proviene del ojo izquierdo, por tanto se dice que la corteza cerebral recibe información codificada del campo visual contralateral de los dos ojos , se comprueba con este estudio que forman parte de un área homogénea del cerebro, por tanto aunque tengan distinta función se comprobará que provienen de la misma población y podemos considerar a cada hemisferio, como un área cerebral que procesa ambas retinas. También se intentará relacionar dichos cambios con la neuroplasticidad, dando así respuestas a las cuestiones que se plantean en este tema tan complejo.

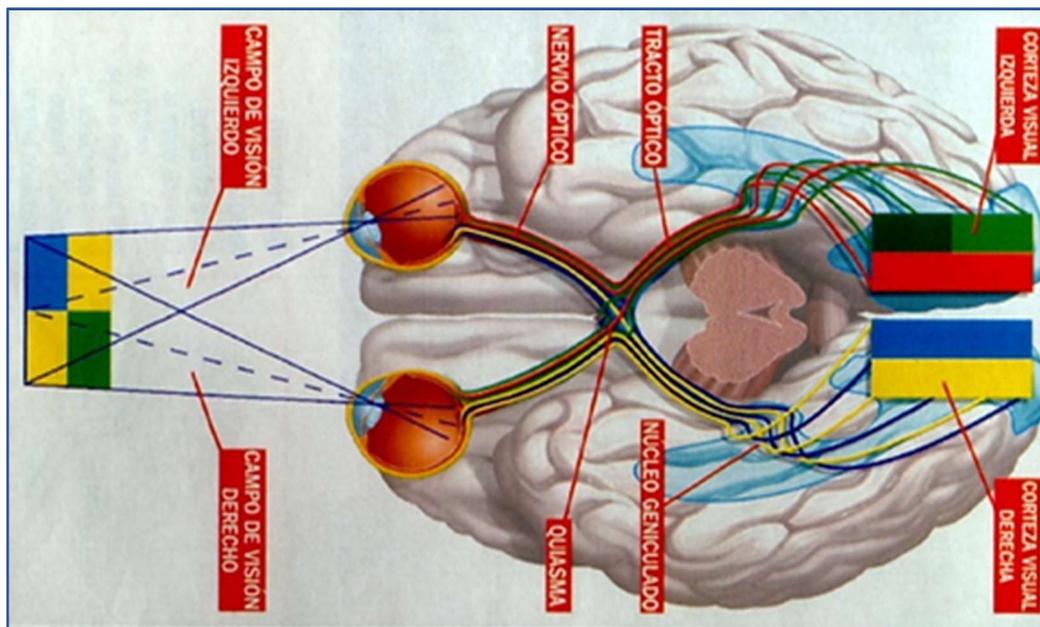


Figura 2. Muestra la información que llega a cada hemisferio cerebral proveniente de las retinas y como esa información es distinta par cada uno de ellos.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis del trabajo.

Debido a que el estudio de la corteza visual en ciegos a nivel bioquímico no ha sido muy estudiado, las preguntas planteadas sobre la relación entre los cambios metabólicos y la plasticidad cerebral de las áreas que han perdido su función normal permanecen sin respuesta. Este trabajo pretende estudiar y aclarar los cambios producidos en un mayor número de metabolitos, en ambos hemisferios cerebrales e intentar relacionar dichos cambios con los fenómenos de neuroplasticidad, dando así respuestas a las cuestiones que se plantean en este tema tan complejo.

Por lo tanto, para poner a prueba estas hipótesis se ha decidido estudiar los cambios producidos en los metabolitos estudiados comparando dos grupos, uno formado por personas que presentan pérdida total de visión y el otro formado por personas que presentan una visión normal. Para ello se pretende estudiar ambos hemisferios del cerebro, dado que cada hemicorteza visual se encarga de cuadrantes diferentes de ambos ojos (Figura 2). En el caso de ciegos que presentan ceguera total ambas hemicortezas están involucradas, por ello no es posible hacer un vóxel que abarque ambos hemisferios, por este motivo se realizan dos vóxel uno para cada hemicorteza. Se deberá comprobar si ambas cortezas son homogéneas estadísticamente, demostrando que ambas hemicortezas pertenecen a la misma población. También se intentará aclarar a que se deben los cambios metabólicos entre sujetos y controles relacionándolo con el término de neuroplasticidad. Por otro lado, se realizarán estudios estadísticos para poder demostrar si hay o no relación entre estos cambios y distintas variables como el sexo, patología previa, causa de la ceguera, entre otras variables, así como si hay relación entre grupos.

Este trabajo parte del supuesto de la inexistencia de cambios metabólicos entre los grupos de estudio, es decir, no debería haber cambios entre la concentración de los metabolitos en ciegos y controles sanos. Partiendo de este supuesto la hipótesis nula, se definiría como la igualdad entre los grupos estudiando, por tanto, no habría diferencias metabólicas entre ambos grupos, si esta hipótesis es rechazada, es razonable pensar que la concentración de los metabolitos en pacientes con ceguera es distinta o varía respecto al grupo de personas con visión. Esta última corresponde a la hipótesis alternativa.

$$H_0: C_{ciegos} = C_{visión\ normal}$$

$$H_1: C_{ciegos} \neq C_{visión\ normal}$$

1.- Objetivo principal

Estudiar los cambios de concentración de los metabolitos en la corteza visual, del hemisferio derecho e izquierdo por separado, en ciegos con respecto a controles sanos, en nuestra muestra de estudio. Con esto se pretende extraer información referente a los cambios que se producen en la corteza visual tras la ceguera en ciegos y aclarar, si se puede, la existencia de reclutamiento de neuronas visuales por otras modalidades sensoriales tales como la audición o el tacto.

2.-Objetivos Secundarios:

- Variación de estas concentraciones de metabolitos en ciegos y controles usando los valores de concentraciones en unidades arbitrarias normalizadas con creatina.
- Analizar de manera estadística si estos grupos se ven afectados por diversas variables como pueden ser el sexo, edad, tiempo de aparición de la ceguera, siendo el más importante el estudio de concentraciones

de metabolitos entre ciegos congénitos y ciegos que han tenido visión durante algunos años de su vida (tipo de ceguera si la ha padecido desde su nacimiento o la ha adquirido con los años), etc.

- Dar una explicación al cambio producido en las concentraciones de ciegos y controles, así como dar una posible explicación a la variación de concentración de los metabolitos observada en la causa de la ceguera y relacionarlos con los cambios plásticos que ocurren en la corteza visual.
- Tanto el hemisferio izquierdo como el derecho reciben inputs axónicos de ambas retinas (derecha e izquierda), por lo que cada una tiene una función diferente, siendo interesante comprobar que forman parte de un área homogénea del cerebro.

Materiales y Métodos

La espectroscopia de resonancia magnética de protón consiste en el estudio de las propiedades magnéticas que presentan los núcleos ^1H de las moléculas que se encuentran localizadas en el volumen de interés (voxel), se aplica un campo magnético que excita los núcleos, cuando esta cesa los núcleos vuelven a su estado de equilibrio induciendo una fuerza electromotriz (f.e.m.) en las bobinas o antenas receptoras del escáner de MR. El desplazamiento de los electrones por la f.e.m. produce una señal amortiguadora en el tiempo (FID) que una vez transformada da como resultado los espectros de frecuencia con los que podremos estudiar los metabolitos de interés.

Como se indicó posteriormente las frecuencias de respuesta se encuentran en el rango de las radiofrecuencias entre los 10 y 400 MHz para aplicaciones médicas.

En este estudio los datos fueron adquiridos mediante las secuencias de pulsos PRESS (PROVE/SV *brain package*) en un escáner GE Signa Excite HD 3.0T (GE Healthcare), bobina (*phased-coil array*) 8-HBRAIN, situado en las instalaciones del Servicio de Resonancia Magnética par Investigaciones Biomédicas (SRMIB) de la Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

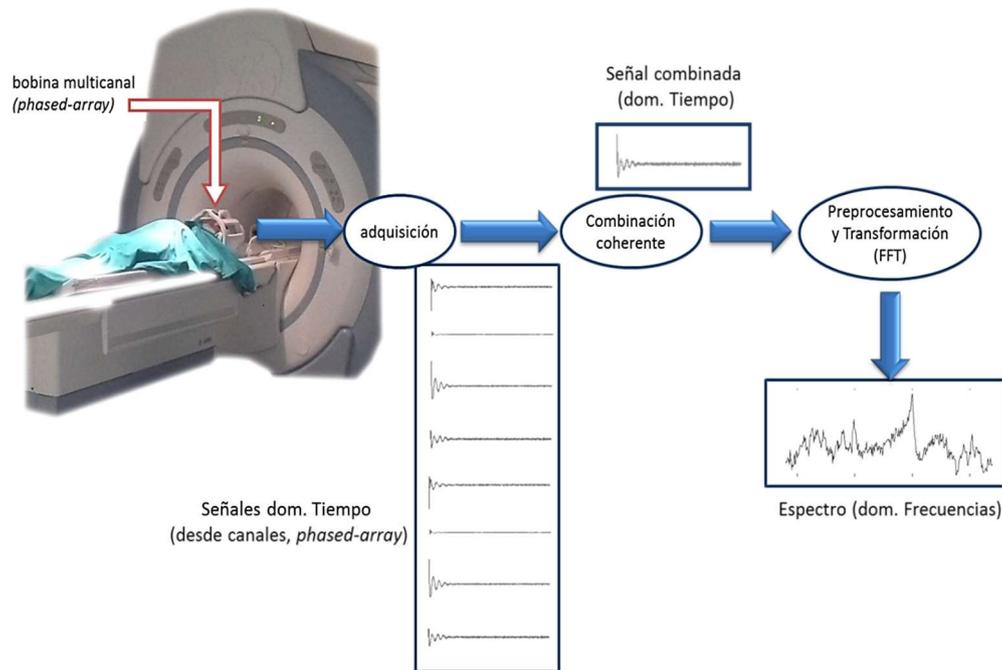


Figura 3. Esquema del proceso de obtención de señales MRS. En el proceso de relajación de los núcleos, se induce una f.e.m. en los canales de la bobina receptora del escáner de MR. La f.e.m. es percibida como señales amortiguadoras en el tiempo (FIDs) las cuales se combinan y da como resultado una representación en el dominio de las frecuencias (FFT) correspondiente con el espectro de MRS.

La obtención de los datos de MRS *in vitro* se realizó usando una esfera de calibración (*phantom*) de espectroscopia (mod. 2152220; GE Healthcare). Los datos se clasificaron de acuerdo con la secuencia de pulso de adquisición (PRESS), los parámetros de la secuencia de pulso (TE, TR, NEX, *flip angle*) y la temperatura. Los efectos de saturación parcial por recuperación incompleta de la magnetización debido a TR cortos se corrigieron mediante escalado de la señal MRS de cada repetición, tomando como referencia el pico correspondiente a la creatina.

Los datos de MRS *in vivo* se tomaron a partir de 7 personas ciegas y 8 personas con visión sana de diferentes sexo y edades, se controlaron las condiciones basales de ambos grupos (ojos cerrados). Realizando este control se evitó respuestas relacionadas con cambios metabólicos en la región de interés. Los datos *in vivo* se obtuvieron con secuencia de pulso de adquisición (PRESS) y los parámetros de la secuencia de pulso utilizada

fueron, (TE: 23 ms, TR: 1070 ms, NEX: 2, *flip angle*: 70°, región explorada del cerebro, volumen cerebral explorado y condiciones experimentales).

Los datos obtenidos representan una FID, posteriormente se procesaron para conseguir un espectro de resonancia magnética MRS, como se muestra en la (Figura 1)

Luego se procedió a identificar los metabolitos que corresponden a cada pico de frecuencia.

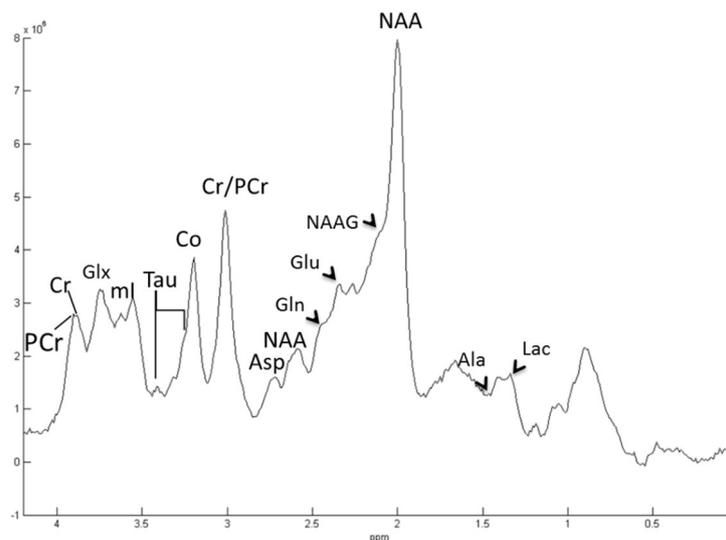


Figura 4. Identificación de las señales de los metabolitos estudiados debido a que los núcleos de 1H se ven afectados por el entorno químico en el que se encuentran, es decir por los distintos grupos funcionales y por tanto aparecen distintos picos a distintas frecuencias.

La localización de los voxel se realizó mediante un localizador de tres planos, manteniendo la coherencia anatómica para ciegos y controles. El volumen de cada voxel se fijó en $20 \times 20 \times 20 \text{ mm}^3$, con 3 localizaciones predeterminadas de la corteza visual primaria, según se muestra en la siguiente imagen:

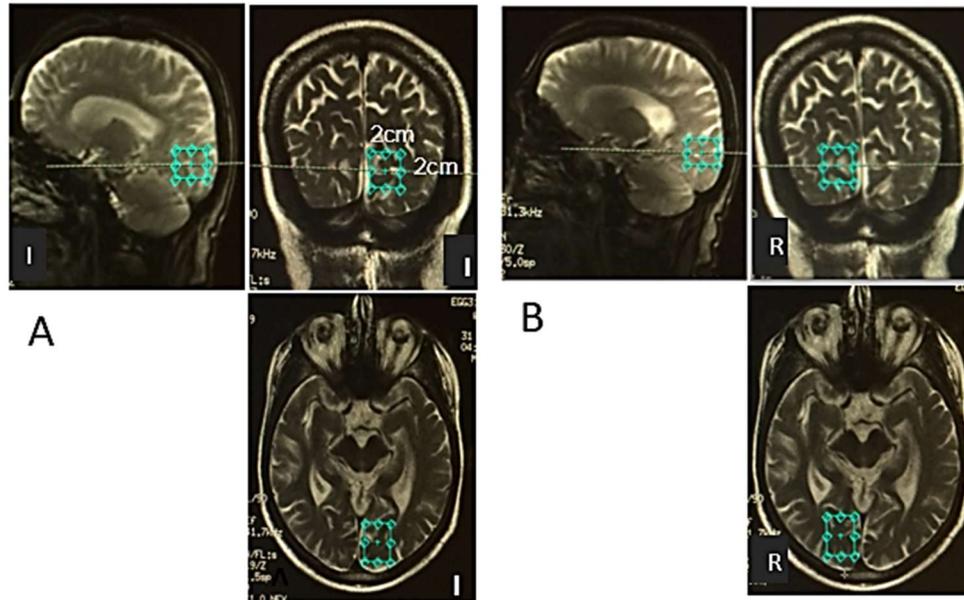


Figura 5. Localización de los 2 voxels de la zona de interés para los sujetos que participan en este estudio, en la corteza visual izquierda (A) y derecha (B). Cada vóxel tiene un tamaño de 20x20x20 mm.

Los datos MRS, fueron almacenados con el formato raw PROBE v12 multicoil (archivos *.7) para acceder a los datos crudos de cada canal de la bobina de cabeza, así como a otras constantes relativas en cada sesión de MRS. Mediante un sensor de pulso periférico y un pletismógrafo se obtuvieron medidas de las señales fisiológicas de los sujetos en estudio durante la MRS, estas medidas correspondían a las frecuencias cardíacas periféricas (pulso), frecuencia y amplitud respiratoria, todas ellas sincronizadas con las repeticiones (pulsos de radiofrecuencia).

Row#1 Col#7 FIGURE : (Tercero_Filt_Base.raw, 3.0 T, PRESS, TE/TR=23/1070 ms).
 Data of: Dpto de Fisiología, Fac. de Medicina, Campus Ciencias de La Salud, Universidad de La Laguna, Tenerife

LCModel (Version 6.3-1J) Copyright: S.W. Provencher.

Ref.: Magn. Reson. Med. 30:672-679 (1993).

Conc.	%SD	/Cr+PCr	Metabolite	
0.710	177%	6.3E-02	Ala	
5.955	14%	0.531	Asp	
4.087	48%	0.365	Cr	
7.118	28%	0.635	PCr	
0.545	134%	4.9E-02	GABA	
0.000	999%	0.000	Glc	
5.296	18%	0.473	Gln	
13.654	6%	1.219	Glu	
2.820	4%	0.252	GPC	
0.000	999%	0.000	PCh	
3.239	13%	0.289	GSH	
6.665	5%	0.595	Ins	
0.000	999%	0.000	Lac	
14.020	3%	1.251	NAA	
0.000	999%	0.000	NAAG	
0.610	23%	5.4E-02	Scyllo	
0.000	999%	0.000	Tau	
7.589	8%	0.677	-CrCH2	
2.820	4%	0.252	GPC+PCh	
14.020	3%	1.251	NAA+NAAG	
11.205	3%	1.000	Cr+PCr	
18.950	5%	1.691	Glu+Gln	
0.000	999%	0.000	Lip13a	
1.772	28%	0.158	Lip13b	
0.486	53%	4.3E-02	Lip09	
16.305	9%	1.455	MM09	
0.243	71%	2.2E-02	Lip20	
20.058	12%	1.790	MM20	
3.177	45%	0.284	MM12	
13.612	21%	1.215	MM14	
5.861	32%	0.523	MM17	
1.772	28%	0.158	Lip13a+Lip13b	
18.561	17%	1.656	MM14+Lip13a+Lip13b+MM12	
16.791	9%	1.498	MM09+Lip09	
20.301	11%	1.812	MM20+Lip20	
DIAGNOSTICS				
1	info	STARTV	24	
1	info	RFALSI	11	
Doing Water-Scaling				
MISCELLANEOUS OUTPUT				
FWHM = 0.076 ppm S/N = 16				
Data shift = 0.024 ppm				
Ph: 10 deg 3.2 deg/ppm				

INPUT CHANGES	
PPMST=4.0	
PPMEND=0.0	
HZPPPM=127.71	
ICOLEN=160	
ICOLST=1	
NDCOLS=160	
NUNFIL=4096, DELTAT=0.0002	
FILPFS='.lcmode1/test/output/Tercero_Filt_Base.ps'	
FILH2O='.lcmode1/test/h2o/Tercero_Filt_Base.h2o'	
ATTH2O=0.750	
DOWS=.TRUE.	
FILRAW='.lcmode1/test/raw/Tercero_Filt_Base.raw'	
FILBAS='.lcmode1/basis-sets/gamma_press_te23_128_mhz_294c.basis'	
lprint=6, filpri='.lcmode1/test/output/Tercero_Filt_Base.dump'	
lcsv=11, filcsv='.lcmode1/test/output/Tercero_Filt_Base.csv'	
lcoord=9, filcoo='.lcmode1/test/output/Tercero_Filt_Base.coord'	
ltable=7, filtab='.lcmode1/test/output/Tercero_Filt_Base.table'	
KEY(1)=0	

Figura 6. Ejemplo de archivo almacenado con el formato raw PROBE v12 multicoil (archivos *.7)

Las señales de los sensores y de los pulsos de resonancia se registraron mediante el sistema de adquisición de alto rendimiento ML750 PowerLab®/4SP, ADInstruments, a 16 bits de resolución ADC y a una rapidez de muestreo de 10 KHz. Los datos provenientes del sistema de adquisición fueron procesadas y almacenadas mediante el software LabChart® 7 (ADInstruments), instalado sobre un ordenador bajo el sistema de operación Windows™ destinado a la monitorización de señales fisiológicas, (EKG, movimientos respiratorios).

Sujetos experimentales

En este estudio se registraron los datos de espectroscopia de resonancia magnética en la corteza visual primaria, como se ha descrito en el apartado de metodología, de 15 personas en total, de las cuales 7 eran personas con ceguera total y las restantes personas con visión normal (controles). En la siguiente tabla se presenta la información de los participantes en esta investigación.

Ciegos	Edad	Tipo de deficiencia visual	Causa de la deficiencia visual	Tipo ceguera	Tiempo de aparición	Sexo (F/M)
Sujeto 1	46	Retinosis pigmentaria	Infección intrauterina	Ceguera adquirida	Tardía (+ 12 años)	Mujer
Sujeto 2	42	Problemas relacionados con la retina	Nacimiento (se cree que por radiografía durante el embarazo)	Ceguera congénita	Temprana (- 12 años)	Mujer
Sujeto 3	32	Retinosis pigmentaria variante	Genética	Ceguera congénita	Temprana (- 12 años)	Hombre
Sujeto 4	45	Retinosis pigmentaria con síndrome de Coats *	No hereditario Y alteración vasos retina	Ceguera adquirida	Temprana (- 12 años)	Mujer
Sujeto 5	47	Catarata en retina, glaucoma e infección	Infección intrauterina	Ceguera adquirida	Temprana (- 12 años)	Mujer
Sujeto 6	52	Reducción del campo visual (visión en tubo)	Ceguera cortical por traumatism o craneoencef álico	Ceguera adquirida	Temprana (- 12 años)	Hombre
Sujeto 7	43	Retinosis pigmentaria	Genética	Ceguera congénita	Temprana (- 12 años)	Mujer

Tabla 1. Información de los pacientes con ceguera total que participaron en este estudio.

*- La enfermedad de Coats es un trastorno ocular no hereditario congénito poco frecuente que causa ceguera total o parcial, caracterizada por el desarrollo anormal de los vasos sanguíneos detrás de la retina. La enfermedad de Coats también puede caer bajo el glaucoma. Puede tener una presentación similar a la del retinoblastoma.

Controles sanos	Edad	Sexo (F/M)
Sujeto 1	41	Mujer
Sujeto 2	31	Mujer
Sujeto 3	64	Hombre
Sujeto 4	49	Hombre
Sujeto 5	45	Mujer
Sujeto 6	45	Mujer
Sujeto 7	40	Mujer
Sujeto 8	38	Mujer

Tabla 2. Información de los pacientes sanos (controles) que participaron en este estudio.

Metabolitos

Los metabolitos que se estudiarán para comprobar si hay variación entre el grupo de control y ciegos. A los participantes de este estudio se les realizó RMS de los hemisferios derecho e izquierdo de la región de interés para obtener mayor número de muestras. Los metabolitos estudiados fueron los siguientes, un total de 35 aunque no se tendrán en cuenta los lípidos ni las macromoléculas ya que no es un tema que se aborde en este trabajo.

Metabolitos	
Abreviatura	Nombre
Ala	Alanina
Asp	Aspártico
Cr	Creatina
PCr	Fosfocreatina
GABA	Gaba
Glc	Glucosa
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GPC	Glicerofosfocolina
PCh	Fosfocolina
GSH	Glutación
Ins	Inositol (myo inositol)
Lac	Lactato
NAA	n-acetil-aspartato
NAAG	n-acetil-aspartato-glutamato
Scyllo	Scilo-inositol
Tau	Taurina
-CrCH ₂	Radical metilo de la creatina
GPC+PCh	Suma de ambas

NAA+NAAG	Suma de ambas
Cr+PCr	Suma de ambas
Glu+Gln	Suma de ambas

Tabla 3. Metabolitos estudiados en la corteza visual.

Software y Hardware para procesamiento de datos

Las herramientas de software fueron usadas para la definición de algoritmos y el procesamiento de los datos, estos recursos fueron los siguientes:

a. LCMModel®, software para cuantificación de señales MRS. Este método analiza un espectro in vivo como combinación lineal de espectros in vitro. Se utilizan espectros completos en vez de resonancias individuales para incorporar la mayor cantidad de información para el estudio. En él se obtienen estimaciones de probabilidad máxima de los metabolitos y sus incertidumbres (cota de Cramèr-Rao). (Provencher, 2001)

b. Procesado estadístico: *Prism 8* for Windows, GraphPad Software, Inc.

Análisis Estadístico: Test no paramétricos.

En esta sección se describirán los test no paramétricos que se realizaron en el estudio estadístico de los datos obtenidos en la espectroscopia de resonancia magnética. Estos test fueron usados ya que hacen un menor número de suposiciones sobre la distribución de los datos, siendo test más robustos (precisos) si la muestra cumple los criterios que se presentaran a continuación. (Guía Graphpad Prism 8)

El criterio que se siguió para la elección de estos tipos de test estadísticos fue:

- Pocas asunciones respecto a la distribución de la población, por tanto, no hay certeza de que los datos presenten una distribución normal.
- El tamaño de muestra requerido para el uso de este tipo de test debe ser menor que 20. Como se indicó en el apartado denominado sujetos experimentales en total el estudio se realizó con 15 pacientes.

Análisis Estadístico: Pruebas no paramétricas	
Pruebas	Definición
Test de Wilcoxon	<p>Compara dos grupos y determina si existen diferencias entre ellas. Determina si la diferencia se debe al azar o no.</p> <p>Equivalente al test de Mann-Whitney.</p>
Mann-Whitney	<p>Compara dos grupos o muestras independientes.</p> <p>Presenta poco poder en muestras pequeñas por eso, se usa un test análogo como el test de Wilcoxon.</p> <p>Este test no se usó debido a las limitaciones que presenta en el número de muestras, ya que el estudio se realizó con pocas muestras.</p>
Test t Múltiple	<p>Compara dos columnas de conjuntos de datos, realizando muchas pruebas t una por cada fila, donde se asume que las dos muestras que se comparan se muestrean de poblaciones con desviaciones estándar idénticas.</p>
Kruskal-Wallis	<p>Esta prueba compara tres o más grupos. Se realiza esta prueba para probar si el grupo de datos que se está estudiando proviene de la misma población. Asume por tanto que los datos vienen de la misma distribución.</p>
<p>Test para estudiar si la muestra presenta o no normalidad. Estas pruebas se usan para observar si una distribución se desvía de la distribución gaussiana.</p>	

Test de Anderson-Darling	Cuantifica que tan lejos se encuentra la distribución de Gauss, calculando posteriormente cuanto difiere estos valores del valor esperado con una distribución gaussiana. Se obtiene el valor P a partir de la suma de las discrepancias.
Test D'Agostino y Pearson	Calcula el P valor comparando la distribución acumulativa de un conjunto de datos respecto a la distribución acumulativa ideal de una distribución gaussiana.

Tabla 4. Pruebas no paramétricas realizadas en el estudio estadístico.

La información de los distintos tipos de test no paramétricos usados en este trabajo y recolectados en esta tabla, está basada en distintos trabajos e investigaciones previos como (Delicado, 2016; Díaz & Fernández, 2006; Friedman, 2016).

Resultados

Este trabajo se centrará en el estudio de los cambios de composición metabólicos registrados en la corteza visual primaria de los hemisferios derecho e izquierdo en personas con ceguera total comparados con controles sanos y visión normal. Posteriormente relacionando estos cambios con la capacidad que tienen las áreas cerebrales o grupos de neuronas de compensar las deficiencias funcionales correspondientes a la lesión que padecen los pacientes que participan en este estudio.

Primeramente, se estudiarán los cambios de concentración de los metabolitos en la corteza visual del hemisferio derecho e izquierdo por separado, en ciegos con respecto a controles sanos, en nuestra muestra de estudio. Con esto se pretende extraer información referente a los cambios que se producen en la corteza visual tras la ceguera en personas ciegas.

En el estudio anteriormente citado se estudiará el efecto que otras variables como sexo, edad, tiempo de aparición de la ceguera y el más importante como se comentó anteriormente, el estudio de la diferencia de metabolitos entre ciegos congénitos y ciegos que han adquirido la ceguera a lo largo de su vida, se realizarán mediante análisis estadístico usando estadística no paramétrica debido a que no se puede suponer que el conjunto de datos presenta distribución normal, a parte que el número de muestras es menor que el requerido para el uso de test paramétricos (véase la sección de análisis estadístico: test no paramétricos). También se comprobará mediante el uso de test de normalidad como *Anderson-Darling test* y *D'Agostino y Pearson test*, que tanto el hemisferio derecho como el izquierdo, aunque reciban inputs axónicos de ambas retinas y por tanto cada una tenga una función diferente, presentan homogeneidad anatómica y funcional del cerebro.

El estudio estadístico se realizó a partir de los datos normalizados por creatina, es decir, en el análisis de los espectros se tuvieron en cuenta los valores de los metabolitos relevantes en este estudio normalizados por el valor registrado de creatina a modo de estándar interno. En base a este último se relacionaron las distintas señales. Se tomó como referencia el valor de este metabolito ya que, la concentración de creatina total es similar en todas las áreas cerebrales y por tanto en todos los tipos de células cerebrales. Tendiendo a presentar una señal estable con el tiempo si el paciente no presenta patologías importantes. Es por este motivo que la creatina se usa como un estándar interno, usándose para normalizar las señales de otros metabolitos presentes en el área de cerebro en el que se esté realizando el estudio y por tanto ubicados en el mismo vóxel. El uso de creatina como estándar interno presenta distintas ventajas, siendo una de ellas la corrección parcial de las variaciones en la intensidad de la señal de los metabolitos, estas variaciones son debidas al lugar donde se coloca el vóxel. Por tanto, corrige variaciones como la proporción de líquido cefalorraquídeo (LCR) así como fluctuaciones en la señal debidas a la sensibilidad de las diferentes bobinas. La principal desventaja que presenta el uso de creatina para normalización de las señales de los demás metabolitos es que su propia señal puede variar, aumentando o disminuyendo debido a la presencia de patologías como se pudo comprobar en trabajos previos, en el que la señal de creatina variaba si el paciente había sufrido accidentes cerebro vasculares isquémicos o traumatismos cerebrales (Lei H. et al. 2009; Signorelli et al. 2010). En nuestros datos no se encuentra patología cortical, solo extracortical, así que el uso de la normalización por creatina es correcto.

Por otro lado, los datos que se tomaron para llevar a cabo este estudio son aquellos que corresponden a un índice de Cramèr-Rao (%SD o CCR) menor de 30. Los límites inferiores de Cramèr-Rao proporcionan estimaciones

útiles y confiables ya que cuanto más pequeño sea el %SD, menor error estará asociado a la medición del dato. La cifra CCR es fijada por los investigadores y estas dependen de los datos con los que se realice el estudio. En nuestro caso se realizó con una CCR menor de 30, ya que era la más apropiada aun siendo conservadora puesto que los espectros que se obtuvieron para realizar el estudio son de alta calidad, por tanto, esta elección permitió usar más datos en la investigación sin comprometer al estudio.

Por tanto, los datos que se usaran para realizar el análisis estadístico serán aquellos que cumplan las siguientes condiciones como se nombró anteriormente:

- Concentración de metabolitos normalizados por creatina para ambos grupos (Ciegos y Controles sanos)
- Datos que tengan %SD menores de 30.

Se realizaron estudios como se comentó anteriormente para comprobar la existencia de diferencias de metabolitos normalizados por creatina entre ciegos y controles sanos, teniendo en cuenta variables como el sexo y la edad. Las variables como tiempo de aparición y tipo de ceguera se estudiaron comparando la diferencia de metabolitos, si la hubiera, entre ciegos de nacimiento frente a los ciegos que han adquirido la falta de visión, así como, en el caso del tiempo de aparición el estudio se basó en las diferencias entre ciegos que presentaban la ceguera en los primeros 12 años de vida frente a los que la presentaban ceguera en años posteriores.

Se procede a estudiar por variables el p valor obtenido y el significado que presenta para cada estudio de variables. A continuación, se presentarán tablas para los diferentes análisis realizados en esta investigación, así como representaciones graficas si fueran necesarias para aclarar el ensayo que se esté abordando.

- **Sexo y Edad**

Se estudió si existían diferencias en las concentraciones de metabolitos comparando ciegos hombres y mujeres, así como controles de ambos sexos. Para ello se realizó un análisis estadístico usando *Wilcoxon test*.

Sexo			
Grupos	P valor	Signif.	Prueba
Ciegos de ambos sexos (Normalizados)	0,0584	ns	Wilcoxon test
Controles de ambos sexos (Normalizados)	0,2411	ns	Wilcoxon test

Tabla 5. Resultados del estudio estadístico, presentando los p valor para el estudio de diferencias entre ciegos y controles sanos respecto al sexo.

Usando este test, da como resultado un p valor de 0,0584 en el caso de los ciegos por sexos y 0,2411 en el grupo de controles sanos, como puede verse en la tabla superior. De estos resultados podemos concluir que no son significativos en ningún caso para un p menor de 0,05, por tanto, es posible aceptar la hipótesis nula, considerando que no hay diferencias en ambos grupos.

Una vez comprobado que no hay diferencias entre los grupos estudiados se realizó un *Multiple t test* para comprobar si existen diferencias en los metabolitos de interés para este estudio, comprobándose que el único metabolito que presentó diferencia fue la Aspártico (*) con un p valor menor 0,05, aun así, no es posible descartar la hipótesis nula.

Ciegos Hombres y Mujeres			
Metabolito	P valor	Signif.	Prueba
Asp	0,03913090	ns	Multiple t test

Tabla 6. Resultados del estudio estadístico, presentando los p valor para el estudio de diferencias en los metabolitos entre ciegos y controles respecto al sexo.

Al realizar un *Multiple t test* relacionando ciegos de ambos sexos y, por otro lado, controles de la misma forma, se obtuvo la gráfica que se presentará a continuación.

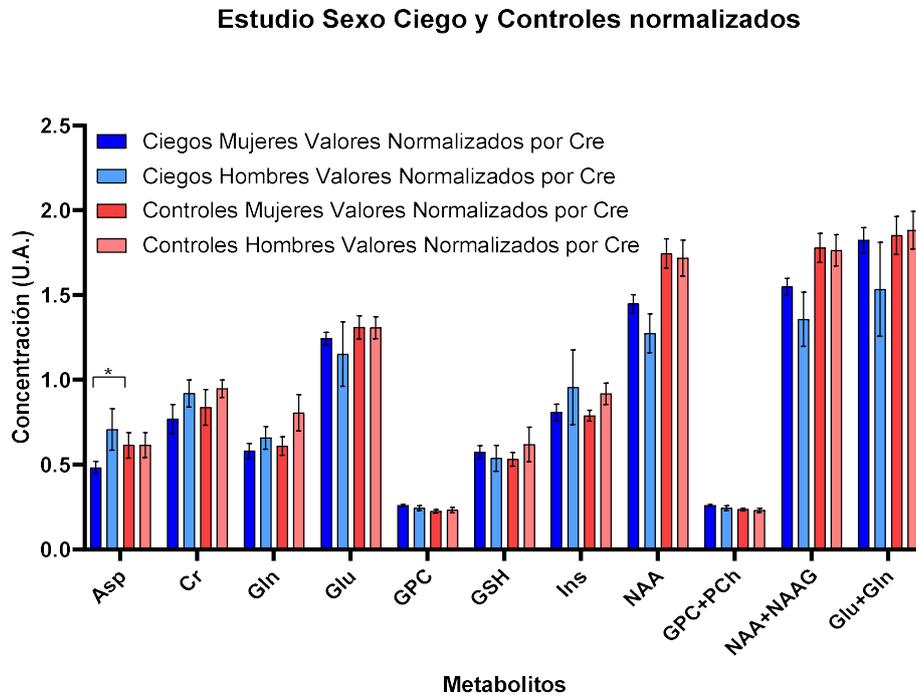


Figura 7. Representación de la diferencia de concentración en los metabolitos de ciegos y controles sanos respecto al sexo.

En este caso el aspártico disminuye en mujeres ciegas respecto a hombres ciegos, pero es probable que se haya producido algún error, ya que es sospechoso que solo aparezca significación en un solo metabolito y tampoco hay datos en la literatura científica sobre cambios en el Asp asociado al sexo, por lo tanto, lo consideraremos un error sistemático. (Cichocka et al., 2018; García Santos et al., 2010)

Además, se llevó a cabo estudios de ciegos y controles sanos respecto a la edad, para comprobar si existía significación en estos grupos se realizó un *Multiple t test*. Los resultados obtenidos en relación con la edad fueron:

Edad			
Grupos	P valor	Signif.	Prueba
Ciegos y Controles sanos (Normalizados)	0,927256	ns	Multiple t test

Tabla 7. Resultados del estudio estadístico, presentando los p valor para el estudio de diferencias entre ciegos y controles respecto a la edad.

El p valor obtenido realizando este test es de 0,9272, no muestra significación y por tanto hay certeza de que se acepta la hipótesis nula. Es decir que no hay diferencias entre los grupos estudiados para la variable edad y por tanto es un grupo homogéneo que pertenece a la misma población.

Debido al p valor de los estudios realizados para las variables sexo y edad, puede ser aceptada la hipótesis nula, la cual parte del supuesto de que no hay diferencias entre la concentración de metabolitos en ciegos y controles sanos. Como se puede apreciar en la siguiente grafica.

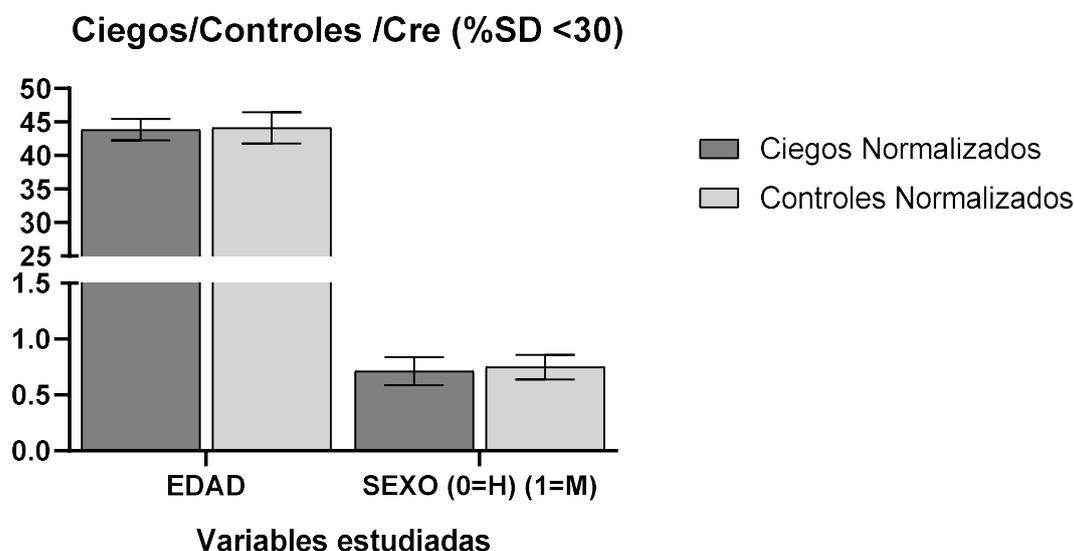


Figura 8. Representación mediante gráfico de barras de los resultados del estudio estadístico realizado para las diferencias entre ciegos y controles sanos, teniendo en cuenta el sexo y la edad.

- **Tiempo de aparición**

Para obtener los resultados de este apartado se realizó un estudio comparando personas con ceguera respecto al tiempo de aparición en

distintas etapas de su vida, con ello se pretende observar si hay diferencias en la concentración de los metabolitos cuando difiere el tiempo en el cual ha aparecido la privación visual. El rango estudiado de tiempo sitúa la pérdida de visión antes de los 12 años, así como después.

Tiempo de aparición			
Grupos	P valor	Signif.	Prueba
Ciegos (ceguera temprana) y ciegos (ceguera tardía)	0,1850	ns	Multiple t test

Tabla 8. P valor obtenido para el estudio del tiempo de aparición de la ceguera temprana y tardía.

Se acepta la hipótesis nula, ya que no hay diferencias entre las personas con ceguera en los distintos tiempos de aparición, ya que el p valor obtenido realizando el *Multiple t test* es de 0,1850 siendo este superior a 0,05, por este motivo se acepta la homogeneidad entre estos grupos estudiados.

- **Tipo de ceguera**

La causa de la ceguera que se estudiará a continuación es el estudio más importante respecto a las otras variables estudiadas. Se realiza una comparación entre pacientes con ceguera congénita respecto a personas con ceguera que han adquirido con los años.

Este grupo está formado por ciegos que presentan una ceguera total desde el momento de su nacimiento, mientras el otro grupo está formado por personas con ceguera total que ha sido adquirida después de su nacimiento por diversas causas como las que se comentaron en la *tabla 1*.

Tipo de la ceguera			
Grupos	P valor	Signif.	Prueba
Ciegos (ceguera congénita) y ciegos (ceguera adquirida)	0,0003	***	Wilcoxon test

Tabla 9. P valor obtenido en el estudio tipo de ceguera (congénita y adquirida)

Con este resultado se rechaza la hipótesis nula, aceptando que los grupos estudiados difieren, esta conclusión es posible ya que el p valor obtenido realizando un *Wilcoxon test* es de 0,0003 por tanto es un valor muy significativo puesto que ha superado los test de corrección (*False Discovery Rate*, FDR).

Por otro lado, al realizar un test t múltiple para observar que metabolitos difieren en este grupo se obtuvieron los siguientes resultados:

Valores de ciegos (congénitos) y ciegos (adquirido) con valores normalizados %SD<30			
Metabolitos	P valor	Prueba	Signif.
MM09	0,0373506	Multiple t test (Método Holm-Sidak)	*
MM17	0,0162704	Multiple t test (Método Holm-Sidak)	*

Tabla 10. P valor obtenido para las diferencias de metabolitos en el estudio tipo de ceguera (congénita y adquirida).

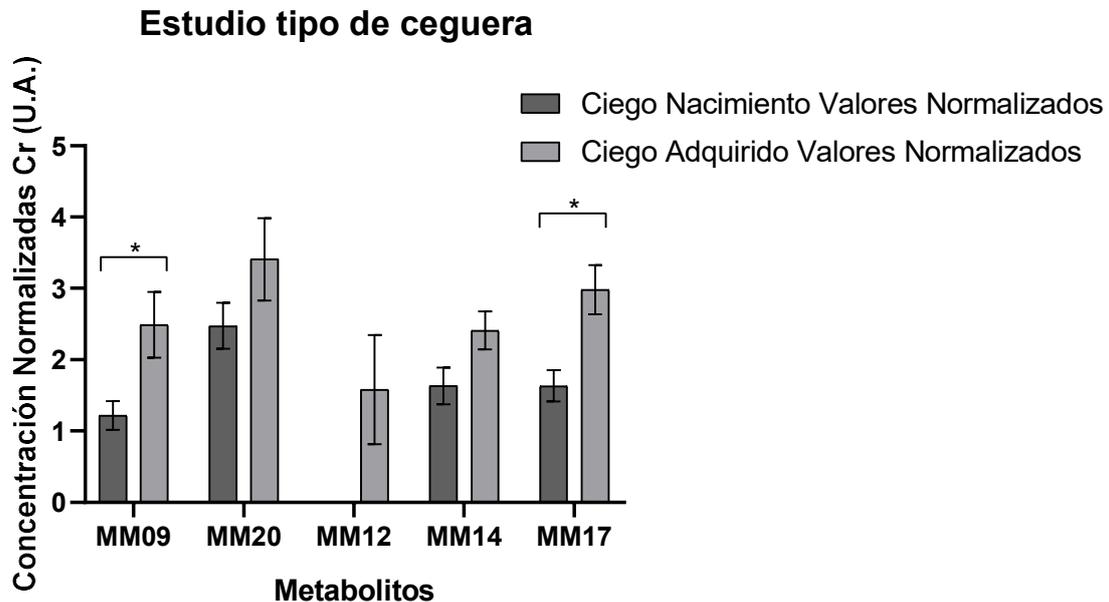


Figura 9. Representación mediante gráfico de barras de las diferencias de concentración de los metabolitos de ciegos congénitos y ciegos con ceguera adquirida a lo largo de los años.

Como se puede comprobar los resultados muestran una disminución en la concentración en macromoléculas como MM09 y MM17 en ciegos congénitos respecto a pacientes que han adquirido la ceguera después del

nacimiento, aunque este cambio sea mencionado no se abordará en este trabajo puesto que no es el objetivo de este estudio por la complejidad que presentan las macromoléculas dada su heterogeneidad y al hecho de que se asocian fundamentalmente a estados patológicos a nivel central.

Las macromoléculas son grandes moléculas poliméricas como son los polisacáridos, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Se encuentran formadas por el encadenamiento sucesivo de sustancias más pequeñas (monómeros) unidos entre si mediante distintos tipos de enlace. (Micocci, 2018)

No se abordará los cambios de macromoléculas en este trabajo puesto que presentan una gran dificultad entender los cambios que provocan. Se tiene muy poco conocimiento sobre ellas y son pocos los trabajos que las estudian a nivel bioquímico en la corteza cerebral. Son moléculas que se encuentran en su mayor parte en el torrente sanguíneo lo que dificultaría su análisis en la región concreta que se quiere estudiar, también están relacionadas con la aparición de patologías graves, en particular tumores cerebrales.

Todos los resultados obtenidos anteriormente han sido a partir de datos normalizados con creatina, pero en esta parte cabe destacar que al realizar el estudio para concentraciones de metabolitos de ciegos (congénitos) y ciegos (adquiridos) sin normalizar, el resultado mostró diferencia en las mismas macromoléculas que en el caso de valores normalizados con la peculiaridad que también se encontró cambios en Cr+PCr.

Valores de ciegos (congénitos) y ciegos (adquirido) %SD<30 Valores sin normalizar.			
Metabolitos	P valor	Prueba	Signif.
MM09	0,042774	Multiple t test (Método Holm-Sidak)	*
MM17	0,043015	Multiple t test (Método Holm-Sidak)	*
Cr+PCr	0,042642	Multiple t test (Método Holm-Sidak)	*

Tabla 11. P valor obtenido para la diferencia de metabolitos en el estudio de ciegos congénitos y ciegos adquiridos, teniendo en cuenta que las concentraciones no están normalizadas por creatina en este caso.

En la gráfica que se presenta a continuación se puede visualizar mejor los cambios de estos metabolitos, usando los datos de concentración de metabolitos no normalizados por creatina. Obteniendo al igual que con los datos normalizados una disminución de MM09 y MM17 en ciegos con ceguera congénita frente a ciegos con ceguera adquirida, pero como se comentó anteriormente también presenta este grupo diferencias en Cr+PCr, aumentando la concentración de este metabolito en el grupo de ciegos con ceguera de nacimiento. La Cr y PCr se asocian al metabolismo neuronal y glial.

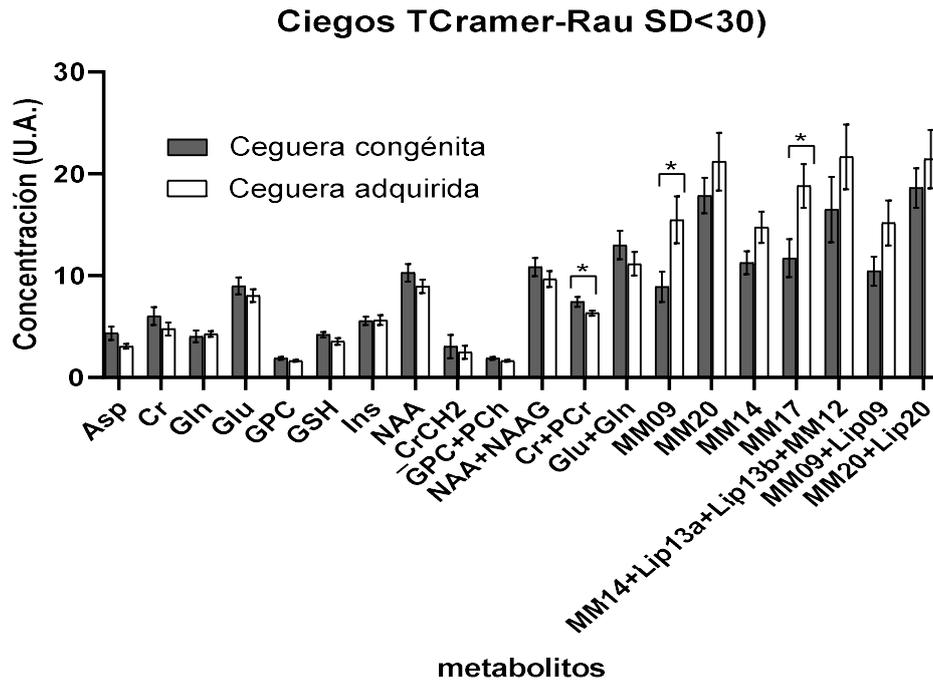


Figura 10. Representación mediante gráfico de barras de las diferencias de concentración de los metabolitos de ciegos congénitos y ciegos con ceguera adquirida a lo largo de los años, en este caso usando las concentraciones sin normalizar por creatina.

- **Estudio de hemisferios**

Como ya se comentó el hemisferio izquierdo como el derecho reciben inputs axónicos de las retinas (derecha e izquierda), por lo que cada una presenta una función diferente. Dado que todos los casos estudiados son ciegos totales de ambos ojos, se comprueba que ambos hemisferios no presentan diferencias y por tanto forman parte de un área homogénea del cerebro, pudiéndose tratar cada uno como un “cerebro”, es decir, cada una como una unidad sin hacer distinción entre hemisferios.

Pruebas de normalidad para estudios de hemisferios				
Grupos	P valor	Test de distribución normal	Pasa el test de normalidad	Signif.
Ciegos hemisferio derecho (Normalizado)	0,2905	Anderson-Darling test	Si	ns
	0,4580	D'Agostino & Pearson test	Si	ns
Ciegos hemisferio izquierdo (Normalizado)	0,3421	Anderson-Darling test	Si	ns
	0,5147	D'Agostino & Pearson test	Si	ns
Controles hemisferio derecho (Normalizado)	0,1962	Anderson-Darling test	Si	ns
	0,4696	D'Agostino & Pearson test	Si	ns
Controles hemisferio izquierdo (Normalizado)	0,0692	Anderson-Darling test	Si	ns
	0,3768	D'Agostino & Pearson test	Si	ns

Tabla 12. P valor obtenidos en las pruebas de normalidad realizadas en el estudio de homogeneidad de hemisferios.

A partir de los test de distribución normal se puede hallar que los valores cumplen las condiciones para una distribución normal, todos ellos pasan tanto el *Anderson-Darling test* como *D'Agostino & Pearson test*. Los resultados de los p valor no muestran significación por lo que se puede aceptar que las muestras de la corteza visual, los hemisferios derecha e izquierda, forman parte de la misma población, es decir son homogéneas estadísticamente, pudiendo ser estudiadas cada uno como “cerebros” independientes. Aunque cada uno de estos hemisferios tiene una función diferente (Figura 12), ya que tienen inputs axónicos de diferentes cuadrantes procedentes de ambas retinas.

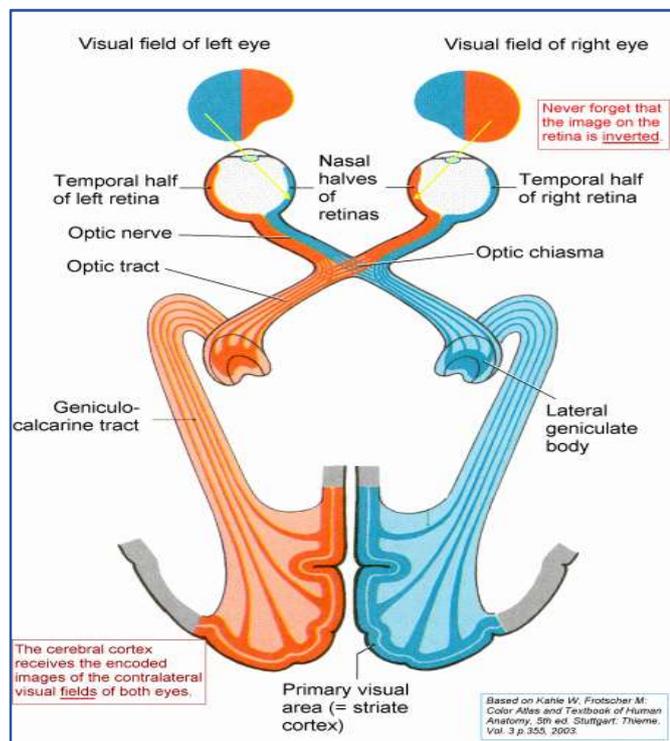


Figura 11. Se muestra el proceso por el cual se toma la información del campo visual hasta llegar al hemisferio correspondiente. Imagen tomada de: <https://slideplayer.com/slide/13701047/>

- **Estudio ciegos y controles**

En este estudio se realizó una comparación entre ciegos y controles (teniendo en cuenta que los datos usados presentaban las condiciones expuestas anteriormente: normalizados por creatina y cota de Cramèr-Rao menor de 30), para comprobar primeramente si existían diferencias significativas entre los grupos estudiados, para ello se realizó un test no paramétrico como el *Wilcoxon test*, obteniéndose un p valor de 0,0545 como se puede observar en la tabla que se presenta a continuación.

Valores de ciegos y controles (%SD<30)				
Grupos		P valor	Prueba	Signif.
Grupo A	Ciegos Normalizada	0,0545	Wilcoxon test-dos colas	ns
	Controles Normalizada			

Tabla 13. Resultados del estudio estadístico, presentando los p valor para el estudio de las diferencias de concentración de los metabolitos en ciegos y controles. (Normalizados por creatina (//Cr+PCr))

El p valor obtenido indica que puede o no haber diferencias significativas entre ambos grupos, siendo este de 0,0545 no es un valor significativo por lo que no podemos aceptar ni rechazar la hipótesis nula. El valor de p obtenido esta próximo a $p < 0,05$, quizás usando un mayor número de muestras se obtenga una clara significación.

Valores de Ciegos y Controles Normalizados %SD<30			
Metabolitos	P valor	Prueba	Signif.
Glc	0,028515	Multiple t test (Método Holm-Sidak)	*
GPC	0,014106	Multiple t test (Método Holm-Sidak)	*
NAA	0,000173	Multiple t test (Método Holm-Sidak)	***
GPC+PCh	0,033321	Multiple t test (Método Holm-Sidak)	*
NAA+NAAG	0,001244	Multiple t test (Método Holm-Sidak)	***

Tabla 14. Resultados del estudio estadístico, presentando los p valor para el estudio de diferencias de metabolitos entre ciegos y controles sanos. Los valores que han superado la False Discovery Rate (FDR) se muestran con ***, mientras que los valores con p menor a 0,05 se indican con *.

Se procede a estudiar si hay o no metabolitos que difieran en ciegos y controles sanos. Mostrando en la siguiente tabla los metabolitos que presentan diferencia para los grupos estudiados.

De los 35 metabolitos estudiados mediante el *multiple t test*, los que presentaron significación fueron Glc, GPC, NAA, GPC+PCh y NAA+NAAG. Los valores con mayor significación son NAA y NAA+NAAG, estos valores corresponden a los obtenidos después de realizar correcciones aplicando *False Discovery Rate* (FDR), se conoce como la corrección del error tipo I (*false positive rate*). Se define FDR como la probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta habiendo sido rechazada anteriormente por el test estadístico. Es un test de corrección usado en resonancia magnética que elimina los pixeles continuos, eliminando errores de muestreo, por tanto, es una prueba que tiene en consideración todos los tipos de errores. (Hall, 2008)

Por otro lado, se consideran los valores cuyo p valor es menor del 0,05, este es el caso de metabolitos como Glc, GPC y GPC+PCh, a los cuales no se les aplicó el FDR.

En el gráfico de barras se observa que los metabolitos que pasan o superan la corrección FDR $<0,0001$ están asignados con *** y los valores con p valor menor de 0,05 con *.

Concentraciones Normalizadas Cr (%SD -C. Cramer-Rau) < 30-

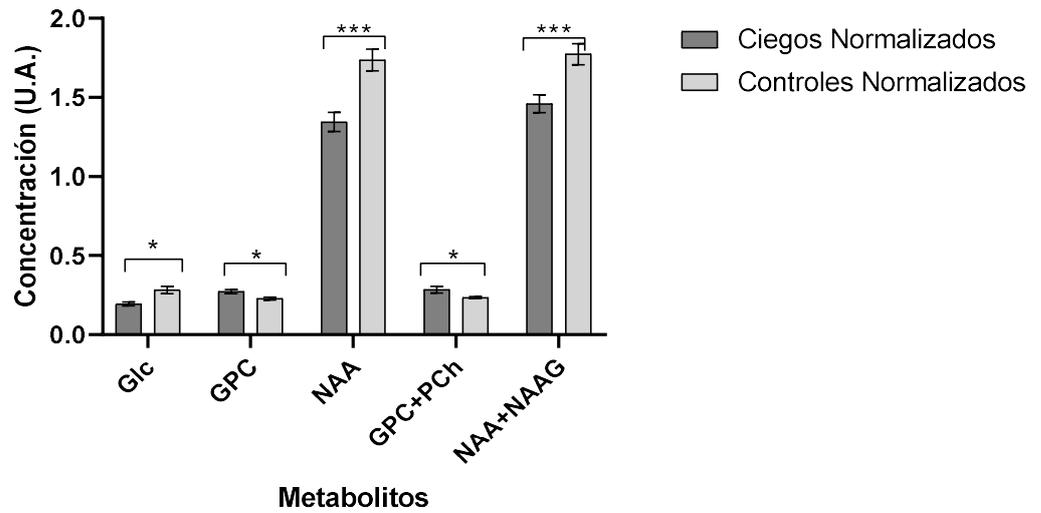


Figura 12. Representación de los resultados del estudio estadístico para diferencias de metabolitos entre ciegos y controles sanos.

En este gráfico se puede observar una disminución de las concentraciones de Glc, NAA y NAA+NAAG en ciegos respecto a los controles sanos, mientras que los metabolitos como GPC y GPC+PCh aumenta en el grupo de controles.

Discusión

Una vez se han estudiado los cambios de concentración de los metabolitos en la corteza visual, de ambos hemisferios por separado, en ciegos respecto a controles sanos, en nuestra muestra de estudio, se procede a extraer la información referente a los cambios que se producen en la corteza visual tras la ceguera y aclarar si se puede, la relación que tienen estos cambios con la neuroplasticidad, es decir, dar respuesta a la existencia de reclutamiento de las neuronas visuales por otras modalidades sensoriales como el tacto o la audición.

Antes de comenzar, se comentará las siguientes cuestiones, dando respuesta al por qué se realizó el estudio tomando los valores normalizados y no los no normalizados, así como por qué se normalizó por creatina y por qué se toman los datos con CCR menor de 30, estas cuestiones ya han sido comentadas, pero es conveniente tenerlo nuevamente en cuenta.

Se tomaron los valores normalizados para realizar el análisis estadístico en este estudio para evitar posibles errores de fluctuaciones de los datos debido a las variaciones que provocan las señales fisiológicas de los sujetos en estudio durante la MRS, estas medidas correspondían a las frecuencias cardíacas periféricas (pulso), frecuencia y amplitud respiratoria. Aunque se comprobó que no hay diferencias significativas si se usan los valores normalizados o no, es posible, ya que se utilizan espectros de alta calidad, ya que se usó un equipo de alto campo, 3.0 T. Se usan finalmente los normalizados ya que dan seguridad por si se produjera algún error en los datos. Por otro lado, se toma la creatina como estándar interno para normalizar los valores obtenidos en base a este metabolito debido a que la concentración de este se encuentra de manera similar en todas las áreas cerebrales, además muestra una señal estable con el tiempo si el paciente no

presenta patologías importantes. El uso de creatina corrige variaciones en la intensidad de la señal producidas por la colocación del vóxel, corrigiendo las variaciones que provoca el líquido cefalorraquídeo, así como las variaciones provocadas por la sensibilidad de las bobinas donde se recoge la señal. En relación con la cota de Cramèr-Rao menor de 30, es una decisión tomada por el propio investigador dependiendo de los datos que obtenga para realizar el estudio, en nuestro caso se tomó un valor menor de 30, pudiendo tomar un mayor número de datos sin poner en compromiso los resultados del estudio, ya que los espectros que se obtuvieron son de alta calidad.

En este trabajo se ha realizado el estudio más extenso en comparación a los encontrados en la literatura. Encontrando resultados coincidentes respecto algunos metabolitos en distintos trabajos y este. Como se pudo observar en trabajos anteriormente nombrados. (Bernabeu et al., 2009; Weaver et al., 2013; Wu et al., 2013). A pesar de encontrar estas diferencias en estudios anteriores, no han arrojado claridad sobre los procesos de modalidad cruzada neuronal que pueden aparecer en personas que presentan ceguera.

Se parte de dos suposiciones respecto a que los cambios producidos en la concentración de metabolitos presentes en la corteza cerebral de ciegos totales puede ocasionar o bien pérdida neuronal en la zona afectada debido a la deaferentación cortical tras degeneración retiniana o lesión en vías visuales (García & Vecino, 2003) o por el contrario, que los cambios de los distintos metabolitos pueden estar relacionados con procesos de cambios funcionales de las neuronas, reclutando las neuronas visuales por otras modalidades. Ni los cambios metabólicos ni los bioquímicos asociados a las diferencias metabólicas están claros, es por ello por lo que este trabajo trata de buscar respuestas a los cambios neuronales intermodales.

A continuación, se procederá a estudiar la relación de la variación de los metabolitos de ciegos y controles sanos en nuestra muestra de estudio y el concepto de neuroplasticidad. Los cambios se observaron en metabolitos como la glucosa, glicerofosfocolina, n-acetil-aspartato, también se visualizaron cambios en conjuntos o sumas de metabolitos como glicerofosfocolina junto fosfocolina y n-acetil-aspartato junto n-acetil-aspartato-glutamato. Se discutirán uno por uno los cambios en los metabolitos anteriormente nombrados y como se relaciona con la capacidad de tener las neuronas de incrementar sus conexiones con otras neuronas por medio de estimulación.

En el caso de la glucosa aparece una disminución en la concentración de los ciegos respecto a los controles sanos. La glucosa es el principal azúcar que circula por la sangre, considerada clásicamente como la fuente principal de energía del cerebro, este órgano requiere aproximadamente el 20% de la energía que proviene de la descomposición de la glucosa para tener una función cerebral correcta o apropiada. Una disminución de este azúcar puede ser secundaria al estar relacionada con la pérdida o muerte neuronal relacionados con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer como se ha demostrado en distintos trabajos como (Mergenthaler et al, 2013). Por otro lado, la alteración del metabolismo de la glucosa está relacionada con la muerte celular autofágica, o lo que es lo mismo la célula se consume así misma debido a una deficiencia de energía provocado por la disminución de Glc. Como se ha explicado, esto es debido a que las neuronas no pueden obtener suficiente energía de otros tipos de fuentes energéticas como los lípidos, siendo este tipo de energía inadecuada, lo cual debería ponerse en duda, puesto que la fuente de energía principal de las neuronas es un tema que se encuentra en debate actualmente. (Díaz-García et al., 2017) Por tanto, la escasez de energía y la gran demanda de ella generan un daño

en el sistema produciendo distintas enfermedades, debidas a la baja actividad neuronal. Por otro lado, la glucosa es usada por los astrocitos para formar lactato, por tanto, una disminución de la glucosa produciría por consiguiente una disminución de lactato, pero no se observan cambios relevantes de este último, probablemente debido a la baja sensibilidad del método usado para registrar lactato.

La Glicerofosfocolina es un neurotransmisor que contiene colina. La colina puede atravesar la barrera hematoencefálica, siendo un precursor de la acetilcolina. Este neurotransmisor tiene un papel importante en procesos de plasticidad neuronal como puede observarse en los siguientes artículos (Eggermann et al., 2009; Gullledge et al., 2005; Parikh et al., 2007), puede entenderse este aumento en pacientes ciegos debido a que el cerebro intenta compensar la falta de estímulos visuales, estableciendo las neuronas que no reciben estímulos, conexiones con áreas cerebrales vecinas. (Wu et al., 2013)

El N-acetil-aspartato por el contrario disminuye. Este comportamiento sugiere que se encuentran presentes en las neuronas del cerebro en personas adultas, siendo un marcador específico neuronal, como se observa en diferentes estudios. Se ha observado que la disminución de este metabolito en enfermedades que presentan pérdida de neuronas o axones. (Tesis Carlos Majós, Barcelona 1999; Tallan, 1957; Wu et al., 2013). En este último trabajo mencionado se observa el mismo cambio del N-acetil-aspartato en monos. Por tanto, el NAA es un marcador neuronal, que disminuye debido a daño o pérdida de neuronas.

Por otro lado, presentaron cambios los derivados de la colina como es la suma de metabolitos como la Glicerofosfocolina y Fosfocolina ya que se produjo un aumento en ciegos respecto a controles en nuestra muestra de estudio. El cambio observado refleja metabolismo de recambio celular, aumentando en procesos que producen hiperplasticidad, o aumento de

células en un tejido. Estos se han relacionado con la mielina siendo los productos de la destrucción de este último el origen del GPC+PCh. Se encuentra en la sustancia blanca y gris del cerebro donde existe diferencias ya que en la sustancia blanca su presencia es ligeramente mayor que en la gris. Variando tanto en procesos locales como en sistémicos, pudiendo existir contribución cerebral y también hepática en la concentración de estos metabolitos. Con esto se puede considerar que están implicados en procesos de neuroplasticidad.

También presentó diferencias n-acetil-aspartato junto con el n-acetil-aspartato-glutamato disminuyendo su concentración tal como se observó en la glucosa. Son usados como indicadores de densidad y viabilidad neuronal ya que estas se encuentran localizadas en neuronas y entre sus axones, por tanto, un descenso de la concentración de estas sustancias lleva a pensar que puede provocar pérdida neuronal, también es un marcador de la degeneración, incluyendo la disfunción, así como el daño estructural o la reducción del tamaño neuronal y de los axones. Una disminución de NAA y NAAG se pudo comprobar en algunos de los trabajos anteriores como el estudio de monos ciegos binoculares, debido a la reducción de los axones que transmiten entradas visuales a la corteza visual o esta disminución puede ser debida además a la degeneración de las neuronas y los axones. (Wu et al., 2013). Este suceso apoya la idea propuesta en la que la falta de estímulos en la corteza visual provocaría la degeneración de las neuronas que no cumplen su función debido a las deficiencias visuales que presentan las personas que padecen ceguera. (Soares et al., 2009)

Por último, la Creatina junto la Fosfocreatina también exhibió cambios en su concentración, este metabolito existe tanto en la materia gris como la blanca del cerebro, está presente en las principales células del parénquima cerebral, como las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, aunque se cree

que los pasos finales de la síntesis de creatina se llevan a cabo en la glía principalmente, estudios posteriores muestran incertidumbre sobre la concentración relativa de la creatina poniendo en duda la cantidad de creatina que aparece en las distintas células (Griffin et al., 2002) . La obtención de esta sustancia se realiza a través de la dieta y por síntesis endógena, aunque en el pasado se creía que la creatina presente en el cerebro provenía del aporte sanguíneo a través de la barrera hematoencefálica (BHE). (Andrés et al., 2008; Béard & Braissant, 2010). El sistema formado por creatina/ fosfocreatina tiene dos funciones principales en relación con la energía cerebral. Por un lado, proporciona un mecanismo de almacenamiento de energía debido a la alta cantidad de energía liberada a partir de la rotura de enlaces fosfatos en regiones donde la producción de ATP es alta y por el otro lado, proporciona un medio de transporte de enlaces fosfato de alta energía desde los lugares donde se producen hasta las regiones que requieren el aporte energético. Al contrario que las moléculas como el ATP y ADP, la creatina y la fosfocreatina se difunden más rápido a través de las regiones subcelulares. La alta velocidad a la que difunden hace que el sistema formado por la creatina/fosfocreatina sea un mecanismo eficiente para que la energía necesaria en los distintos compartimentos pueda llegar hasta ellas. (Andrés et al., 2008)

En este caso el sistema creatina/fosfocreatina aumentó en ciegos congénitos respecto a ciegos que adquirieron la ceguera a lo largo de su vida. Quizás se pueda extraer información importante de este hecho, ya que es probable que los ciegos congénitos reorganicen la actividad neuronal/glial de forma precoz y la compensación multimodal se establezca durante la reorganización del cerebro en etapas precoces del desarrollo. Por lo tanto, el desarrollo cerebral se realiza con áreas no visuales, acústicas y táctiles

fundamentalmente. Es por esta razón que se puede explicar el aumento energético.

Conclusiones

Una vez finalizado el análisis y la discusión de los resultados, se llega a las siguientes conclusiones:

En estudios de los grupos representativos de ciegos y controles sanos en relación con distintas variables como pueden ser el sexo, edad, tiempo de aparición de la ceguera y tipo de ceguera, siendo este último el más importante. En este se estudia las diferencias o cambios en concentraciones de metabolitos presentes en ciegos congénitos y ciegos que han tenido visión durante algunos años de su vida. Se observó un aumento de la creatina/fosfocreatina, pudiendo deberse a una mayor demanda de energía por el aumento de la actividad en la región visual. Este aumento de la actividad se traduciría en que las neuronas visuales estarían recibiendo estímulos de otras áreas, puesto que han podido ser reclutadas por otras modalidades sensoriales tales como la audición o el tacto para contrarrestar las deficiencias neuronales que provoca la ceguera.

Se produjeron cambios metabólicos entre ciegos y controles, los metabolitos que mostraron diferencias fueron Glc que presentó una disminución en el grupo de los ciegos, al igual que NAA y el NAA+NAAG, por el contrario, aumentaron de concentración el GPC y GPC+ Pch. Todo lo comentado anteriormente llevan a pensar que los cambios producidos en los metabolitos podrían deberse a que la ausencia de estímulos visuales en los casos de ceguera están relacionados a la mayor destrucción neuronal y glial por deaferentación, para evitar estos daños, las neuronas intentan establecer relaciones nuevas con las células neuronales de áreas próximas por medio de mecanismos de neuroplasticidad, por tanto este comportamiento podría explicar el incremento de la plasticidad multimodal en áreas de la audición o del tacto como se comprobó (Rowan, 2013; González-Mora et al., 1999).

Tanto el hemisferio izquierdo como el derecho reciben inputs axónicos de ambas retinas (derecha e izquierda), por lo que cada una tiene una función diferente, es decir la corteza cerebral recibe información codificada del campo visual contralateral de los dos ojos, se comprueba con este estudio que forman parte de un área homogénea del cerebro, por tanto, aunque tengan distinta función provienen de la misma población y podemos considerar a cada hemisferio como un área cerebral que procesa ambas retinas. Al presentar distintas funciones, se podría pensar que en el caso de personas que sufren ceguera al no recibir estímulos visuales, se podría reducir el metabolismo y la densidad celular en la corteza visual primaria. Las neuronas de estas áreas para contrarrestar la degeneración intentan establecer nuevas conexiones, incrementando su actividad para reclutar neuronas visuales para ser utilizadas en otras modalidades sensoriales.

En este estudio se logra observar cambios en los metabolitos estudiados pudiendo dar posibles respuestas a los cambios producidos, aunque no se logra aclarar la relación que hay entre las diferencias encontradas y la neuroplasticidad, por tanto, hacen falta más estudios para dar respuesta a las preguntas relacionadas con los cambios metabólicos y la neuroplasticidad a nivel cortical.

Por último, la 1H-MRS podría detectar cambios bioquímicos y metabólicos en la corteza visual y, por lo tanto, esta técnica se puede utilizar para proporcionar información muy valiosa para investigar los mecanismos de plasticidad multimodal de la ceguera total en personas ciegas.

Bibliografía

- Cecil, K. M. (2006). MR spectroscopy of metabolic disorders. *Neuroimaging Clinics of North America*, 16(1), 87–116. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2005.10.004>
- Programa, S., Radiolog, D. E. D. D. E., Al, P. O., Doctor, T. D. E., Medicina, E. N., Maj, C., Farr, J. A., Mar, J., & Sobrequ, M. (1999). Espectroscopia por resonancia magnética de protón en el diagnóstico de tumores cerebrales.
- González-Mora, J.L., & Marcano-Serrano, F.J. (2015). Método para la mejora de la calidad y resolución temporal de espectros 1h monovóxel de tiempo de eco reducido en resonancia magnética de cerebro.
- Departamento de Química Física, U. de V. (2011). Tema 10. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear. *Fundamentos de Química Orgánica*, 193–207. <http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA10FQO.pdf%0Awww.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA10FQO.pdf>
- Elaim, M. (2008). Plasticidad neuronal. *InfoMed Red de Salud de Cuba*, 42(2), 86–91. [https://doi.org/10.1016/S0048-7120\(08\)73619-3](https://doi.org/10.1016/S0048-7120(08)73619-3)
- Dayan, E., & Cohen, L.G. (2011) Neuroplasticity subserving motor skill learning. *Neuron*.72(3):443-54. doi: 10.1016/j.neuron.2011.10.008.PMID: 22078504
- Mehta, U.M., Thanki, M.V., Padmanabhan, J., Pascual-Leone, A., & Keshavan, M.S. (2019). Motor cortical plasticity in schizophrenia: A meta-analysis of Transcranial Magnetic Stimulation - Electromyography studies. *Schizophr Res*. 207:37-47. doi: 10.1016/j.schres.2018.10.027. Epub 2018 Nov 6. PMID: 30409696
- Prieto, J., Bayona, E., & León-Sarmiento, F. (2011). Neuroplasticidad, Neuromodulación y. *Scielo.Org.Co*, 27(1), 95–107. <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v27n1/v27n1a10.pdf>
- Wu, L., Tang, Z., Sun, X., Feng, X., Qian, W., Wang, J., & Jin, L. (2013). Metabolic changes in the visual cortex of binocular blindness macaque monkeys: A proton magnetic resonance spectroscopy study. *PLoS ONE*, 8(11), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080073>
- Bernabeu, A., Alfaro, A., García, M., & Fernández, E. (2009). Proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS) reveals the presence of elevated myo-inositol in the occipital cortex of blind subjects. *NeuroImage*, 47(4), 1172–1176. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.04.080>
- Weaver, K. E., Richards, T. L., Saenz, M., Petropoulos, H., & Fine, I. (2013). Neurochemical changes within human early blind occipital cortex. *Neuroscience*, 252, 222–233. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.004>
- Kupers, R., & Ptito, M. (2014). Compensatory plasticity and cross-modal reorganization following early visual deprivation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 41, 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.08.001>
- Rowan, D. (2013). Personas ciegas podrían localizar objetos emulando a los delfines. 1–2.
- González-Mora, J. L., R Odríguez-Hernández, A., Rodríguez-Ramos, L. F., Dfaz-Saco, L., & Sosa, N. (1999). Development of a new space perception system for blind people, based on the creation of a virtual acoustic space. *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 1607, 321–330. <https://doi.org/10.1007/BFb0100499>
- Provencher, S. W. (2001). Automatic quantitation of localized in vivo 1H spectra with LCMoDel. *NMR in Biomedicine*, 14(4), 260–264. <https://doi.org/10.1002/nbm.698>

Guía Graphpad 8:

<https://www.graphpad.com/guides/prism/8/statistics/parametricnonparametric.htm>

Guía Graphpad 7:

https://www.graphpad.com/guides/prism/7//statistics/stat_options_for_multiple_t_tests.htm

Delicado, P. (2016). Curso de Modelos no Paramétricos Pedro Delicado Departament d' Estadística. February.

Díaz, P., & Fernández, P. (2006). Investigación Métodos no paramétricos para la comparación de dos muestras. *Cad Aten Primaria Año*, 109–113.

Friedman, P. de. (2016). Prueba de Friedman Prueba de Kruskal - Wallis. 1–6.

Zhu, XH., Du, F., Zhang, N., Zhang, Y., Lei, H., Zhang, X., Qiao, H., Ugurbil, K., & Chen, W. (2009). Advanced In Vivo Heteronuclear MRS Approaches for Studying Brain Bioenergetics Driven by Mitochondria. *Methods Mol Biol.* 489: 317-57. doi: 10.1007/978-1-59745-543-5_15.

Szelényi, A., Bello, L., Duffau, H., Fava, E., Feigl, GC., Galanda, M., Neuloh, G., Signorelli, F., & Sala, F. (2010). Intraoperative electrical stimulation in awake craniotomy: methodological aspects of current practice. *Neurosurg Focus.* 28(2): E7. doi: 10.3171/2009.12.FOCUS09237.PMID: 20121442 Review.

Cichocka, M., Kozub, J., Karcz, P., & Urbanik, A. (2018). Sex differences in brain metabolite concentrations in healthy children - proton magnetic resonance spectroscopy study (1HMRS). *Polish Journal of Radiology*, 83, e24–e31. <https://doi.org/10.5114/pjr.2018.74536>

García Santos, J. M., Fuentes, L. J., Vidal, J. B., Antequera, M., Torres Del Río, S., Antúnez, C., & Ortega, G. (2010). Efecto regional, de la edad y el sexo en la espectroscopia por resonancia magnética cerebral. *Radiología*, 52(4), 342–350. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rx.2010.04.005>

Micocci, L. (2018). Biomoléculas: carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. *Química Biológica*, 6–7. http://www.unl.edu.ar/ingreso/cursos/medicina/wp-content/uploads/sites/8/2017/10/Quimica_09.pdf

Hall, P. (2008). Algunos problemas de actualidad en estadística * (Vol. 11, pp. 38–41).

García, M., & Vecino, E. (2003). Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 78(7), 351-364. Recuperado en 28 de junio de 2020, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-66912003000700004&lng=es&tlng=es.

Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, GA., & Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 36(10):587-97.

Díaz-García, C. M., Mongeon, R., Lahmann, C., Koveal, D., Zucker, H., & Yellen, G. (2017). Neuronal Stimulation Triggers Neuronal Glycolysis and Not Lactate Uptake. *Cell Metabolism*, 26(2), 361-374.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.021>

Eggermann, E., & Feldmeyer, D. (2009). Cholinergic filtering in the recurrent excitatory microcircuit of cortical layer 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106 (28): 11753–8.

Gulledge, A.T., & Stuart, G.J. (2005) Cholinergic inhibition of neocortical pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience.* 25 (44): 10308–20.

Parikh, V., Kozak, R., Martinez, V., & Sarter, M. (2007). Prefrontal acetylcholine release controls cue detection on multiple time scales. *Neuron.* 56 (1): 141–54.

Tallan, H.H. (1957). Studies on the distribution of N-acetyl-L-aspartic acid in brain. *J Biol Chem.* 224: 41-45.

Soares, D.P., Law, M., et al. (2009) Magnetic resonance spectroscopy of the brain: review of metabolites and clinical applications. *Rev. Clinical Radiology.* 64: 12-21.

Griffin, J. L., Bollard, M., Nicholson, J. K., & Bhakoo, K. (2002). Spectral profiles of cultured neuronal and glial cells derived from HRMAS (1)H NMR spectroscopy. *NMR in biomedicine*, 15(6), 375–384. <https://doi.org/10.1002/nbm.792>

Andres, R. H., Ducray, A. D., Schlattner, U., Wallimann, T., & Widmer, H. R. (2008). Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain research bulletin*, 76(4), 329–343. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.02.035>

Béard, E., & Braissant, O. (2010). Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *Journal of neurochemistry*, 115(2), 297–313. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06935>.