



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina
Doctorado en Neurociencia UAM Cajal

Tesis doctoral

**APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS EN LA
IDENTIFICACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS CEREBRALES
Y LA MONITORIZACIÓN DE LA HEMORRAGIA
INTRACEREBRAL EN RATA**

MARÍA DEL CARMEN GÓMEZ DE FRUTOS

Madrid, 2022



APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS CEREBRALES Y LA MONITORIZACIÓN DE LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL EN RATA

Tesis Doctoral presentada por la graduada

MARÍA DEL CARMEN GÓMEZ DE FRUTOS

para optar al grado de **DOCTOR**

Directores:

Dr. GERARDO RUIZ ARES

Facultativo Especialista de Área en Neurología

Servicio de Neurología y Centro de Ictus

Hospital Universitario La Paz

Universidad Autónoma de Madrid

Dra. MARÍA GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ

Investigadora Miguel Servet

Coordinadora del Laboratorio de Ciencias Neurológicas y Cerebrovascular, IdiPAZ

Hospital Universitario La Paz

Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2022



El **Dr. Gerardo Ruiz Ares**, Licenciado en Medicina, Doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid y Facultativo Especialista de Área en Neurología del Servicio de Neurología del Hospital Universitario La Paz e investigador en el Área de Neurociencias del IdiPAZ, y la **Dra. María Gutiérrez Fernández**, Licenciada en Biología, Doctora en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid, Investigadora Miguel Servet y Coordinadora del Laboratorio de Ciencias Neurológicas y Cerebrovascular del Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado **“APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS CEREBRALES Y LA MONITORIZACIÓN DE LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL EN RATA”** ha sido realizado por Dña. María del Carmen Gómez de Frutos bajo su dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis para alcanzar el grado de Doctor ante el tribunal correspondiente en la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid,

Fdo:

Fdo:

Dr. Gerardo Ruiz Ares

Dra. María Gutiérrez Fernández

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III con los códigos de los expedientes PI16/01052 y FI17/00188, cofinanciado por la Unión Europea a través del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

A mis padres, Fernando y Mari Carmen

A mi hermana, Sara

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| <hr/> | |
| INTRODUCCIÓN | 11 |
| <hr/> | |
| 1. Enfermedad cerebrovascular | 13 |
| 1.1. Epidemiología de la hemorragia intracerebral | 14 |
| 1.2. Patogenia de la hemorragia intracerebral | 15 |
| 1.3. Monitorización de la hemorragia intracerebral en pacientes | 19 |
| 2. Modelos animales de hemorragia intracerebral | 20 |
| 3. Monitorización de la hemorragia intracerebral en los modelos animales | 22 |
| 3.1. Resonancia magnética | 22 |
| 3.2. Ultrasonidos | 23 |
| <hr/> | |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 27 |
| <hr/> | |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| <hr/> | |
| 1. Diseño del estudio | 33 |
| 2. Equipos y materiales utilizados | 33 |
| 3. Sujetos a estudio | 35 |
| 4. Abordaje para la identificación de estructuras cerebrales | 36 |
| 5. Inducción de la hemorragia intracerebral | 38 |
| 6. Evaluación funcional | 40 |
| 7. Estudios de imagen | 43 |
| 7.1. Identificación de las estructuras cerebrales | 43 |
| 7.2. Resonancia magnética | 43 |
| 7.3. Ultrasonidos | 44 |
| 7.4. Determinación del volumen de hemorragia y del desplazamiento de estructuras cerebrales | 47 |
| 8. Inmunohistoquímica de cortes histológicos de cerebro de rata | 49 |
| 9. Análisis estadístico | 50 |

| | |
|--|-----------|
| RESULTADOS | 51 |
| OBJETIVO 1. Establecer la utilidad de los ultrasonidos en la visualización e identificación de las estructuras cerebrales en rata | 53 |
| 1. Identificación de las estructuras cerebrales | 53 |
| 2. Barreras para la identificación de estructuras cerebrales | 56 |
| OBJETIVO 2. Evaluar en un modelo animal de hemorragia intracerebral la utilidad de los ultrasonidos en el estudio de la lesión cerebral (volumen de hemorragia y desplazamiento de estructuras cerebrales) comparando los datos obtenidos con la resonancia magnética | 59 |
| 1. Volumen de hemorragia intracerebral con ultrasonidos y resonancia magnética | 59 |
| 2. Visualización del desplazamiento de estructuras cerebrales por la hemorragia intracerebral mediante ultrasonidos y resonancia magnética | 61 |
| OBJETIVO 3. Valorar la utilidad de los ultrasonidos en la monitorización de los cambios evolutivos en el volumen de la hemorragia intracerebral y en el desplazamiento de las estructuras cerebrales | 65 |
| 1. Monitorización del volumen de la hemorragia intracerebral con ultrasonido | 65 |
| 2. Monitorización del desplazamiento de estructuras cerebrales con ultrasonidos | 67 |
| OBJETIVO 4. Analizar la correlación del volumen de la hemorragia intracerebral, medido por ultrasonidos y por resonancia magnética, con la evaluación funcional | 70 |
| 1. Mortalidad | 70 |
| 2. Estado clínico de los animales | 70 |
| 3. Correlación entre el volumen de la hemorragia intracerebral y la evaluación funcional | 73 |

DISCUSIÓN **75**

1. Establecer la utilidad de los ultrasonidos en la visualización e identificación de las estructuras cerebrales en rata 77
2. Evaluar en un modelo animal de hemorragia intracerebral la utilidad de los ultrasonidos en el estudio de la lesión cerebral (volumen de hemorragia y desplazamiento de estructuras cerebrales) comparando los datos obtenidos con la resonancia magnética 80
3. Valorar la utilidad de los ultrasonidos en la monitorización de los cambios evolutivos en el volumen de la hemorragia intracerebral y en el desplazamiento de las estructuras cerebrales 83
4. Analizar la correlación del volumen de la hemorragia intracerebral, medido por ultrasonidos y por resonancia magnética, con la evaluación funcional 84

CONCLUSIONES **89**

BIBLIOGRAFIA **93**

ANEXOS **103**

Artículo 1

Identification of brain structures and blood vessels by conventional ultrasound in rats. Gómez-de Frutos MC, et al. J Neurosci Methods. 2020;346:108935. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2020.108935

Artículo 2

The role of ultrasound as a diagnostic and therapeutic tool in experimental animal models of stroke: a review. Gómez-de Frutos MC, et al. Biomedicines. 2021;9(11):1609. DOI: 10.3390/biomedicines9111609

Artículo 3

B-mode ultrasound, a reliable tool for monitoring experimental intracerebral hemorrhage. Gómez-de Frutos MC, et al. Front Neurol. 2021;12(771402):1-10. DOI: 10.3389/fneur.2021.771402

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Índice de abreviaturas y acrónimos por orden alfabético que aparecen en el texto. En algunos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

3V: tercer ventrículo

AC: acueducto cerebral

AINE: antiinflamatorio no esteroideo

BHE: barrera hematoencefálica

CA: cisterna ambiens

CC: cuerpo calloso

CCG: cisterna cuadrigeminal

CSs: cisternas subaracnoideas

CIP: cisterna interpeduncular

DE: desviación estándar

ECV: enfermedad cerebrovascular

Hb: hemoglobina

HIC: hemorragia intracerebral

HSA: hemorragia subaracnoidea

IL-1beta: interleucina-1beta

MMP: metaloproteasas de matriz

OCT: del inglés *Optimal Cutting Temperature*

PMN: leucocitos polimorfonucleares

RDC: ratio de desplazamiento de las cisternas

RM: resonancia magnética

STR: estriado

T: Teslas

TC: tomografía computarizada

TNF-alfa: factor de necrosis tumoral alfa (del inglés *tumor necrosis factor*)

US: ultrasonidos

VL: ventrículo lateral

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La hemorragia intracerebral (HIC) se produce como consecuencia de la rotura de un vaso sanguíneo arterial o venoso, que conlleva a una extravasación de sangre dentro de la cavidad craneal. Aunque éste representa entre el 10-15 % de todos los ictus, su mortalidad y morbilidad es mayor que la del infarto cerebral. La patogenia de la HIC consiste en una lesión primaria, causada por la formación del hematoma, y una lesión secundaria, causada por la reacción inflamatoria generada. El pronóstico de la misma depende de la gravedad del sangrado que condiciona el deterioro neurológico, por lo que, un diagnóstico precoz es clave para favorecer la recuperación. En la actualidad, las técnicas disponibles para el diagnóstico del ictus son la tomografía computarizada (TC) o la resonancia magnética (RM). Sin embargo, éstas cuentan con una serie de limitaciones como son la disponibilidad, el tiempo de adquisición, la necesidad de transportar al paciente, la tolerabilidad o la radiación ionizante en el caso de la TC. Por ello, incorporar nuevas herramientas que solventen los mencionados inconvenientes, supondría un avance en el diagnóstico precoz y seguimiento. En este sentido, los ultrasonidos son una técnica rápida, no invasiva, bien tolerada, económica y portátil, que permite obtener imágenes dinámicas, proporcionando información estructural y funcional de interés. Diversos estudios han demostrado la validez de los ultrasonidos en la monitorización de la HIC en pacientes, sin embargo, estos trabajos no han sido lo suficientemente relevantes como para conseguir su implementación en la práctica clínica habitual. Es por ello, que surge la necesidad de llevar a cabo estudios de investigación en modelos preclínicos para poder trasladar la utilidad de los ultrasonidos a los pacientes. En lo que respecta a los modelos animales, la RM es la técnica de referencia para estudiar el cerebro *in vivo*, debido a su alta resolución y sensibilidad. No obstante, debido a sus limitaciones se deberían buscar alternativas a la misma y es ahí donde los ultrasonidos, al haber experimentado un gran avance tecnológico en cuanto a la calidad y definición de las imágenes, podrían tener una gran relevancia en el estudio y la monitorización de la HIC, evaluando el parénquima cerebral y los cambios estructurales que se producen como consecuencia de la lesión. Por todo ello, debido a los rápidos avances de las tecnologías de imagen, es necesario llevar a cabo más

investigaciones preclínicas que reforzarían la evidencia científica en este campo permitiendo la traslación al paciente.

HIPÓTESIS

En base a estos antecedentes nos planteamos la siguiente hipótesis:

El uso de los ultrasonidos permitiría la identificación de las estructuras cerebrales en roedores. Además, en un modelo animal experimental de hemorragia intracerebral los ultrasonidos permitirían la evaluación y su monitorización, estudiando los cambios evolutivos en el volumen de la misma, así como las alteraciones estructurales que se producen como consecuencia del daño generado.

OBJETIVOS

Para demostrar la hipótesis planteada nos proponemos los siguientes objetivos:

1. Establecer la utilidad de los ultrasonidos en la visualización e identificación de las estructuras cerebrales en rata.
2. Evaluar en un modelo animal de hemorragia intracerebral la utilidad de los ultrasonidos en el estudio de la lesión cerebral (volumen de hemorragia y desplazamiento de estructuras cerebrales) comparando los datos obtenidos con la resonancia magnética.
3. Valorar la utilidad de los ultrasonidos en la monitorización de los cambios evolutivos en el volumen de la hemorragia intracerebral y en el desplazamiento de las estructuras cerebrales.
4. Analizar la correlación del volumen de la hemorragia intracerebral, medido por ultrasonidos y por resonancia magnética, con la evaluación funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo 1. Se utilizaron un total de 6 ratas sanas machos y hembras (proporción 1:1) Sprague-Dawley (225-275 g). El análisis de la anatomía cerebral se realizó mediante estudios por RM de 7 Teslas para obtener imágenes en T2. Se utilizó un ecógrafo Xario 200 con una sonda lineal de 13 MHz para la obtención de imágenes en modo B. Con el fin de reducir los obstáculos para la visualización de estructuras mediante ultrasonidos

se realizaron 4 abordajes transcraneales: el transductor se colocó directamente sobre la piel, el cráneo, una craneotomía delimitada y una craneotomía total. Los animales se sacrificaron al finalizar la visualización de estructuras. Para identificar y correlacionar las estructuras cerebrales *ex vivo* se creó un atlas y se llevó a cabo la tinción de Nissl.

Objetivos 2, 3 y 4. Se utilizaron un total de 31 ratas machos y hembras (16 machos y 15 hembras) Sprague-Dawley (225-275 g). Los animales se dividieron en 3 grupos: 1, sanos (n=10, 5 machos y 5 hembras); 2, sham (n=10, 5 machos y 5 hembras); 3, HIC (n=11, 6 machos y 5 hembras). La inducción de la HIC se realizó mediante la inyección de 0,5 U de colagenasa-IV en los ganglios basales del hemisferio derecho siguiendo las referencias estereotáxicas 0,04 mm posterior, 3,5 mm lateral y 6 mm ventral respecto al área de Bregma. Los animales sham fueron sometidos a todo el procedimiento quirúrgico a excepción de la administración de colagenasa-IV. La evaluación neurológica para analizar el déficit motor de los animales, se realizó mediante el test de la barra, la barra con escalón, el cilindro rotatorio (Rotarod) y el test de Rogers: antes de la inducción de la HIC y a las 48 horas, 96 horas y 1 mes tras la cirugía. La obtención de imágenes cerebrales en T2 se llevó a cabo mediante RM de 7 Teslas a las 48 horas y al mes de la cirugía. Los estudios por ultrasonidos se realizaron antes de la cirugía y a las 5 horas, 48 horas, 96 horas y 1 mes de la cirugía. El volumen de HIC (AxBxC/2) y el desplazamiento de estructuras cerebrales (distancia cisternas subaracnoideas-duramadre) se analizó tanto por ultrasonidos como por RM, comparándose los datos entre ambas técnicas. Los animales se sacrificaron al mes tras la inducción de la HIC. La normalidad de los datos fue comprobada con el test Shapiro-Wilk. Para comprobar la existencia de diferencias significativas en las variables entre los grupos, se usó el test de Tukey si no se rechazaba la normalidad de los datos, o de Mann-Whitney si se rechazaba su normalidad. Para comparar la similitud entre los datos se usaron los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman. Los p-valores menores a 0,05 fueron considerados significativos.

RESULTADOS

Objetivo 1: Establecer la utilidad de los ultrasonidos en la visualización e identificación de las estructuras cerebrales en rata. A través del atlas anatómico, la RM

y los cortes histológicos teñidos con Nissl, se identificaron las siguientes estructuras cerebrales: corteza cerebral, cuerpo caloso, ventrículos laterales, tercer ventrículo, estriado, cisternas subaracnoideas y acueducto cerebral. Por ultrasonidos, a medida que se avanzaba en los diferentes abordajes transcraneales (piel, cráneo, craneotomía delimitada y craneotomía total) para la visualización de las estructuras cerebrales, éstas fueron más claramente identificadas. Así a través de la piel sólo se pudieron identificar las cisternas subaracnoideas. Cuando el transductor se colocó sobre el cráneo, así como sobre la craneotomía delimitada, se pudieron identificar más estructuras como los ventrículos laterales y las cisternas subaracnoideas. Finalmente, con la craneotomía total fue posible visualizar un mayor número de estructuras que correspondían a los ventrículos laterales, tercer ventrículo, acueducto cerebral y cisternas subaracnoideas.

Objetivo 2: Evaluar en un modelo animal de hemorragia intracerebral la utilidad de los ultrasonidos en el estudio de la lesión cerebral (volumen de hemorragia y desplazamiento de estructuras cerebrales) comparando los datos obtenidos con la resonancia magnética. En el modelo experimental de HIC se observó la hemorragia por ultrasonidos como una señal hiperecogénica a las 48 horas volviéndose hipoecogénica al mes. Al analizar por la técnica de ultrasonidos el volumen de la HIC, éste disminuyó significativamente desde las 48 horas ($66,22 \pm 23,19 \text{ mm}^3$) al mes ($17,36 \pm 9,97 \text{ mm}^3$, $p=0,001$). La RM identificó la lesión como una señal hiperintensa a las 48 horas, transformándose al mes en hiper/isointensa. Al analizar por RM el volumen de la HIC, también se observó una reducción en el mismo entre las 48 horas y el mes ($71,86 \pm 24,75 \text{ mm}^3$ vs $21,49 \pm 9,74 \text{ mm}^3$, $p=0,001$). Al comparar los resultados entre ambas técnicas de imagen, se observó una excelente correlación en la medición del volumen de HIC tanto a las 48 horas ($r=0,905$, $p=0,001$) como al mes ($r=0,656$, $p=0,028$). En cuanto al desplazamiento de las estructuras cerebrales causado por el efecto de masa de la HIC, se identificó por ultrasonidos una mayor distancia en la ratio de las cisternas subaracnoideas con respecto a la duramadre en el lado ipsilateral a la lesión en el grupo de animales con HIC ($1,06 \pm 0,04$) comparado con el grupo de animales sanos ($0,99 \pm 0,02$, $p=0,001$) y el grupo sham ($0,99 \pm 0,04$, $p=0,004$) a las 48 horas. Por RM, también se observó en el hemisferio ipsilateral una mayor distancia de las cisternas-duramadre en el grupo de animales con HIC ($1,06 \pm 0,04$) con respecto al grupo sano

($0,98 \pm 0,02$, $p=0,002$) y sham ($0,99 \pm 0,03$, $p=0,008$) a las 48 horas. Sin embargo, estas diferencias desaparecieron al mes con ambas herramientas de imagen ($p > 0,05$). Al cotejar estos datos entre ambas técnicas, se observó una buena correlación en la medición de la distancia de las cisternas-duramadre en el hemisferio contralateral ($r=0,906$, $p=0,001$) e ipsilateral ($r=0,870$, $p=0,001$) al mes.

Objetivo 3: Valorar la utilidad de los ultrasonidos en la monitorización de los cambios evolutivos en el del volumen de la hemorragia intracerebral y en el desplazamiento de las estructuras cerebrales. Por ultrasonidos se observó como la HIC disminuía significativamente con el tiempo, desde las 5 horas ($58,92 \pm 24,70 \text{ mm}^3$), 48 horas ($66,22 \pm 23,19 \text{ mm}^3$) y 96 horas ($65,27 \pm 27,62 \text{ mm}^3$) con respecto al mes ($17,36 \pm 9,97 \text{ mm}^3$, $p=0,001$). Cuando se visualizó la señal hemorrágica, ésta fue hiperecogénica a las 5 horas, 48 horas y 96 horas, volviéndose hipoecogénica al mes. Al analizar la ratio de la distancia de las cisternas subaracnoideas con respecto a la duramadre no se observaron diferencias significativas entre los animales de los grupos sanos y sham ($p > 0,05$). Sin embargo, se observó un aumento significativo en el lado ipsilateral de los animales con HIC ($1,06 \pm 0,04$) con respecto a los animales sanos ($0,99 \pm 0,02$, $p=0,001$) y sham ($0,99 \pm 0,04$, $p=0,004$) a las 48 horas. Esta distancia también fue mayor en los animales con HIC ($1,06 \pm 0,04$) con respecto a los sanos ($0,99 \pm 0,02$, $p=0,026$) a las 96 horas. Las diferencias desaparecieron al mes ($p > 0,05$). Finalmente, al analizar, dentro del grupo de animales con HIC, el desplazamiento de las cisternas-duramadre, se obtuvieron los siguientes resultados: $0,03 \pm 0,19 \text{ mm}$ a las 5 horas, $0,21 \pm 0,14 \text{ mm}$ a las 48 horas, $0,13 \pm 0,18 \text{ mm}$ a las 96 horas y $0,08 \pm 0,23 \text{ mm}$ al mes. Este seguimiento también fue realizado por RM donde se observó una reducción en el volumen de la HIC entre las 48 horas y el mes ($71,86 \pm 24,75 \text{ mm}^3$ vs $21,49 \pm 9,74 \text{ mm}^3$, $p=0,001$), así como también se observó en el hemisferio ipsilateral una mayor distancia de las cisternas-duramadre en el grupo de animales con HIC ($1,06 \pm 0,04$) con respecto al grupo sano ($0,98 \pm 0,02$, $p=0,002$) y sham ($0,99 \pm 0,03$, $p=0,008$) a las 48 horas, como se he comentado en el objetivo 2.

Objetivo 4: Analizar la correlación del volumen de la hemorragia intracerebral, medido por ultrasonidos y por resonancia magnética, con la evaluación funcional.

Cuando se analizó la evaluación funcional en los animales de los diferentes grupos experimentales, en el test de la barra, los animales con HIC mostraron un deterioro funcional significativo con respecto a los animales sanos a las 48 horas ($4,64 \pm 1,12$ puntos vs $0,00 \pm 0,00$ puntos respectivamente, $p=0,001$), 96 horas ($3,45 \pm 1,51$ puntos vs $0,20 \pm 0,63$ puntos, $p=0,001$) y al mes ($2,18 \pm 1,83$ puntos vs $0,00 \pm 0,00$ puntos, $p=0,003$). Este deterioro también se observó entre los animales con HIC frente los sham a las 48 horas ($4,64 \pm 1,12$ puntos vs $0,00 \pm 0,00$ puntos, $p=0,001$), 96 horas ($3,45 \pm 1,51$ puntos vs $0,00 \pm 0,00$ puntos, $p=0,001$) y el mes ($2,18 \pm 1,83$ puntos vs $0,00 \pm 0,00$ puntos, $p=0,003$). Cuando a los animales se les sometió al test de la barra con escalón, el grupo con HIC mostró mayor déficit funcional con respecto a los animales sanos a las 48 horas ($93,89 \pm 15,57$ % vs $20,08 \pm 6,91$ %, $p=0,001$), 96 horas ($85,61 \pm 21,70$ % vs $20,04 \pm 9,42$ %, $p=0,001$) y el mes ($68,53 \pm 23,24$ % vs $16,60 \pm 8,27$ %, $p=0,001$), así como también se observó mayor déficit funcional entre los animales con HIC y los sham a las 48 horas ($93,89 \pm 15,57$ % vs $23,70 \pm 10,21$ %, $p=0,001$), 96 horas ($85,61 \pm 21,70$ % vs $16,01 \pm 8,27$ %, $p=0,001$) y el mes ($68,53 \pm 23,24$ % vs $17,16 \pm 7,31$ %, $p=0,001$). El test de Rotarod mostró una peor coordinación motora en los animales con HIC comparado con los animales sanos a las 48 horas ($51,82 \pm 27,79$ s vs $91,63 \pm 46,73$ s, $p=0,019$) y 96 horas ($68,88 \pm 31,37$ s vs $98,00 \pm 40,74$ s, $p=0,037$), y con los animales sham a las 48 horas ($51,82 \pm 27,79$ s vs $107,00 \pm 27,01$ s, $p=0,002$) y 96 horas ($68,88 \pm 31,37$ s vs $107,57 \pm 17,97$ s, $p=0,003$). Finalmente, en el test de Rogers, los animales con HIC mostraron mayor déficit que los animales sanos a las 48 horas ($3,54 \pm 0,93$ puntos vs $0,60 \pm 1,26$ puntos, $p=0,001$), 96 horas ($3,64 \pm 0,81$ puntos vs $0,30 \pm 0,95$ puntos, $p=0,001$) y al mes ($2,09 \pm 1,81$ puntos vs $0,60 \pm 1,26$ puntos, $p=0,041$). Los animales con HIC también mostraron mayor déficit en este test con respecto a los animales sham a las 48 horas ($3,54 \pm 0,93$ puntos vs $0,60 \pm 1,26$ puntos, $p=0,001$) y 96 horas ($3,64 \pm 0,81$ puntos vs $1,10 \pm 1,45$ puntos, $p=0,001$). Además, el volumen de la HIC a las 48 horas, tanto por ultrasonidos como por RM, se correlacionó con los resultados al mes del test de la barra ($\rho=0,860$, $p=0,001$ y $\rho=0,884$, $p=0,001$ respectivamente), barra con escalón ($\rho=0,755$, $p=0,007$ y $\rho=0,691$, $p=0,019$) y Rotarod ($\rho=0,909$, $p=0,001$ y $\rho=0,800$, $p=0,003$).

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo de tesis doctoral son las siguientes:

1. Los ultrasonidos demostraron utilidad en la visualización e identificación de las estructuras cerebrales en la rata. A través de la craneotomía total se observaron la corteza cerebral, el estriado, los ventrículos laterales, el tercer ventrículo, el acueducto cerebral y las cisternas subaracnoideas; a través de la craneotomía delimitada y el cráneo se observaron los ventrículos laterales y las cisternas subaracnoideas y, a través de la piel se observaron las cisternas subaracnoideas. Esto ha permitido la elaboración de un atlas anatómico en el que la resolución de las imágenes y las estructuras identificadas se incrementan a medida que se retiran las barreras de la ventana transcraneal.
2. Los ultrasonidos permiten la evaluación del volumen de la hemorragia y del desplazamiento de las estructuras cerebrales como consecuencia de la misma, con una precisión equiparable a la resonancia magnética.
3. Los ultrasonidos permiten monitorizar los cambios evolutivos que se producen en el volumen de la hemorragia intracerebral y el desplazamiento de las estructuras cerebrales.
4. El volumen de hemorragia, medido por ultrasonidos y resonancia magnética, presentó una excelente correlación con la evolución funcional demostrando resultados equiparables entre ambas técnicas de imagen.

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

La enfermedad cerebrovascular o ictus está causada por un trastorno circulatorio cerebral que altera de manera transitoria o definitiva el funcionamiento de una o varias partes del encéfalo (1,2).

Según la naturaleza de la lesión se clasifica en ictus isquémico (infarto cerebral) o ictus hemorrágico (1). El ictus isquémico (75-80 % de los casos) es debido a una alteración del aporte circulatorio a un territorio del encéfalo, mientras que el ictus hemorrágico (15-25 %) se debe a la rotura de un vaso sanguíneo arterial o venoso, que lleva a una extravasación de sangre dentro de la cavidad craneal (1,3). Aunque la frecuencia del ictus hemorrágico es menor que la del ictus isquémico, su mortalidad y morbilidad son mayores (4,5) y su pronóstico está determinado por la gravedad del sangrado (4).

Según su etiología, la hemorragia puede alojarse dentro del parénquima cerebral (hemorragia intracerebral o HIC) en un 10-15 % de los casos o, en el espacio subaracnoideo (hemorragia subaracnoidea o HSA) en un 5-10 % (2,3). La HIC según su localización anatómica puede ser intraventricular o parenquimatosa. Ésta última, puede clasificarse según su localización topográfica y extensión. Estas clasificaciones se esquematizan en la **Figura 1**. El lugar más común de las HIC parenquimatosas es el compartimento supratentorial profundo (subcortical), involucrando principalmente los ganglios basales (caudado, putamen) por afectación de las ramas ascendentes lenticulo-estriadas de la arteria cerebral media, o el tálamo por las ramas ascendentes de la arteria cerebral posterior (1,2,6). Las HIC también ocurren en los lóbulos cerebrales por la ruptura de pequeñas arterias penetrantes de las arterias cerebrales anterior, media o posterior; así como en el tronco encefálico por sus ramas de la arteria basilar; o en el cerebelo por las ramas posteriores inferiores, anteriores inferiores o superiores (6).

De acuerdo con la causa del sangrado, las HIC pueden clasificarse también en primarias (78-88 %) o secundarias (12-22 %). Las primarias se deben a una rotura espontánea de cualquier vaso de la red vascular del encéfalo dañado previamente por,

por ejemplo, la hipertensión arterial o por una angiopatía amiloide cerebral. Las secundarias se asocian a enfermedades congénitas o adquiridas, como malformaciones vasculares, tumores, alteraciones en la coagulación, uso de anticoagulantes y agentes trombolíticos, vasculitis cerebral, consumo de drogas y trombosis venosa cerebral. Aunque son menos frecuentes, su identificación es vital ya que requieren de un tratamiento específico (1,5).

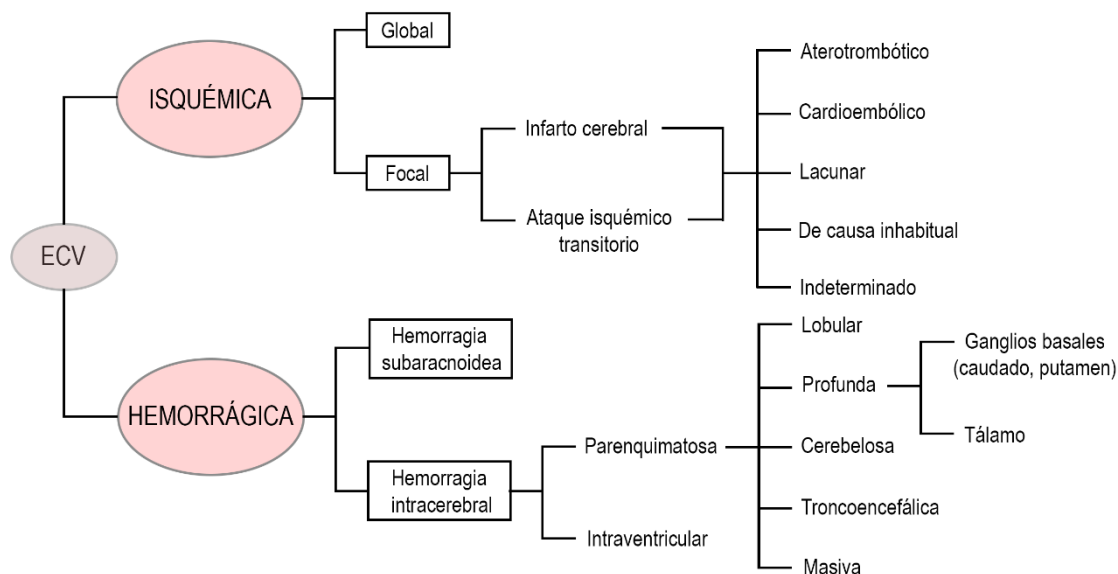


Figura 1. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular. Diagrama con la clasificación de la enfermedad cerebrovascular según su naturaleza. Abreviaturas: ECV: enfermedad cerebrovascular. Modificado de Díez-Tejedor, E et al. (1).

1.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL

Cada año se producen 1,4 millones de ictus hemorrágicos (HIC y HSA) en todo el mundo, con una incidencia relativamente estable en los países desarrollados pero creciente en los países en vías de desarrollo (7). El ictus hemorrágico es una enfermedad cada vez más relevante, representando el 9-27 % de todos los ictus en el mundo y habiendo aumentado su carga en un 47 % entre 1990 y 2010 (8). Por otra parte, en España, el Proyecto Ictus impulsado por el grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares (IBERICTUS) estima que hay 187 casos nuevos de ictus por cada 100.000 habitantes de los cuales, el 30 % son hemorrágicos con mayor incidencia en los mayores de 85 años (9).

Según un metaanálisis, la HIC tiene una mortalidad total del 35.3 % a 3 meses, que aumenta a un 63,2 % a los 10 años (10). Aunque el riesgo de HIC aumenta con la edad, una proporción sustancial de la enfermedad ocurre en personas menores de 50 años. La mortalidad en estos adultos jóvenes es del 17 % a los 3 meses y mayor del 25 % a 10 años (11,12). Además, la discapacidad a largo plazo es común (12).

En cuanto a la distribución por sexo, la incidencia de la HIC es más frecuente en hombres (6,2 por 100.000 habitantes) que en mujeres (4,0 por 100.000 habitantes) (12).

1.2. PATOGENIA DE LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL

La lesión cerebral causada por la HIC presenta 2 etapas: una lesión primaria que consiste en una fase mecánica temprana y una lesión secundaria, que consiste en una fase de inflamación con formación de edema como respuesta a la hemorragia.

Alrededor de los primeros 60 minutos de la HIC tiene lugar la *lesión primaria*, donde la sangre liberada al parénquima cerebral produce compresión mecánica de las estructuras anatómicas locales y un aumento de la presión intracraneal. Esto podría conducir dependiendo del tamaño a la herniación cerebral, compresión arterial, disminución del flujo sanguíneo con isquemia, llevando finalmente a la destrucción de axones y células gliales (13–16) (**Figura 2**).

A continuación tiene lugar la *lesión cerebral secundaria* que es causada por la respuesta al hematoma (edema e inflamación) y por los efectos tóxicos (bioquímicos y metabólicos) de los componentes del coágulo (14).

De manera sistémica, se produce una activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal y del sistema nervioso simpático como una de las primeras respuestas al sangrado (15). En las primeras horas tiene lugar la necrosis celular en la periferia de la hemorragia (16). Ocurre cuando localmente los axones de las neuronas dañadas alrededor del hematoma liberan glutamato; lo que conduce al hipermetabolismo de la glucosa y a una disfunción mitocondrial. Esto, a su vez, conlleva la acumulación de

subproductos oxidativos, la lesión adicional de células adyacentes y la formación temprana de edema citotóxico (15,16). Simultáneamente se desarrolla la respuesta a la retracción del coágulo y a la acumulación de proteínas séricas a su alrededor (16). Esto genera un aumento de la presión dentro del coagulo produciéndose la salida del suero de su interior dando lugar al edema vasogénico (13,16). El edema cerebral aumenta su volumen produciendo mayor efecto de masa, tanto por el que se forma alrededor del hematoma como por el del interior (13). En general, su formación puede ocurrir en cuestión de horas tras la HIC aumentando aproximadamente un 75 % en las primeras 24 horas y alcanzando su punto máximo en torno a los 4-6 días (13,14,17).

A los 2 días tras la HIC, se ponen en marcha mecanismos hemostáticos para limitar el sangrado, activándose la cascada de coagulación que lleva a la liberación de trombina (13,15,16,18). La trombina favorece condiciones inflamatorias y tóxicas al activar a las células microgliales para liberar mediadores inflamatorios. Dentro de estos mediadores inflamatorios se encuentran la interleucina-1beta (IL-1beta) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), que van a inducir una sobreexpresión de moléculas de adhesión, llevando a la infiltración de leucocitos polimorfonucleares e incrementando aún más la liberación de citoquinas. Estos mediadores también van a inducir la sobreexpresión de metaloproteasas de matriz (MMP), destrucción de proteínas en la lámina basal y ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE), dando lugar a más edema vasogénico. Asimismo, son capaces de activar a las caspasas promoviendo la apoptosis celular, mayor liberación de glutamato y toxicidad (16).

Por otra parte, la trombina activa a los astrocitos dando lugar a gliosis y un aumento de la liberación de glutamato, lo que conlleva una gran toxicidad. Además, la trombina liberada actúa sobre las células mesenquimales promoviendo su proliferación, favoreciendo así la formación de tejido cicatricial. Por último, produce una disfunción de las células endoteliales, dando lugar a hiperpermeabilidad, ruptura de la BHE y a más formación de edema vasogénico (15,16).

Después de varios días y como parte de la respuesta a la trombina, se produce la activación del complemento, la lisis de los eritrocitos y de los componentes del coágulo,

lo que libera hierro, hemoglobina y radicales libres en el área hemorrágica. Esto causa una inflamación adicional, así como apoptosis, permeabilidad de la BHE y formación de edema tardío (15,16). Con respecto a la activación del sistema del complemento, a medida que C5a y C3a penetran en el tejido neuronal se activan la glía local, los mastocitos y los leucocitos. También se produce daño adicional de las neuronas alrededor del hematoma, la glía y los vasos sanguíneos, además de más lisis celular e inflamación (15) **(Figura 2)**.

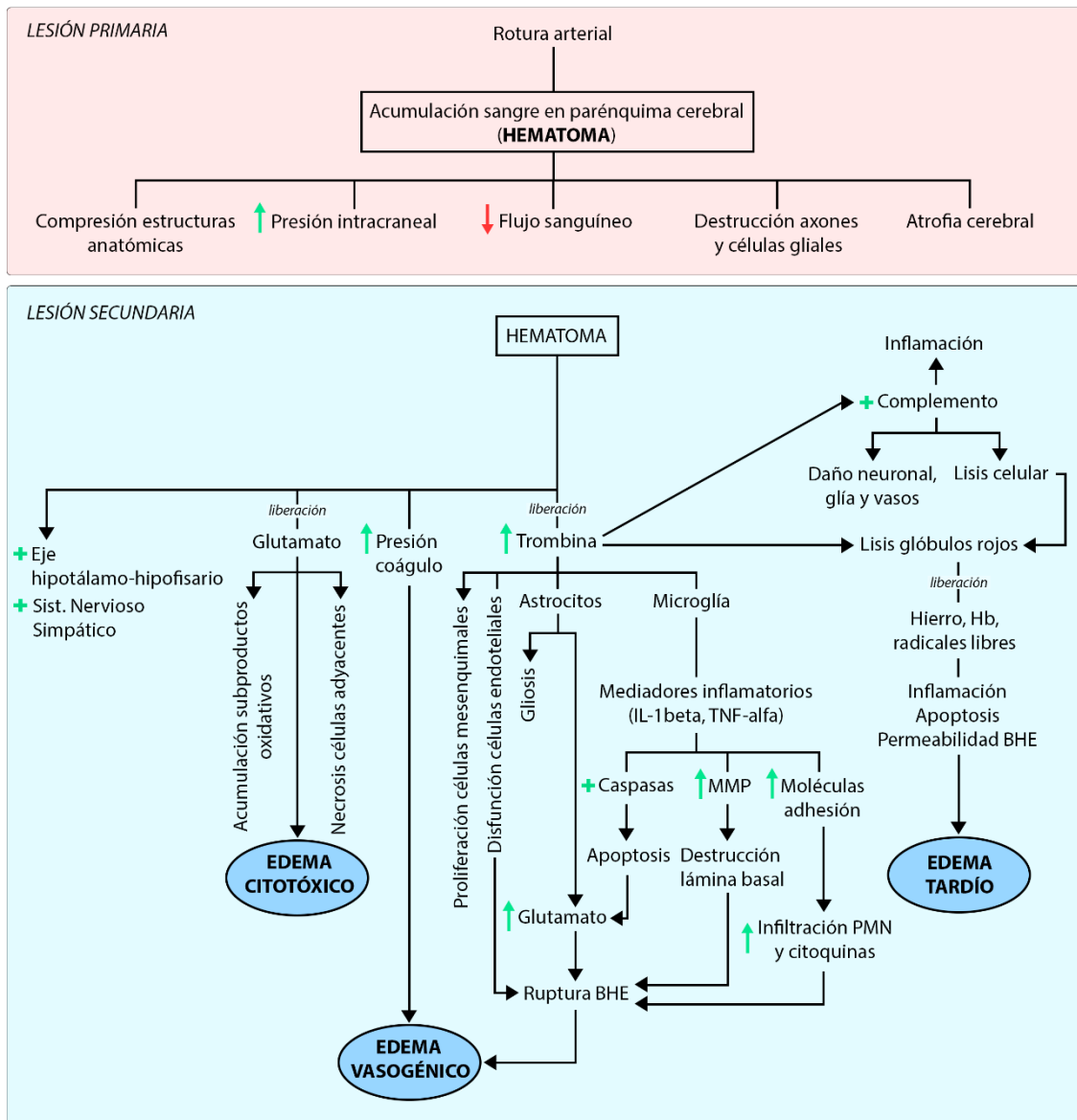


Figura 2. Patogenia de la HIC. Representación esquemática de los procesos que tienen lugar durante la lesión primaria y secundaria de la HIC. Las flechas hacia arriba indican aumento, las flechas hacia abajo indican disminución. Los símbolos positivos indican activación. Abreviaturas: BHE: barrera hematoencefálica; Hb: hemoglobina; IL-1beta: interleucina-1beta; MMP: metaloproteasas de matriz; PMN; leucocitos polimorfonucleares; TNF-alfa: factor de necrosis tumoral alfa. Modificado de Senn R et al. (15).

1.3 MONITORIZACIÓN DE LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL EN PACIENTES

La HIC constituye una emergencia médica en la que es crucial un diagnóstico precoz para favorecer un mejor pronóstico de los pacientes. Generalmente, el diagnóstico de la HIC en pacientes se realiza con tomografía computarizada (TC) cerebral sin contraste ya que es altamente sensible y específica (5,12). No obstante, entre sus limitaciones se encuentran la utilización de radiación ionizante, los costes o la necesidad de transportar al sujeto a la sala de radiología para realizar la prueba (19). Otra técnica de imagen que se suele utilizar como herramienta complementaria es la resonancia magnética (RM), que ayuda a detectar las lesiones estructurales, determinar la causa y mecanismos subyacentes de la HIC además de añadir información sobre el momento evolutivo de la misma (1,5,12,20). Estudios previos han demostrado que la RM es tan sensible como la TC en la detección de la hemorragia, pero rara vez ofrece información adicional en la fase aguda (5,20). Además, también cuenta con desventajas como el tiempo de adquisición de las imágenes, coste o el transporte requerido (5,20–23). En contraposición a estas técnicas de imagen, algunos estudios han demostrado la aplicación clínica de los ultrasonidos en el diagnóstico de la HIC (19,24–27), demostrándose una excelente correlación con la TC en la determinación del volumen de la hemorragia y el desplazamiento de las estructuras cerebrales como consecuencia de la lesión (26,27). Esta técnica no invasiva presenta ciertas ventajas con respecto a las anteriores, ya que es una herramienta sin radiación ionizante, rápida, bien tolerada, económica y portátil (19,28,29). Sin embargo, su aplicación hasta la fecha no está extendida, lo que puede ser debido al pequeño tamaño muestral (de 1 a 35 pacientes como máximo) o el corto marco temporal de los estudios (19,24–27). En este sentido, debido a las múltiples ventajas que presentan los ultrasonidos a las que se añaden, en la actualidad, equipos altamente sofisticados con imágenes de gran nitidez y alta resolución, surge la necesidad de llevar a cabo estudios de investigación en modelos preclínicos para trasladar la utilidad de esta herramienta a los pacientes y poder implantarla en la práctica clínica habitual.

2. MODELOS ANIMALES DE HEMORRAGIA INTRACEREBRAL

Los modelos animales de HIC pueden ayudarnos a entender mejor la patogenia de la enfermedad, así como a explorar nuevos enfoques preventivos o terapéuticos (30). Para estudiar la HIC se han usado multitud de especies como cerdo, conejo, rata y ratón, gato y primate. Sin embargo, la mayor parte de las investigaciones se han llevado a cabo en roedores (30,31).

Existen varios modelos animales experimentales para inducir la HIC. Entre ellos se encuentra el modelo de la inserción de un *microbalón*. Este modelo consiste en inflar con solución salina un microbalón en el núcleo caudado de los animales durante 10 minutos, desinflarlo y posteriormente retirarlo. Con ello se simula el efecto de ocupación del espacio por el hematoma (30,32). Otro modelo es el de inyección de *sangre autóloga* donde la sangre se extrae de la cola o la arteria femoral y se inyecta directamente en la zona de interés como el estriado o la corteza cerebral (18,30,33). Hay autores que han utilizado otros métodos como la inyección combinada de *colagenasa* y *sangre autóloga* o la inyección de un *hidrogel sintético* en el cerebro que puede imitar el efecto de ocupación de espacio del hematoma (32). También hay un modelo inducido por ultrasonidos que simula la HIC espontánea. Este modelo se basa en la destrucción por baja frecuencia de los vasos sanguíneos guiado por RM, produciendo un hematoma similar al de humanos. Sin embargo, durante el proceso inducido por los ultrasonidos es difícil evitar lesiones vasculares intracraneales (32).

Sin embargo, el modelo más utilizado es el de inyección de *colagenasa bacteriana* (18). En este modelo, se inyecta colagenasa en los ganglios basales de los animales, la cual induce ruptura vascular y sangrado continuo debido a la degradación de la lámina basal (18,30,32). Este modelo es el que más se aproxima a la situación que ocurre en los pacientes al generar déficits funcionales a largo plazo, simulando el proceso de la HIC en humanos, la ruptura vascular, así como la formación y expansión del hematoma (32). Además, es el más apropiado para estudiar la extensión de la infiltración sanguínea en el parénquima (33). Esto se debe a que la extensión de la lesión que se consigue con este modelo es más consistente que otros (30), proporcionando mayor control sobre el

tamaño de la hemorragia (33). Comparado con el modelo de inyección de sangre autóloga este modelo no produce reflujo sanguíneo a lo largo del recorrido de la aguja (30). No obstante se debe tener en cuenta que puede causar toxicidad y daño celular (18,30) y que la introducción de una proteína exógena puede causar reacciones inflamatorias (30).

A continuación, se esquematizan en la **Tabla 1** las ventajas y desventajas de los modelos de HIC más extendidos en la experimentación animal.

Tabla 1. Modelos animales de HIC. Ventajas y desventajas de los principales modelos animales de HIC.

| MODELOS DE HIC | | |
|-----------------------------|--|---|
| MODELO ANIMAL DE HIC | VENTAJAS | DESVENTAJAS |
| Microbalón | Estudio del efecto de masa Produce reducción del flujo sanguíneo y aumento de la presión intracraneal en la zona de lesión | No aborda posibles efectos de la sangre (edema) o sustancias liberadas por el coágulo |
| Sangre autóloga | Fácil de realizar Reproducible No administra proteínas exógenas Tamaño fijo del hematoma Permite estudiar el edema, la coagulación natural y vías de inflamación | Reflujo en la trayectoria de la aguja No imita el resangrado No es útil para el estudio del crecimiento del hematoma Riesgo de sangrado en los espacios subaracnoideos o ventricular |
| Colagenasa | Fácil de realizar Reproducible Imita el resangrado y la expansión del hematoma Sin reflujo de la trayectoria de la aguja | Posible reacción inflamatoria y toxicidad celular Hemorragias inconsistentes Daño neural excesivo |

Abreviaturas: HIC: hemorragia intracerebral.

3. MONITORIZACIÓN DE LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL EN LOS MODELOS ANIMALES

En la investigación preclínica, las técnicas de imagen no invasivas, como la RM y los ultrasonidos, son de gran utilidad, ya que permiten realizar estudios dinámicos a diferentes tiempos (34). A continuación se detalla la monitorización de la HIC por ambas herramientas.

3.1. RESONANCIA MAGNÉTICA

La RM es la técnica de imagen de elección en el estudio de la anatomía y estructura cerebral de roedores debido a su gran resolución espacial, sensibilidad y capacidad para estudiar aspectos tanto morfológicos como funcionales (35,36). La mayoría de los equipos de RM cuentan con escáneres con intensidades de campo magnético de entre 4,7 a 7 Teslas (T), siendo este último el más utilizado (34). Concretamente la formación de lesiones y del edema vasogénico pueden ser monitorizadas por secuencias T2 (34,35).

En la HIC, la intensidad de la señal en la RM dependerá de 2 factores: el estado químico de los átomos de hierro dentro de la molécula de hemoglobina y de la integridad de la membrana de los glóbulos rojos (37). En modelos de HIC en ratas, se ha observado en imágenes T2 que la hemorragia de 0 a 6 horas muestra una señal hipointensa con regiones de isointensidad (38–41). A las 12 horas se sigue observando un centro hipointenso pero con focos de hiperintensidad (39,40). La hipointensidad se debe al desplazamiento del agua hacia los eritrocitos que contienen desoxi- y metahemoglobina, mientras que las regiones de isointensidad o leve hiperintensidad se corresponden con zonas de tejido edematosas en el hematoma en desarrollo (39). A las 24-72 horas, un anillo hipointenso rodea al centro que va volviéndose hiperintenso debido a los restos celulares y la degeneración de eritrocitos, que liberan la metahemoglobina aumentando la señal en T2 (38,39,41). El anillo hipointenso está formado por la agregación de neutrófilos que comienza a las 4 horas y es máxima a las 48 horas. A partir de aquí, los neutrófilos se van moviendo hacia el centro del hematoma

y se van dispersando por lo que el anillo queda menos definido. A las 48 horas, comienza la invasión del hematoma por monocitos que se van transformando en macrófagos. A medida que los macrófagos se mueven hacia el hematoma, los compuestos de hierro fagocitados se degradan transformándose en hemosiderina y ferritina. Así, a las 72 horas, el anillo hipointenso está formado por macrófagos con hemosiderina (39). A los 7 días, la lesión es hiper/isointensa debido a los restos celulares y a los espacios llenos de líquido, con un anillo hipointenso que sigue estando compuesto de macrófagos con hemosiderina (38,39,41). A las 2-3 semanas, el lugar del hematoma consiste en una cavidad llena de líquido con unos pocos vasos sanguíneos pequeños que da lugar a una señal iso/hiperintensa rodeada de un anillo hipointenso (macrófagos) (39,41). Finalmente, tanto a los 14 como a los 28 días la lesión contiene señales oscuras correspondientes a áreas de necrosis y cavitaciones que rodean a la hemorragia (42) **(Tabla 2)**.

Sin embargo, a pesar de que la RM es la técnica de elección para estudiar la HIC en modelos animales (34), deben tenerse en cuenta las limitaciones comentadas anteriormente que hacen necesario investigar nuevas herramientas que las solventen.

3.2. ULTRASONIDOS

La ecografía es una herramienta que permite revelar contornos anatómicos y captar imágenes dinámicas en directo. Así, la información estructural y funcional obtenida, posibilita conocer el tipo y lugar en el que se encuentra la lesión que ha causado un cuadro clínico (29,43,44). Los ultrasonidos (> 20.000 Hz) tienen una frecuencia mayor de la que puede ser percibida por los seres humanos (45), chocan contra las estructuras sólidas (interfaces reflectantes) creando ecos u ondas reflejadas (43,45). Así pues, las imágenes de la ecografía se obtienen tras procesar la información de los ecos reflejados por las estructuras corporales (43).

El haz de ultrasonidos generado por el transductor o sonda se propaga por el interior del sujeto, donde parte será reflejado y parte transmitido por los diferentes tejidos que se vaya encontrando. Los ultrasonidos reflejados van a volver al transductor,

haciendo vibrar el cristal y transformándose en corriente eléctrica que es amplificada. La información obtenida por el circuito receptor puede mostrarse de manera gráfica de diferentes formas (43). Entre ellas destacan:

- Modo M: representación gráfica de la señal en la que en el eje X se representa profundidad y en el eje Y el tiempo. Útil para localizar estructuras en la profundidad y valorar el movimiento de algunas estructuras (43).
- Modo B: imagen en 2 dimensiones en escala de grises, la señal se transforma en puntos, cuya intensidad de brillo es proporcional a la intensidad del eco de retorno (29,43). Los reflejos más débiles aparecen como puntos grises más oscuros mientras que los reflejos más fuertes aparecen como puntos blancos más brillantes (46). Suele usarse para determinar la apariencia y el tamaño de las estructuras (29) siendo el empleado en este estudio.

Una vez obtenidas las imágenes, si se detectan y procesan los cambios de intensidad de los ecos, se valorará la capacidad ecogénica de los tejidos (43). Esto es, se evaluará la capacidad de las estructuras para producir ecos debido a la existencia de interfaces reflectantes en su interior (45). En función de la ecogenicidad, las imágenes ecográficas pueden clasificarse en:

- Anecoicas: se produce cuando el ultrasonido atraviesa un medio sin interfaces reflectantes en su interior por lo que no genera ecos. Son típicas de los líquidos. Se visualizan como imágenes negras (45).
- Hipoecoicas o hipoecogénicas: cuando en el interior de la estructura normal existen interfaces de menor ecogenicidad que el parénquima circundante. Genera pocos ecos de baja intensidad y se visualizan como imágenes grisáceas (45).
- Hiperecoicas o hiperecogénicas: cuando en el interior de esa estructura existen interfaces más ecogénicas que el parénquima normal que la rodea. Genera ecos en gran cantidad e intensidad y se visualizan como imágenes blancas (45).

Dentro de las frecuencias usadas en los estudios ecográficos, los ultrasonidos son considerados seguros tanto para los tejidos como para el sujeto. Además, los agentes de contraste que pueden emplearse no requieren radiación ionizante y también han

demostrado su seguridad (29). Hasta ahora, aunque de forma limitada, los ultrasonidos se han usado para estudiar los cambios hemodinámicos en las estructuras vasculares y tras la HIC en modelos animales (47,48). Sin embargo, los únicos estudios sobre ultrasonidos en el seguimiento de la HIC datan de 1981 y 1984; ambos realizados en perros mediante la administración de sangre venosa en el lóbulo parietal y en el centro semioval respectivamente. Así, se definió el aspecto ecográfico de la HIC aguda (1-3 días) como una lesión inicialmente hipocogénica que, a los pocos segundos, se vuelve hiperecogénica además de bien definida y homogénea (49,50). A los 3-4 días la lisis de los glóbulos rojos desde el centro de la HIC hace que la hemorragia comience a cambiar hacia una lesión con centro hipocogénico rodeado de un borde ecogénico correspondiente a los glóbulos rojos intactos de la periferia (fase post-aguda, 4-8 días). Tanto en la fase aguda como post-aguda, el tejido alrededor de la hemorragia es hipocogénico (49). A los 9-13 días, tiene lugar la fase capsular donde la hemorragia comienza a disminuir, pero su aspecto ecográfico continúa siendo un centro hipocogénico rodeado por un anillo ecogénico. A medida que la hemorragia disminuye, el anillo de alrededor se engrosa siendo menos uniforme debido a la cápsula con fibras de colágeno depositadas alrededor de la neovascularización proliferante. Esta fase se caracteriza por la neovascularización y la formación de la red de colágeno y macrófagos, que se convierten en los principales responsables de las señales ecográficas en lugar de los glóbulos rojos como ocurría en las primeras etapas. Finalmente, a partir del día 14, tiene lugar la fase de organización donde los macrófagos participan en la eliminación del hematoma residual, aumenta la vascularización y crece la cápsula de colágeno alrededor del hematoma cuyo centro se debe ahora a una matriz de colágeno con macrófagos. En estas dos últimas etapas, el tejido alrededor de la hemorragia muestra pequeñas áreas de ecogenicidad (49) (**Tabla 2**).

Cómo se ha visto a lo largo de estas líneas, los ultrasonidos en modo B permiten monitorizar la HIC, pero a pesar de ello, no son el método de elección en la actualidad para la obtención de imágenes cerebrales, evaluar el parénquima cerebral, la lesión cerebral o los cambios estructurales producidos como consecuencia de la HIC. Que actualmente no sea la herramienta seleccionada para evaluar estos aspectos puede ser debido, entre otras causas, a que es una técnica que precisa de un operador con

experiencia y conocimientos sólidos para poder obtener imágenes precisas, así como en la dificultad que presenta para obtener ciertas imágenes debido a la interferencia de las estructuras óseas (23,29). Sin embargo, es una técnica de imagen con múltiples ventajas y un alto potencial que debe ser probada e investigada en modelos preclínicos para que pueda ser trasladada al paciente.

Tabla 2. Imagen de la HIC. Señal hemorrágica en RM (imágenes T2) y en ultrasonidos, así como el estado de los eritrocitos en modelos animales de HIC.

| HIC EN MODELOS ANIMALES POR RM Y ULTRASONIDOS | | | |
|--|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| FASE HEMORRÁGICA | SEÑAL EN T2 | SEÑAL ECOGRÁFICA | ESTADO MEMBRANA ERITROCITOS |
| < 12 horas | Hipointensa con zonas de iso o leve hiperintensidad | Hiperecogénica | Intacta |
| 24 horas – 72 horas | Hiperintensa con anillo hipointenso | | |
| 72 horas – 7 días | Hiper/isointensa con anillo hipointenso | Hipoecogénica con borde ecogénico | Degradada |
| 14 días – 28 días | | | |

Abreviaturas: HIC: hemorragia intracerebral; RM: resonancia magnética.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

En base a estos antecedentes nos planteamos la siguiente hipótesis:

El uso de los ultrasonidos permitiría la identificación de las estructuras cerebrales en roedores. Además, en un modelo animal experimental de hemorragia intracerebral los ultrasonidos permitirían la evaluación y su monitorización, estudiando los cambios evolutivos en el volumen de la misma, así como las alteraciones estructurales que se producen como consecuencia del daño generado.

OBJETIVOS

Para demostrar la hipótesis planteada proponemos los siguientes objetivos:

1. Establecer la utilidad de los ultrasonidos en la visualización e identificación de las estructuras cerebrales en rata.
2. Evaluar en un modelo animal de hemorragia intracerebral la utilidad de los ultrasonidos en el estudio de la lesión cerebral (volumen de hemorragia y desplazamiento de estructuras cerebrales) comparando los datos obtenidos con la resonancia magnética.
3. Valorar la utilidad de los ultrasonidos en la monitorización de los cambios evolutivos en el volumen de la hemorragia intracerebral y en el desplazamiento de las estructuras cerebrales.
4. Analizar la correlación del volumen de la hemorragia intracerebral, medido por ultrasonidos y por resonancia magnética, con la evaluación funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio prospectivo experimental en ratas sanas en el que se objetiven estructuras cerebrales y, en un modelo de ratas con HIC causada por la rotura de la lámina basal mediante la administración de la enzima colagenasa-IV, en el que se objetiven volumen de hemorragia y desplazamiento de estructuras cerebrales.

Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones STAIRS (*Stroke Therapy Academic Industry Roundtable*), RIGOR (*Improving the quality of NINDS-supported preclinical and clinical research through rigorous study design and transparent reporting*), HEADS (*Hemorrhagic Stroke Academia Industry*) (51–53) y ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments guidelines*) (54) en nuestro laboratorio de Ciencias Neurológicas y Cerebrovascular del Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid. El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales se diseñaron de acuerdo con el Comité Ético para el Cuidado y Uso de Animales en Investigación (Ref. PROEX 296/16) según la normativa española (RD 1201/2005 y RD53/2013) y de la Unión Europea (UE) (86/609/CEE, 2003/65/CE, 2010/63/UE). Se siguió además el principio de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento) utilizando el menor número de animales y teniendo en cuenta la minimización del sufrimiento.

2. EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS

Este trabajo se llevó a cabo utilizando las siguientes infraestructuras y recursos materiales.

Laboratorio de Cirugía Experimental:

- Animalario: salas de animales, de lavado y almacén.
- Instrumental de macro y microcirugía de acero inoxidable (Lanbeck, Talenco, Madrid, España).
- Manta térmica (Gaymar, NY, EE.UU).

- Barra de madera hecha a medida siguiendo las instrucciones de Britton GL et al. (55) y Carter RJ et al. (56).
- Barra de madera hecha a medida siguiendo las instrucciones de Schallert T et al. (57).
- Rotarod (Ugo Basile SRL, Gemonio VA, Italia).
- Balanza de precisión PCE-BSH 6000 (PCE Instruments, Albacete, España).

Laboratorio de Ciencias Neurológicas y Cerebrovascular:

- Sistema de ultrasonidos Xario 200 G (modelo TUS-X200, Canon, Tokio, Japón) con un transductor de multifrecuencia lineal de 13 MHz (PLU-1204BT, 18L7, Canon, Tokio, Japón).
- Hero 4 (GoPro, CA, EE.UU) para registrar los test funcionales.
- Marco de estereotaxia de laboratorio monitorizado para ratas 51700 con el software y controlador StereoDrive (Stoelting Europe, Dublin, Irlanda).
- Matriz acrílica para cerebro de rata de 1 mm (Stoelting Europe, Dublin, Irlanda) y cuchillas, para cortar el cerebro en fresco de los animales.
- Congelador de - 80 °C Nuair (Nirco, Madrid, España), para el almacenamiento de muestras.

Laboratorio de Inmunohistoquímica y Biología Molecular:

- Criostato LEICA CM1950 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania), para cortar los cerebros congelados incluidos en el compuesto OCT (*Optimal Cutting Temperature*) (Sakura Finetek, CA, EE.UU).
- Microscopio óptico Olympus, BX41 (Olympus Corporation, Tokio, Japón), para observar los cortes histológicos.

Material informático:

- Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, MD, EE.UU) para analizar las imágenes de los cortes histológicos.
- Escáner Epson Perfection 1260 (Epson, CA, EE.UU), para la digitalización de las imágenes de los cortes histológicos.

- ImageJ 1.52 (Instituto Nacional de Salud, EE.UU) para el análisis de las imágenes de RM.
- Programa estadístico IBM SPSS 23 (IBM, NY, EE.UU).
- GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, CA, EE.UU) para la creación de gráficas.
- Adobe Photoshop 22.5.4 (Adobe Inc, CA, EE.UU) para la maquetación de las figuras.

Finalmente se contó con la colaboración del Servicio de Imagen y Espectroscopia por Resonancia Magnética de Alto Campo (SIERMAC), donde se llevaron a cabo los estudios de imagen por RM (Bruker Pharmascan Biospec [Ettlingen, Alemania]) de 7 T para la obtención de imágenes en T2.

3. SUJETOS A ESTUDIO

Los animales procedentes de Charles River (Wilmington, Massachusetts, EE.UU) se mantuvieron en el animalario del Servicio de Cirugía Experimental del IdiPAZ hasta que alcanzaron 225-275 g (8-9 semanas de edad) en condiciones de temperatura ambiente de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, humedad relativa $45 \pm 15\%$ y ciclo de luz de 12 horas. Tanto la alimentación como el agua de bebida fueron administradas *ad libitum*.

Para el objetivo 1, un total de 6 ratas sanas Sprague-Dawley machos y hembras (proporción 1:1) fueron usadas para identificar las estructuras cerebrales.

Para los objetivos 2, 3 y 4, se utilizaron un total de 31 ratas Sprague-Dawley machos y hembras (16 machos y 15 hembras) de 8-9 semanas de vida y 225-275 g de peso. Los animales fueron aleatorizados en 3 grupos experimentales:

1. Grupo de ratas sanas (n=10; 5 machos y 5 hembras).
2. Grupo sham: ratas sometidas a todo el procedimiento quirúrgico a excepción de la hemorragia cerebral (n=10; 5 machos y 5 hembras).
3. Grupo de HIC: ratas sometidas a la hemorragia cerebral (n=11; 6 machos y 5 hembras).

4. ABORDAJE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS CEREBRALES

Los animales fueron anestesiados en una cámara de anestesia con una solución de sevoflurano al 8 % para la inducción y al 4 % para el mantenimiento con un flujo de oxígeno de 1 litro/minuto. La temperatura corporal de los animales se mantuvo a ≈ 37 °C con una manta térmica durante todo el procedimiento. Además, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de meloxicam (2 mg/kg) como antiinflamatorio no esteroideo (AINE).

Para la identificación de las estructuras cerebrales en el objetivo 1, el estudio se realizó a través de 4 ventanas transcraneales (**Figura 3**):

- Piel: se afeitó la cabeza de los animales para realizar el estudio ecográfico directamente sobre la piel.
- Cráneo: se realizó una incisión anterior-posterior para que quedara visible el cráneo.
- Craneotomía delimitada: se retiró una pequeña superficie craneal de 1 cm × 0.5 cm (largo x ancho) desde la sutura coronal.
- Craneotomía total: se retiró una superficie craneal de 2 cm x 1 cm (largo x ancho).

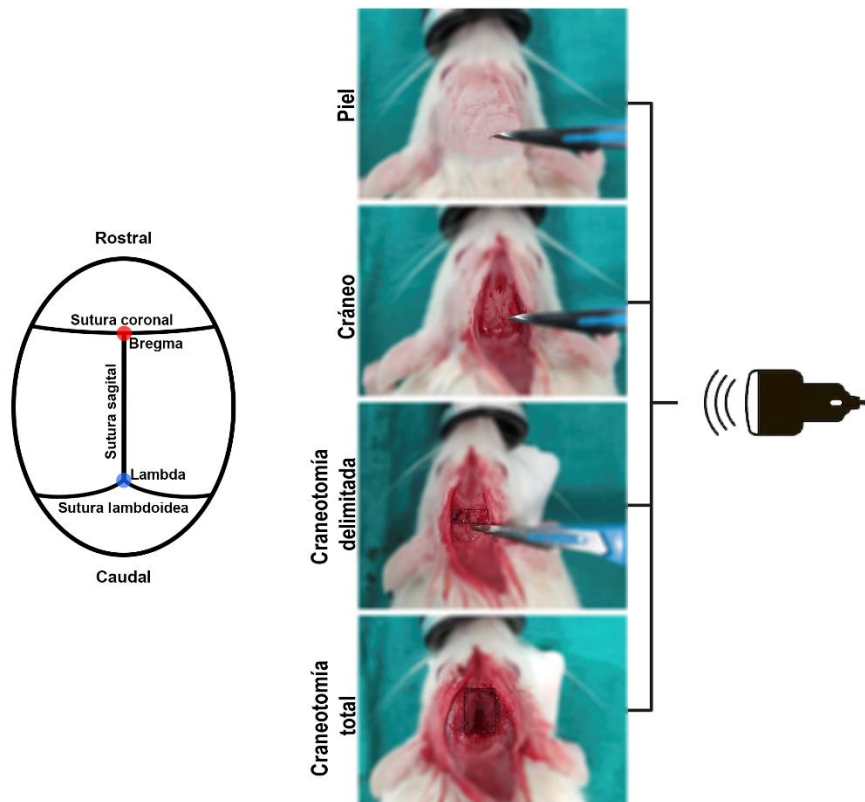


Figura 3. Representación gráfica de las suturas craneales (*izquierda*) e imágenes representativas de las ventanas transcraneales (*piel, cráneo, craneotomía delimitada y craneotomía total*) usadas en el estudio con ultrasonidos para el análisis de las estructuras cerebrales (*derecha*). En rojo se marca el punto anatómico Bregma y en azul el punto anatómico Lambda.

Al finalizar el estudio, tras anestesia previa se llevó a cabo el sacrificio de los animales mediante la inyección intracardiaca de cloruro potásico al 0,9 %. La muerte fue confirmada mediante sección cervical. Las muestras cerebrales fueron conservadas durante 24 horas en para-formaldehído al 4 %, a los 3 días se sumergieron en sacarosa al 30 % y finalmente se conservaron a - 80 °C con medio de congelación OCT.

5. INDUCCIÓN DE LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL

Para los objetivos 2, 3 y 4, los animales fueron anestesiados en una cámara de anestesia con una solución de sevoflurano al 8 % para la inducción y al 4 % para el mantenimiento con un flujo de oxígeno de 1 litro/minuto. La temperatura corporal de los animales se mantuvo a ≈ 37 °C con una manta térmica durante todo el procedimiento. A continuación, se realizó una inyección intraperitoneal de meloxicam (2 mg/kg) como AINE para reducir la inflamación, dolor y fiebre. Tras la comprobación de la ausencia de reflejo palpebral, los animales se colocaron en una guía estereotáxica monitorizada (Stoelting Europe, Dublín, Irlanda). Esta guía es un dispositivo mecánico que permite la inmovilización y fijación de la cabeza de los animales y usando un sistema de coordenadas tridimensional (direcciones x,y,z) permite localizar estructuras intracraneales. Una vez fijado el animal, la zona se desinfectó con povidona yodada, se realizó una incisión en la piel y se retiró la fascia hasta dejar el cráneo al descubierto. Posteriormente, a la derecha de la sutura del Bregma (punto de unión ente las suturas coronal y sagital) se realizó una pequeña craneotomía en el hueso parietal derecho del cráneo. A continuación, tomando como punto de referencia el Bregma, se calcularon las coordenadas para determinar el punto de inyección en la zona deseada (zona subventricular del hemisferio derecho). Las coordenadas fueron: rostro caudal - 0,04 mm (con respecto a Bregma), latero medial 3,5 mm (con respecto a Bregma) dorsoventral 6 mm (con respecto a la duramadre) (58). Seguidamente, usando una jeringa Hamilton de 5 μ l se realizó la inyección intracerebral de 0,5 U de colagenasa tipo IV (Sigma-Aldrich, Madrid, España) diluida en 1 μ l de suero salino en el estriado del hemisferio derecho. La jeringa se mantuvo en la zona durante 5 minutos para evitar el reflujo del líquido y se retiró muy lentamente. Finalmente, la incisión inicial se suturó con seda 4/0 y se volvió a desinfectar la zona con povidona yodada. Los animales recibieron un tratamiento de meloxicam durante 3 días tras la inducción de la HIC. Al mes de la inducción de la HIC, los animales se anestesiaron nuevamente con sevoflurano al 8 % para la inducción y al 4 % para el mantenimiento con un flujo de oxígeno de 1 litro/minuto, y se sacrificaron mediante la inyección intracardiaca de cloruro potásico al 0,9 %. La muerte fue confirmada mediante sección cervical. Las

muestras cerebrales fueron obtenidas y conservadas durante 24 horas en paraformaldehído al 4 %, a los 3 días se sumergieron en sacarosa al 30 % y finalmente se conservaron a - 80 °C con medio de congelación OCT (**Figura 4**).

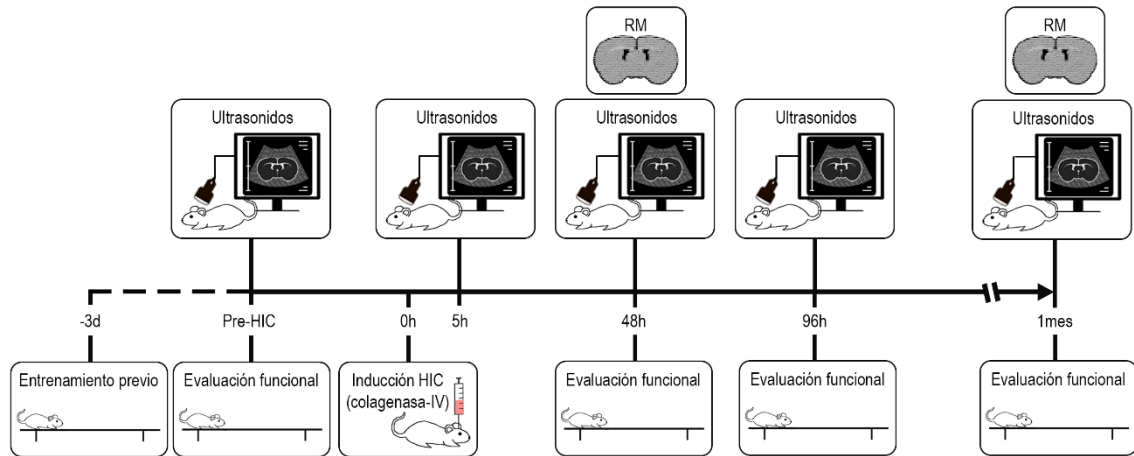


Figura 4. Protocolo experimental. La HIC se indujo en ratas Sprague-Dawley machos y hembras mediante la administración de colagenasa-IV en el estriado. Los animales recibieron un entrenamiento de 3 días previo a la evaluación funcional pre-HIC. La función motora se evaluó mediante el test de la barra, de la barra con escalón, del cilindro rotatorio (Rotarod) y de Rogers antes de la inducción de la HIC (pre-HIC), a las 48 horas, 96 horas y 1 mes tras la inducción de la HIC. Los estudios de imagen por ultrasonidos (pre-HIC y a las 5 horas, 48 horas, 96 horas y 1 mes post-HIC) y por RM (48 horas y 1 mes post-HIC) se llevaron a cabo para estudiar el volumen de hemorragia y el desplazamiento de las estructuras cerebrales. El sacrificio se llevó a cabo al mes de la HIC. Abreviaturas: HIC: hemorragia intracerebral; RM: resonancia magnética.

6. EVALUACIÓN FUNCIONAL

Para evaluar el déficit motor de los animales se llevaron a cabo 4 test funcionales: de la barra, la barra con escalón, del cilindro rotatorio, o test de Rotarod, y el de Rogers. Los animales fueron evaluados antes de la inducción de la HIC, a las 48 horas, 96 horas y 1 mes post-HIC por un investigador ciego a los diferentes grupos experimentales **(Figura 4)**.

Para evaluar la coordinación motora y la capacidad de los animales de mantener el equilibrio se utilizó el *test de la barra*. Este test evalúa la habilidad de los animales de atravesar una viga de madera (2,5 x 2,5 x 80 cm) asignándoles la siguiente puntuación (55):

- 0: atraviesa la viga sin dificultad, sin deslizamiento o resbalón de la pata.
- 1: atraviesa agarrándose del lado lateral de la viga.
- 2: es capaz de atravesar, pero muestra dificultad arrastrándose sobre la viga.
- 3: necesita más de 10 segundos para atravesar la viga debido a la dificultad para caminar.
- 4: incapaz de atravesar la viga.
- 5: incapaz de mover el cuerpo o cualquier miembro sobre la viga.
- 6: incapaz de permanecer en la viga durante más de 10 segundos.

Todos los animales recibieron un entrenamiento previo durante 3 días antes de la inducción de la HIC. Cada día de entrenamiento, los animales realizaron 3 ensayos debiendo recorrer cierta distancia (que fue aumentando progresivamente en cada ensayo y día) de la viga de madera. Antes de empezar, entre cada ensayo y al finalizar los 3 ensayos, los animales permanecieron durante 1 minuto en una caja negra simulando su área de meta como recompensa (57).

Además, se realizó el *test de la barra con escalón*, otra versión del test de la barra que permite evaluar las funciones de las extremidades posteriores y la coordinación motora (59). En este test también se evalúa la capacidad de los animales de atravesar una viga de madera que, en este caso, se va estrechando. Además, cuenta con un

desnivel a cada lado que permite al animal mantenerse en la estructura. De esta forma, se minimizan los sesgos compensatorios que podrían ocurrir en el test de la barra descrito anteriormente por la utilización de estrategias motoras alternativas para realizar el test (60). Las dimensiones de la viga de madera se muestran en la **Figura 5**:

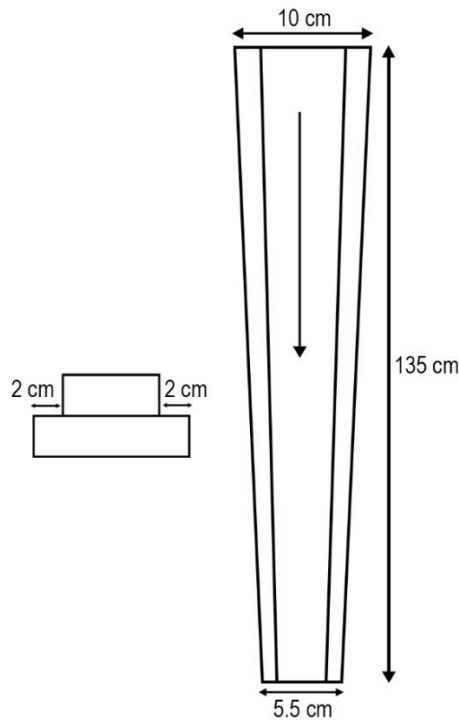


Figura 5. Test de la barra con escalón. Longitudes de la barra de madera. La flecha unidireccional indica la dirección de recorrido de los animales.

En este caso, se calculó la relación de deslizamiento de la extremidad posterior izquierda (contralateral a la lesión) de la siguiente manera (57):

$$\text{Ratio desliz (\%)} = \frac{\text{Deslices completos} + 0.5 \times \text{Deslices parciales}}{\text{Nº total de pasos}} \times 100$$

Siendo los deslices parciales la colocación de 1-3 dedos en el lateral de la viga, aunque su soporte siga estando en el nivel superior, y los deslices completos cuando se usa el nivel inferior por completo.

Todos los animales recibieron el mismo entrenamiento previo que con el test de la barra durante 3 días antes de la inducción de la HIC. Cada día de entrenamiento, los

animales realizaron 3 ensayos recorriendo una distancia progresiva de la viga en cada ensayo y cada día. Antes de empezar, entre cada ensayo y al finalizar los 3 ensayos, los animales permanecieron 1 minuto en una caja negra simulando su área de meta como recompensa (57).

El *test del cilindro rotatorio* (test de Rotarod) se utilizó para la evaluación del balance y la coordinación motora de los animales (59). Para ello, los animales se colocaron en un cilindro rotatorio (Rotarod, Ugo Basile SRL, Gemonio VA, Italia) que aumenta progresivamente de velocidad (4 a 40 rpm) durante un máximo de 2 minutos. Cada animal realizó 3 intentos cada día de la evaluación, anotándose el tiempo máximo de permanencia del animal en el cilindro rotatorio en cada uno de los intentos. Entre cada intento los animales tenían un descanso de 5 minutos. Los valores fueron calculados como la media de los 3 intentos de evaluación (61,62).

Todos los animales recibieron un entrenamiento previo durante 3 días antes de la inducción de la HIC. Cada día incluía 2 pruebas de ensayo. En cada una de ellas, los animales se colocaban sobre el cilindro rotatorio a un tiempo y velocidad gradual cada día. Entre los 2 ensayos de cada día, los animales permanecieron durante 25 segundos a una velocidad baja y constante de rotación (4 rpm) (63).

- Día - 3 de entrenamiento: 20 segundos en el cilindro rotatorio en la primera prueba de ensayo y 40 segundos en la segunda prueba de ensayo.
- Día - 2 de entrenamiento: 60 y 80 segundos en el cilindro rotatorio.
- Día - 1 de entrenamiento: 100 y 120 segundos en el cilindro rotatorio.

Entre los dos ensayos de prueba, los animales permanecieron en el cilindro rotatorio durante 30 segundos a una velocidad mínima (4 rpm).

Una variante del *test de Rogers* permitió calificar el estado funcional motor asignando una puntuación de la siguiente manera (61,62,64):

- 0: sin déficit funcional.
- 1: falta de extensión completa de la pata delantera contralateral.
- 2: disminución del agarre de la extremidad anterior contralateral cuando se tira de la cola.

- 3: movimiento espontáneo en todas las direcciones, giro hacia el lado contralateral si se tira de la cola.
- 4: giro en círculos o camina hacia el lado contralateral.
- 5: movimiento sólo cuando se estimula al animal.
- 6: no responde a estímulos con poca consciencia del animal.
- 7: muerte.

7. ESTUDIOS DE IMAGEN

7.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS CEREBRALES

Para estudiar e identificar las estructuras cerebrales por ultrasonidos se compararon las imágenes obtenidas con la RM y con un atlas anatómico que se dibujó tomando como referencia los atlas de W Swanson L (65) y Paxinos G y Watson C (66,67).

7.2. RESONANCIA MAGNÉTICA

Para llevar a cabo los análisis de imagen por RM los animales fueron anestesiados con una mezcla de oxígeno-isoflurano al 2 %, durante el estudio se reguló el flujo de gas anestésico con el fin de mantener una frecuencia respiratoria estable de 60 ± 20 rpm. En todo momento, el animal se encontró rodeado por una manta térmica por la que recirculaba agua a ≈ 37 °C para mantener la temperatura del animal. La frecuencia respiratoria se controló mediante un sistema de monitorización compatible con la RM (SA Instruments, Stony Brook, NY). Los animales se colocaron en el centro del resonador de volumen y se introdujeron en el espectrómetro donde permanecieron anestesiados durante todo el estudio por una máscara en la que inhalaban anestésico de forma continua.

Las adquisiciones se realizaron en un espectrómetro Bruker Pharmascan Biospec (Ettlingen, Alemania) 7 T equipado con un resonador de volumen de 40 mm y un

gradiente de 90 mm de diámetro. Los datos fueron adquiridos con el software Paravision 6.1. Las imágenes anatómicas eco de espín potenciadas en T2 fueron adquiridas con la secuencia RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) con los siguientes parámetros: TR 3000 ms, TE 29,54 ms y 88,61 ms, factor RARE 4, Av 3, FOV 3,5 cm, matriz de adquisición 256 x 256, 16 cortes contiguos con un grosor de 1,00 mm en orientación axial.

Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ 1.52 (Instituto Nacional de Salud, EE.UU). Las estructuras anatómicas cerebrales fueron identificadas en los diferentes cortes de las imágenes tomando como referencia el Bregma (**Figura 6**). El volumen de la HIC y el desplazamiento de estructuras por RM se determinó a las 48 horas y 1 mes después de la inducción de la HIC (**Figura 4**).

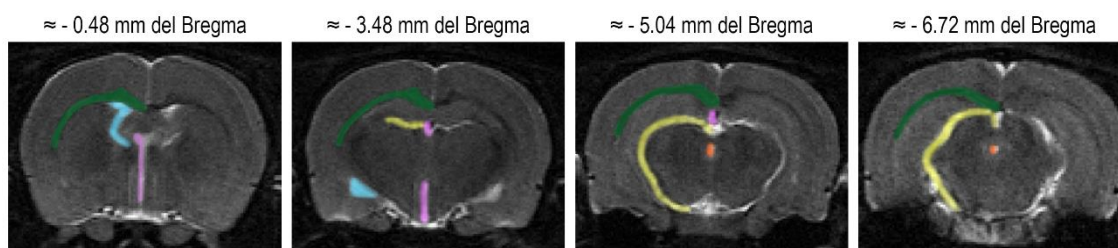


Figura 6. Estructuras cerebrales identificadas por RM (imágenes T2). Las estructuras fueron coloreadas de la siguiente forma: cuerpo calloso (verde oscuro), ventrículos laterales (azul), tercer ventrículo (morado), cisternas subaracnoideas (amarillo), acueducto cerebral (naranja).

7.3. ULTRASONIDOS

Para la realización de las ecografías los animales fueron anestesiados en una cámara de anestesia con una solución de sevoflurano al 8 % para inducir la anestesia y al 4 % para el mantenimiento con un flujo de oxígeno de 1 litro/minuto. La temperatura corporal se mantuvo a ≈ 37 °C con una manta térmica mientras se realizaba el estudio.

Para el objetivo 1, los animales se colocaron en decúbito prono con el pelo de la parte superior de la cabeza rasurada y utilizando gel para ultrasonidos. Para estudiar las estructuras anatómicas se obtuvieron imágenes en modo B en el plano coronal

colocando el transductor perpendicular a la cabeza de los animales (por delante de la implantación de las orejas) (**Figura 7**).

Plano coronal



Figura 7. Posicionamiento de la sonda. Colocación de la sonda de ultrasonidos para la observación de las estructuras cerebrales a través de la obtención de imágenes coronales.

Para los objetivos 2, 3 y 4, el volumen de hemorragia, las estructuras cerebrales y su desplazamiento se estudiaron con el modo B. El volumen de HIC se estudió a las 5 horas tras la realización de la cirugía, a las 48 horas, 96 horas y 1 mes post-HIC. El desplazamiento de las estructuras cerebrales se determinó, además de en esos tiempos, antes de la inducción de la HIC (pre-HIC) (**Figura 4**). Las imágenes se obtuvieron con los animales en decúbito prono, con el pelo de la parte superior de la cabeza rasurada y utilizando gel para ultrasonidos. Para estudiar el volumen de la HIC, por cada animal se realizaron 2 escáneres ultrasonográficos, uno en el plano coronal y otro en el plano parasagital. Para obtener las imágenes desde el punto de vista coronal, el transductor se colocó perpendicular a la cabeza de los animales (por delante de la implantación de las orejas), mientras que las imágenes parasagitales se obtuvieron con el transductor longitudinal a la cabeza de los animales. El plano coronal se usó nuevamente para estudiar las estructuras cerebrales y su desplazamiento, utilizando como referencia la distancia entre las cisternas subaracnoideas y la duramadre. Para ello, el transductor se colocó de forma perpendicular (por delante de la implantación de las orejas) y caudal a la cabeza de los animales (**Figura 8**).

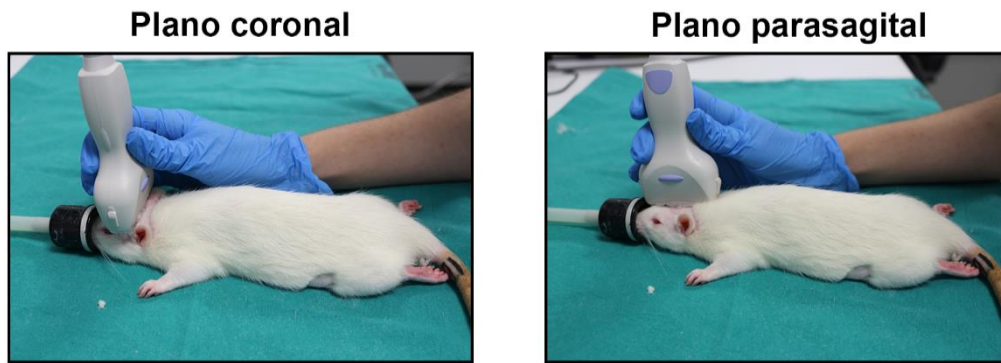


Figura 8. Posicionamiento de la sonda. Colocación de la sonda de ultrasonidos para la obtención de las imágenes coronales y parasagitales. El volumen de la HIC se estudió tanto en el plano coronal como en el plano parasagital, mientras que el desplazamiento de las estructuras cerebrales se determinó en el plano coronal.

Se utilizó el sistema de diagnóstico por ultrasonidos Xario 200 G (modelo TUS-X200, Canon, Tokio, Japón) y un transductor de multifrecuencia lineal de 13 MHz (PLU-1204BT, 18L7, Canon, Tokio, Japón). Todas las secuencias de imágenes obtenidas se adquirieron con un índice mecánico de 1,4 y con la optimización en los ajustes de ganancia (90-100) y profundidad (1,5 cm) constantes a lo largo de los experimentos.

7.4. DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE HEMORRAGIA Y DEL DESPLAZAMIENTO DE ESTRUCTURAS CEREBRALES

En los estudios de RM, la HIC se identificó como una lesión hiperintensa a las 48 horas y heterogénea (con hiper, hipo e isointensidad) al mes (**Figura 9**).

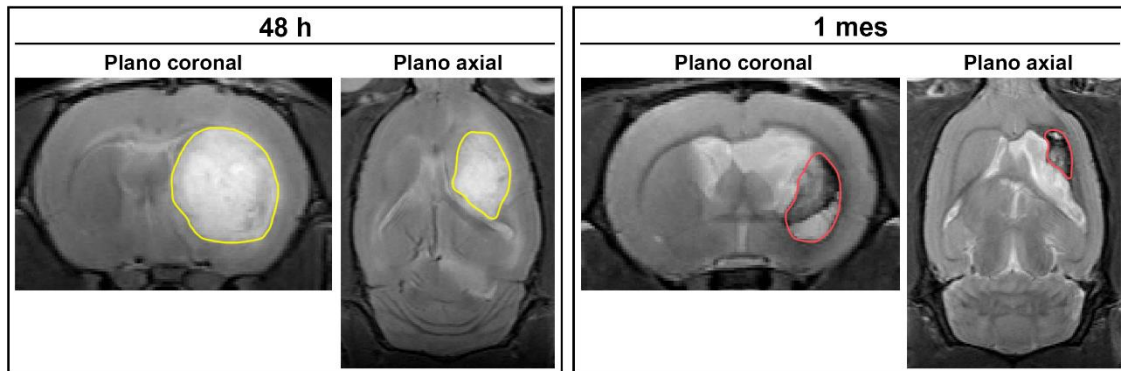


Figura 9. Identificación de la HIC. Visualización de la HIC en las imágenes T2 de RM tanto a las 48 horas como al mes. A las 48 horas está rodeado en amarillo la señal hiperintensa. Al mes está rodeado en rojo la señal heterogénea compuesta por regiones de hiper, hipo e isointensidad.

Para los estudios de ultrasonidos y de RM, el volumen de la HIC (mm^3) se midió usando la fórmula de Coniglobus ($A \times B \times C / 2$) para HIC esféricas o elipsoides (19,26,68,69), siendo A el diámetro máximo del hematoma en el corte coronal con mayor área del hematoma (mm); B es el máximo diámetro del hematoma perpendicular a A (mm); y C es el máximo diámetro sagital del hematoma (mm) (**Figura 10**).

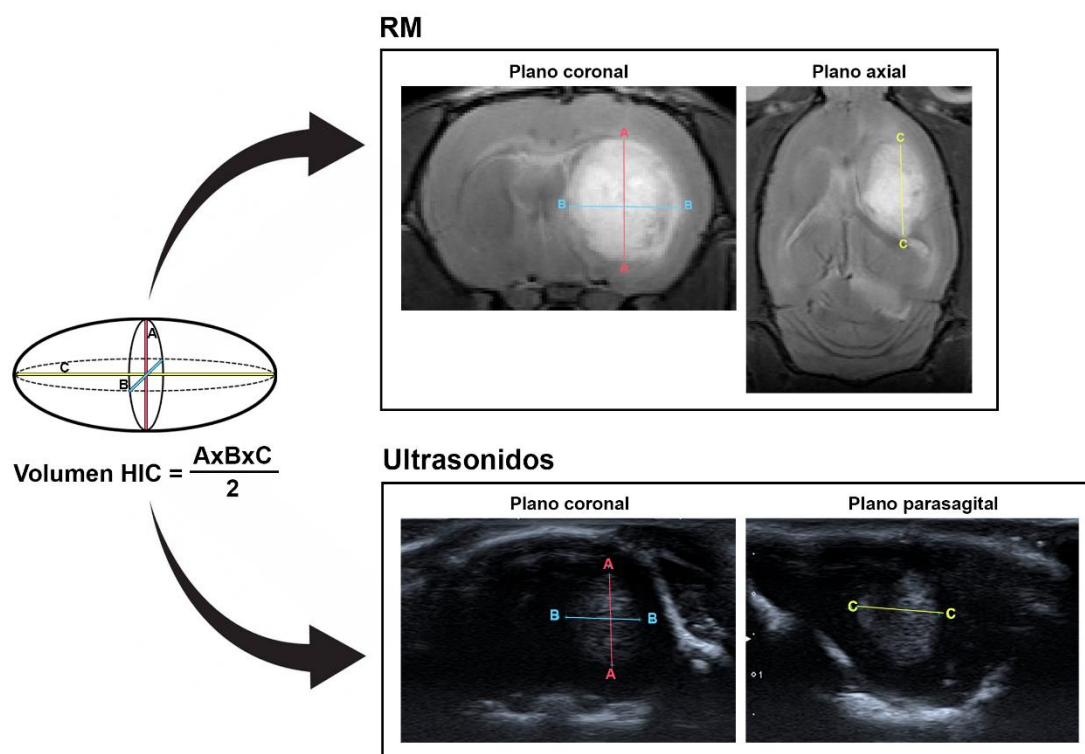


Figura 10. Determinación del volumen de la HIC. Estimación del volumen de la HIC obtenido mediante la fórmula $A \times B \times C / 2$ en imágenes cerebrales de rata por RM y por ultrasonidos. El plano coronal permitió el estudio del diámetro máximo "A" y el ancho máximo "B" de la hemorragia. El grosor de la hemorragia "C" se estudió en las imágenes axiales (RM) y parasagitales (ultrasonidos). Abreviaturas: HIC: hemorragia intracerebral. RM: resonancia magnética.

Para identificar y analizar el desplazamiento de las estructuras cerebrales se midió la distancia (mm) entre las cisternas subaracnoideas y la duramadre (**Figura 11**). Además, se calculó la ratio de desplazamiento de las cisternas (RDC) para normalizar la distancia siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{RDC} = \frac{\text{Distancia cisternas-duramadre lado ipsilateral a la lesión}}{\text{Distancia cisternas-duramadre lado contralateral a la lesión}}$$

Tras la normalización, un valor de 1 en el RDC indica no desplazamiento de las estructuras cerebrales; > 1 aumento de la distancia en el hemisferio ipsilateral a la lesión, y < 1 aumento de la distancia en el hemisferio contralateral a la lesión.

Para cuantificar la distancia del desplazamiento entre las cisternas subaracnoideas y la duramadre se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Desplazamiento cisternas-duramadre (mm)} = \text{Distancia cisternas-duramadre lado ipsilateral a la lesión} - \text{Distancia cisternas-duramadre lado contralateral a la lesión}$$

Donde un valor de 0 indica que no hay desplazamiento; un valor > 0 indica un desplazamiento mayor en el hemisferio ipsilateral a la lesión; y un valor < 0 indica un desplazamiento mayor en el hemisferio contralateral a la lesión.

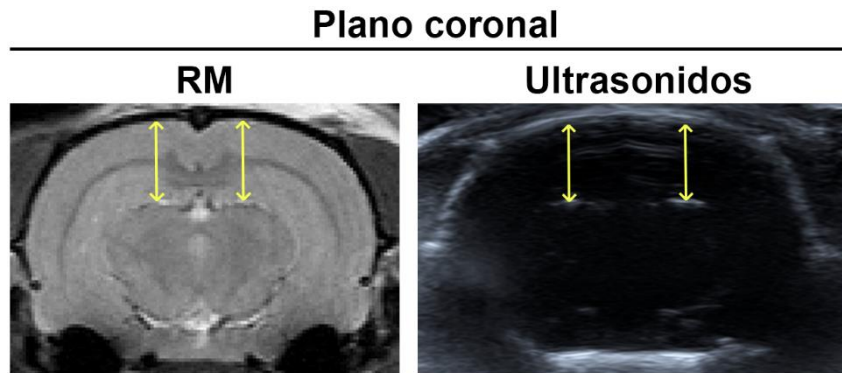


Figura 11. Estimación de la distancia cisternas-duramadre. Medición de la distancia (mm) entre la duramadre y las cisternas subaracnoideas tanto por RM como por ultrasonidos en el plano coronal. Las flechas bidireccionales amarillas indican la distancia medida.

8. INMUNOHISTOQUÍMICA DE CORTES HISTOLÓGICOS DE CEREBRO DE RATA

Para identificar las estructuras cerebrales *post-mortem* se utilizó la *tinción de Nissl* en secciones cerebrales de 40 μm de grosor. Para ello las muestras se pasaron en primer lugar por alcoholes de 70, 95, 100, 95, 70 y 50 % (1 vez en cada alcohol x 5 minutos). Se realizó un lavado rápido en agua destilada y se sumergieron durante 4 minutos en violeta de cresilo al 0,5 %. Posteriormente las muestras se deshidrataron en etanol al 70 % (1 vez x 5 minutos), al 95 % (1 vez x 5 minutos), en solución de diferenciación (formada por 1 % de ácido acético glacial y 95 % de etanol) (1 vez x 1 minuto), en etanol al 95 % (1 vez x 1 minuto) y al 100 % (1 vez x 1 minuto). Finalmente se sumergieron en xilol (3 veces x 15 minutos) y se montaron con un cubreobjetos y

el medio de montaje DePeX. Las imágenes fueron obtenidas con un objetivo 20 x y procesadas con el software de análisis de imagen Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, MD, EE.UU).

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados han sido expresados como media \pm desviación estándar (DE). El análisis del poder estadístico mostró que una muestra de 10 animales en cada grupo era necesario, como mínimo, para asegurar un nivel de significancia del 5 % (alfa) y un poder estadístico del 80 % (1-beta). Los animales que fallecieron antes de la finalización del estudio fueron reemplazados por nuevos sujetos hasta que se alcanzó un mínimo de 10 animales por grupo. Se realizó el análisis estadístico de las siguientes variables: volumen de HIC, distancia de las estructuras cerebrales y evaluación funcional. Para ello, primero se comprobó la normalidad de los datos mediante el test Shapiro-Wilk. En los casos donde no se rechazó la normalidad de los datos, los grupos fueron comparados usando análisis de varianza (ANOVA) para cada factor corregido con el test *post hoc* de Tukey. Por el contrario, cuando la normalidad fue rechazada, los grupos se compararon usando el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Mann-Whitney. Para comparaciones en el mismo grupo experimental, se realizó un T-test para muestras relacionadas, en el caso de normalidad, y el test de Wilcoxon en el caso de no normalidad. Para determinar la fuerza de las relaciones entre las mediciones por ultrasonidos y RM del volumen de hemorragia y distancia de las estructuras cerebrales, se usó el coeficiente de correlación de Pearson (r) ante la normalidad de los datos. El coeficiente de correlación de Spearman (ρ) se usó para cuantificar la relación entre los valores del volumen de hemorragia y la evaluación funcional. P-valores menores a 0,05 fueron considerados significativos. Todos los análisis fueron realizados usando el programa estadístico IBM SPSS 23 (Armonk, NY, EE.UU) y las figuras fueron obtenidas mediante el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, CA, EE.UU).

RESULTADOS

OBJETIVO 1

Establecer la utilidad de los ultrasonidos en la visualización e identificación de las estructuras cerebrales en rata

1. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS CEREBRALES

En primer lugar, las estructuras cerebrales se visualizaron en imágenes de RM en secuencia T2 utilizando como referencia los atlas de W Swanson L, Paxinos G y Watson C. Estas estructuras cerebrales se identificaron en los diferentes cortes tomando como referencia el Bregma. Así, alrededor de + 4,20 mm del Bregma se identificó la corteza cerebral (**Figura 12A**). Sobre - 0,48 mm del Bregma, se observaron con claridad los 2 hemisferios cerebrales conectados mediante el cuerpo caloso. También se identificó la corteza cerebral en la parte externa del cerebro, los canales de circulación del líquido cefalorraquídeo formado por los ventrículos laterales junto con el tercer ventrículo y, el estriado a ambos lados de los ventrículos laterales (**Figura 12B**). Sobre - 3,48 mm del Bregma se continuó con la observación de la corteza cerebral, el cuerpo caloso, la parte ventral de los ventrículos laterales en la base del cerebro y el tercer ventrículo. También en este corte, y constituyendo una expansión del espacio subaracnoideo, comenzaron a observarse las cisternas subaracnoideas (**Figura 12C**). En torno a - 5,04 mm del Bregma nuevamente se identificó la corteza cerebral, el cuerpo caloso y el tercer ventrículo, además del acueducto cerebral y el recorrido completo de las cisternas subaracnoideas. Concretamente en la parte superior del cerebro, se encontró la cisterna cuadrigeminal que se continuaba con la cisterna ambiens finalizando su recorrido en la base del cerebro con la cisterna interpeduncular (**Figura 12D**). Finalmente, alrededor de - 6,72 mm del Bregma, se observó nuevamente la corteza cerebral, el cuerpo caloso las cisternas subaracnoideas y el acueducto cerebral (**Figura 12E**) (**Tabla 3**).

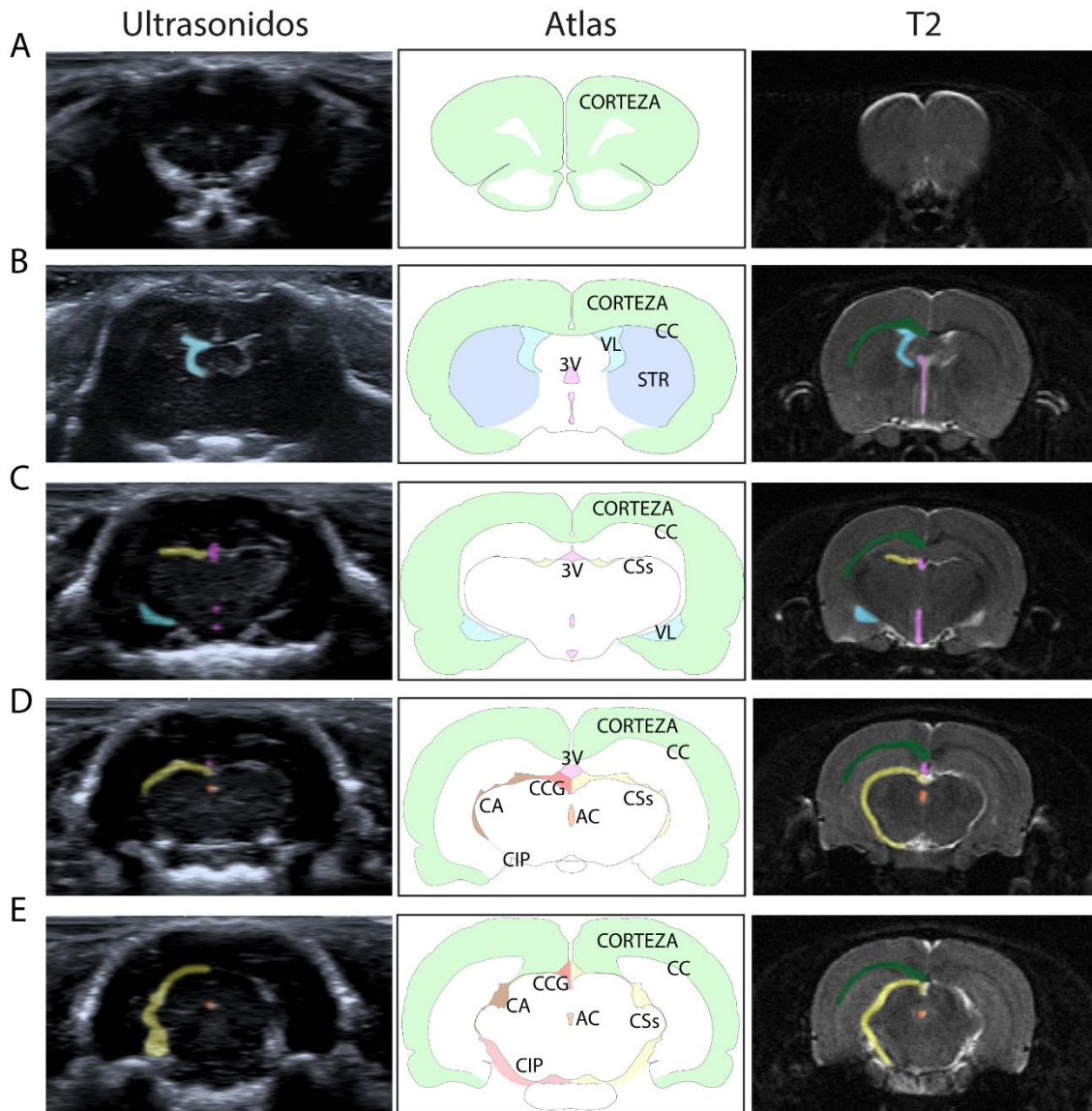


Figura 12. Estructuras cerebrales por ultrasonidos a través de la craneotomía total, por un atlas anatómico y por RM (imágenes T2) observadas alrededor de + 4,20 mm (A), - 0,48 mm (B), - 3,48 mm (C), - 5,04 mm (D) y - 6,72 mm (E). Las diferentes secciones fueron coloreadas de la siguiente forma: corteza (verde), cuerpo calloso (verde oscuro), ventrículos laterales (azul), estriado (azul oscuro), tercer ventrículo (morado), cisternas subaracnoideas (amarillo), acueducto cerebral (naranja). La cisterna cuadrigeminal (rojo) comunica con las cisternas ambiens (marrón) e interpeduncular (rosa) en la parte cerebral posterior. Abreviaturas: 3V: tercer ventrículo; AC: acueducto cerebral; CA: cisterna ambiens; CC: cuerpo calloso; CCG: cisterna cuadrigeminal; CSs: cisternas subaracnoideas; CIP: cisterna interpeduncular; STR: estriado; VL: ventrículo lateral.

Tabla 3. Tabla resumen con las principales estructuras cerebrales identificadas en el atlas anatómico, RM (T2), ultrasonidos sobre la craneotomía total y estudios *post-mortem* en los diferentes cortes tomando como referencia el Bregma.

| CORTES BREGMA | ESTRUCTURAS CEREBRALES | | | |
|---------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| | Atlas | RM | US | <i>Post-mortem</i> |
| + 4.20 mm | Corteza cerebral | Corteza cerebral | Corteza cerebral | Corteza cerebral |
| - 0.48 mm | Corteza cerebral, CC, VL, 3V, STR | Corteza cerebral, CC, VL, 3V, STR | Corteza cerebral, VL, STR | Corteza cerebral, CC, VL, 3V, STR |
| - 3.48 mm | Corteza cerebral, CC, VL, 3V, CCs | Corteza cerebral, CC, VL, 3V, CCs | CCs, 3V, VL | Corteza cerebral, CC, VL, 3V, CCs |
| - 5.04 mm | Corteza cerebral, CC, 3V, AC, CCs | Corteza cerebral, CC, 3V, AC, CCs | CCs, 3V, AC | Corteza cerebral, CC, 3V, AC, CCs |
| - 6.72 mm | Corteza cerebral, CC, AC, CCs | Corteza cerebral, CC, AC, CCs | CCs, AC | Corteza cerebral, CC, AC, CCs |

Abreviaturas: 3V: tercer ventrículo; AC: acueducto cerebral; CA: cisterna ambiens; CC: cuerpo calloso; CSs: cisternas subaracnoideas; RM: resonancia magnética; STR: estriado; US: ultrasonidos; VL: ventrículo lateral.

Las mismas estructuras reconocidas en las imágenes T2 de RM se identificaron en las imágenes obtenidas por los ultrasonidos sobre la craneotomía total (**Figura 12**). Debido a que los huesos craneales absorben las ondas de los ultrasonidos dificultando la visualización de las estructuras, este abordaje podría permitir una mejor observación.

De esta manera, al estudiar las imágenes por ultrasonidos, se identificó la corteza cerebral en la parte anterior del cerebro (sobre + 4,20 mm del Bregma) (**Figura 12A**). La corteza cerebral, junto con los ventrículos laterales (visualizados como 2 cavidades interconectadas) y el estriado por fuera de las paredes de los ventrículos laterales, se observaron en - 0,48 mm del Bregma (**Figura 12B**). En la parte ventral y entre las cisternas subaracnoideas se observó el tercer ventrículo, sobre - 3,48 mm del Bregma. En este corte, concretamente en la parte ventral del cerebro y a ambos lados de la última parte de las cisternas, también pudo observarse la parte ventral de los ventrículos

laterales (**Figura 12C**). El acueducto cerebral, que conecta el tercer y cuarto ventrículo, así como una visualización más definida de las cisternas subaracnoideas se observaron en torno a - 5,04 mm del Bregma. En la base del cerebro, y formando parte de las cisternas subaracnoideas, encontramos la cisterna cuadrigeminal que conecta con la cisterna ambiens y la cisterna interpeduncular (**Figura 12D**). Finalmente, se continuó observando el acueducto cerebral y el trayecto de las cisternas subaracnoideas sobre - 6,72 mm del Bregma (**Figura 12E**) (**Tabla 3**).

2. BARRERAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS CEREBRALES

Una vez identificadas las estructuras cerebrales, éstas se localizaron en los estudios *post-mortem* (secciones fijadas de tejido [**Figura 13A**] y secciones teñidas con Nissl [**Figura 13B**]), tomando como referencia nuevamente las estructuras cerebrales de las imágenes de RM en T2 *in vivo* (**Figura 13C**) y del atlas anatómico (**Figura 13H**), previamente descritas en el apartado “1. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS CEREBRALES” de la página 53. De esta forma, se identificó principalmente la corteza cerebral sobre + 4,20 mm del Bregma (**Figura 13A y 13B**). La corteza cerebral, el cuerpo calloso, los ventrículos laterales, el tercer ventrículo y el estriado se observaron claramente en - 0,48 mm del Bregma (**Figura 13A y 13B**). La corteza cerebral, el cuerpo calloso y la parte ventral de los ventrículos laterales continuaron observándose junto con las cisternas subaracnoideas y el tercer ventrículo alrededor de - 3,48 mm del Bregma (**Figura 13A y 13B**). Posteriormente, sobre - 5,04 mm del Bregma, se siguió visualizando la corteza cerebral, el cuerpo calloso, las cisternas subaracnoideas y el tercer ventrículo junto con el acueducto cerebral (**Figura 13A y 13B**). Finalmente, se pudo identificar la corteza cerebral, el cuerpo calloso, las cisternas subaracnoideas y el acueducto cerebral alrededor de - 6,72 mm del Bregma (**Figura 13A y 13B**) (**Tabla 3**).

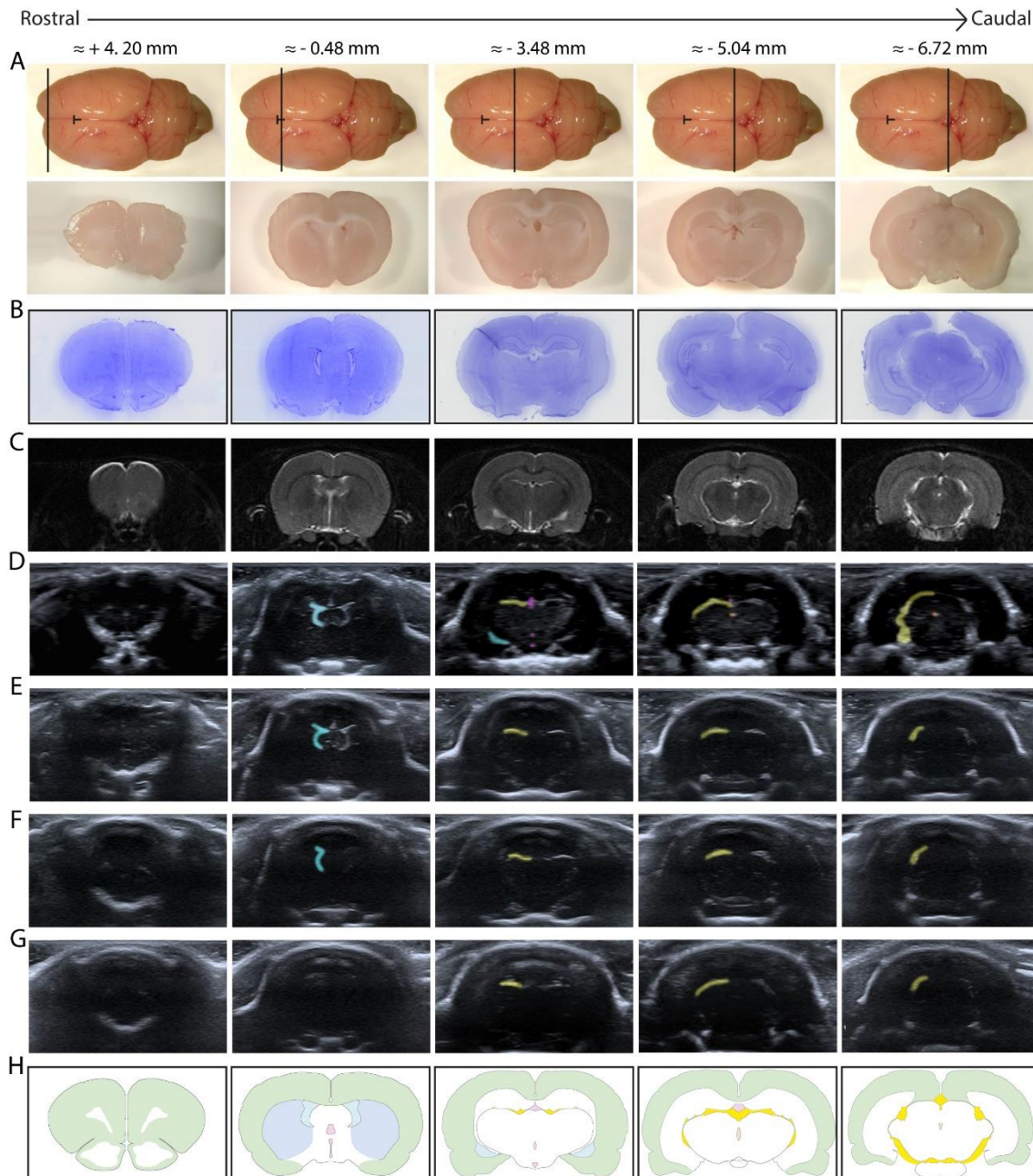


Figura 13. Imágenes representativas de las estructuras cerebrales de anterior (rostral) a posterior (caudal). Vista superior del cerebro e imágenes coronales en cortes post-mortem (A). Secciones coronales del cerebro usando la tinción de Nissl (B), imágenes T2 (C) y un atlas dibujado (H). Secciones coronales del cerebro usando ultrasonidos a través de la craneotomía total (D), craneotomía delimitada (E), cráneo (F) y la piel (G). El símbolo “I” marca el Bregma. Se colorearon medias secciones: ventrículos laterales (azul), tercer ventrículo (morado), cisternas subaracnoideas (amarillo) y el acueducto cerebral (naranja).

A continuación, estas estructuras se correlacionaron con los ultrasonidos a través de los diferentes abordajes: craneotomía total (**Figura 13D**), craneotomía delimitada (**Figura 13E**), cráneo (**Figura 13F**) y directamente sobre la piel (**Figura 13G**).

En la **Figura 13D** se muestran las estructuras cerebrales observadas con el transductor sobre la craneotomía total, previamente identificadas y descritas en el apartado “1. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS CEREBRALES” de la página 55. La colocación del transductor sobre la craneotomía delimitada permitió la visualización de las 2 cavidades correspondientes a los ventrículos laterales sobre - 0,48 mm del Bregma, y de las cisternas subaracnoideas en la parte posterior del cerebro (- 3,48 mm, - 5,04 mm y - 6,72 mm del Bregma) (**Figura 13E**). También se observó colocando el transductor sobre el cráneo, la silueta de los ventrículos laterales (- 0,48 mm del Bregma) y en la parte posterior del cerebro las cisternas subaracnoideas (- 3,48 mm, - 5,04 mm y - 6,72 mm del Bregma) (**Figura 13F**). Sin embargo, el transductor colocado directamente sobre la piel sólo permitió identificar en la zona caudal las cisternas subaracnoideas (- 3,48 mm, - 5,04 mm y - 6,72 mm del Bregma) (**Figura 13G**) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Principales estructuras cerebrales identificadas por ultrasonidos.

| VENTANA TRANSCRANEAL | ESTRUCTURA CEREBRAL |
|---------------------------------|--|
| Piel | Cisternas subaracnoideas |
| Cráneo | Ventrículos laterales, cisternas subaracnoideas |
| Craneotomía delimitada | Ventrículos laterales, cisternas subaracnoideas |
| Craneotomía total | Corteza cerebral, ventrículos laterales, estriado, tercer ventrículo, cisternas subaracnoideas, acueducto cerebral |

OBJETIVO 2

Evaluar en un modelo animal de hemorragia intracerebral la utilidad de los ultrasonidos en el estudio de la lesión cerebral (volumen de hemorragia y desplazamiento de estructuras cerebrales) comparando los datos obtenidos con la resonancia magnética

1. VOLUMEN DE HEMORRAGIA INTRACEREBRAL CON ULTRASONIDOS Y RESONANCIA MAGNÉTICA

En primer lugar se detectó y se caracterizó la señal de la HIC tanto por ultrasonidos como por RM. De esta manera, la HIC se identificó por ultrasonidos como una lesión de apariencia hiperecogénica a las 48 horas e hipoeecogénica al mes de la inducción de la HIC. Por RM, se asoció la HIC con una lesión de señal hiperintesa a las 48 horas y heterogénea al mes (**Figura 14A**).

Al estudiar los cambios evolutivos de la HIC se observó que el volumen de la HIC medido por ultrasonidos mostró una disminución significativa entre las 48 horas y 1 mes ($p=0,001$). También por RM, se observó una disminución significativa del volumen de la HIC entre las 48 horas y el mes ($p=0,001$) (**Figura 14B**). Los datos del volumen de HIC determinado por las dos técnicas de imagen se muestran en la **Tabla 5**.

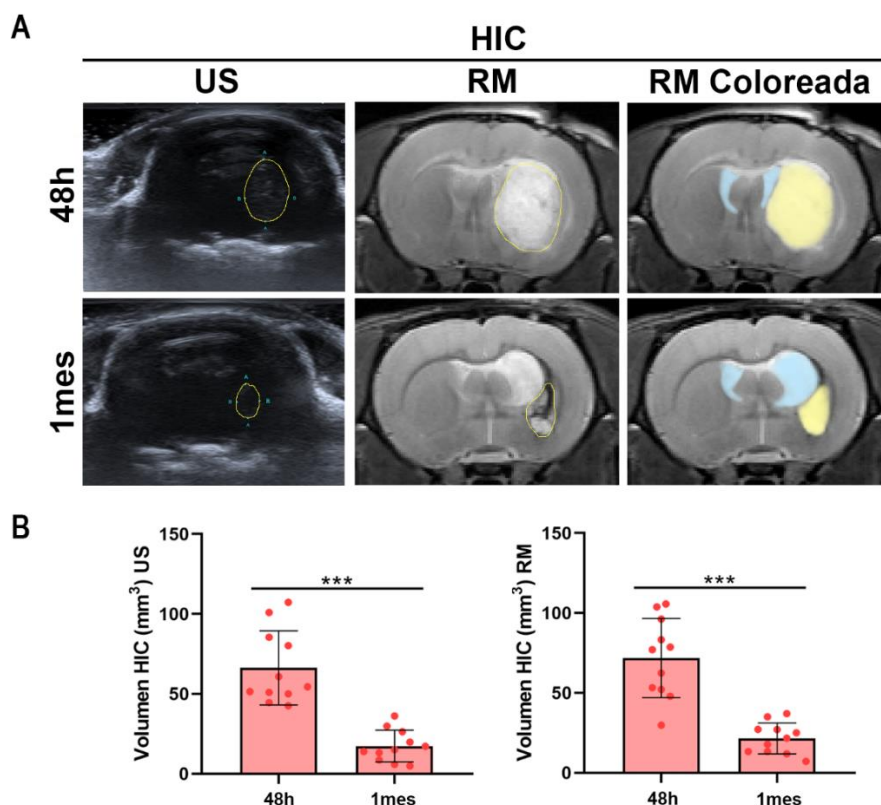


Figura 14. Volumen de la hemorragia en el grupo HIC medido por ultrasonidos y RM (imágenes T2). (A) Imágenes representativas por ultrasonidos y por RM del volumen de HIC a las 48 horas y al mes de la HIC. (B) Cuantificación de la medición del volumen de la HIC a las 48 horas y al mes tanto por ultrasonidos como por RM. En las imágenes de RM, los ventrículos laterales están coloreados en azul claro y la HIC en amarillo claro. Los datos se muestran como media ± DE. *** $p < 0,001$. Abreviaturas: DE: desviación estándar; HIC: hemorragia intracerebral; RM: resonancia magnética; US: ultrasonidos.

Tabla 5. Volumen de HIC de los animales analizados en el estudio.

| | | Tiempo | Sanas (n=10) | Sham (n=10) | HIC (n=11) |
|-------------|-----------------------------------|--------|--------------|-------------|---------------|
| Volumen HIC | US (mm ³ [media ± DE]) | 48 h | -- | -- | 66,22 ± 23,19 |
| | | 1 mes | -- | -- | 17,36 ± 9,97 |
| | RM (mm ³ [media ± DE]) | 48 h | -- | -- | 71,86 ± 24,75 |
| | | 1 mes | -- | -- | 21,49 ± 9,74 |

Abreviaturas: DE: desviación estándar; HIC: hemorragia intracerebral; RM: resonancia magnética; US: ultrasonidos.

Al comparar las mediciones realizadas por ultrasonidos y RM se observó que los datos obtenidos en el volumen de la HIC entre ambas técnicas mostraron una excelente correlación a las 48 horas ($r=0,905$, $p=0,001$). A 1 mes de la HIC, también hubo una buena correlación entre dichas herramientas de imagen en la medición del volumen de la HIC ($r=0,656$, $p=0,028$) (**Figura 15**).

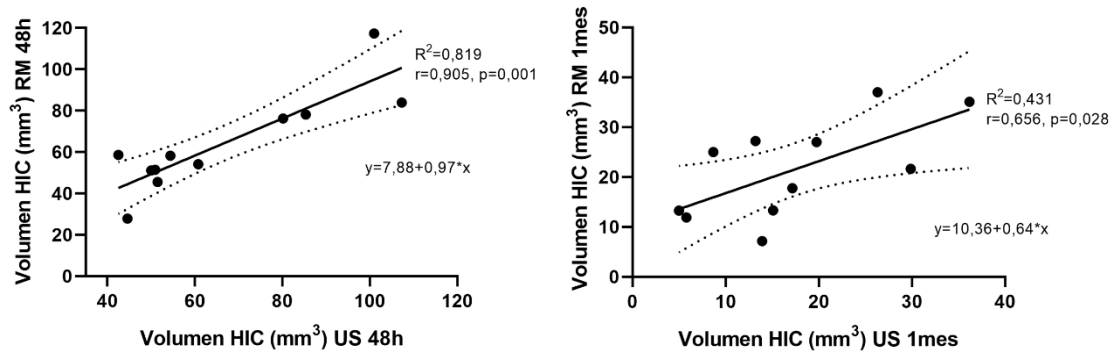


Figura 15. Correlaciones. Representación gráfica de la correlación en el volumen de la HIC medido por ultrasonidos y RM a las 48 horas y 1 mes. Abreviaturas: HIC: hemorragia intracerebral; RM: resonancia magnética; US: ultrasonidos.

2. VISUALIZACIÓN DEL DESPLAZAMIENTO DE ESTRUCTURAS CEREBRALES POR LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL MEDIANTE ULTRASONIDOS Y RESONANCIA MAGNÉTICA

Para determinar el posible desplazamiento de las estructuras cerebrales como consecuencia de la HIC se utilizó la RDC. Mediante los ultrasonidos, no se observaron diferencias significativas en la RDC entre los grupos sanos y sham a las 48 horas ($p=0,933$) ni al mes ($p=0,870$) de la HIC (**Figura 16**). Los datos de las mediciones entre las cisternas subaracnoideas y la duramadre en los grupos de estudio se encuentran en la **Tabla 6**. Sin embargo, se encontró un aumento de la distancia en el hemisferio ipsilateral a la lesión, identificado por un incremento significativo en la RDC del grupo HIC a las 48 horas comparado con el grupo sano ($p=0,001$) y sham ($p=0,004$). Estas diferencias significativas desaparecieron al mes entre los grupos HIC y los sanos ($p=0,118$) y sham ($p=0,139$) (**Figura 16**) (**Tabla 6**).

Por RM, los grupos de ratas sanas y sham tampoco mostraron diferencias en el RDC a las 48 horas ($p=0,480$) ni al mes ($p=0,316$). No obstante, a las 48 horas se encontró un aumento de la RDC de los animales con HIC con respecto a los animales sanos ($p=0,002$) y sham ($p=0,008$) indicando mayor distancia en el hemisferio ipsilateral. Pero, a 1 mes de la HIC no se encontraron diferencias en el RDC entre los animales con HIC y los animales sanos ($p=0,078$) y sham ($p=0,111$) (Figura 16) (Tabla 6).

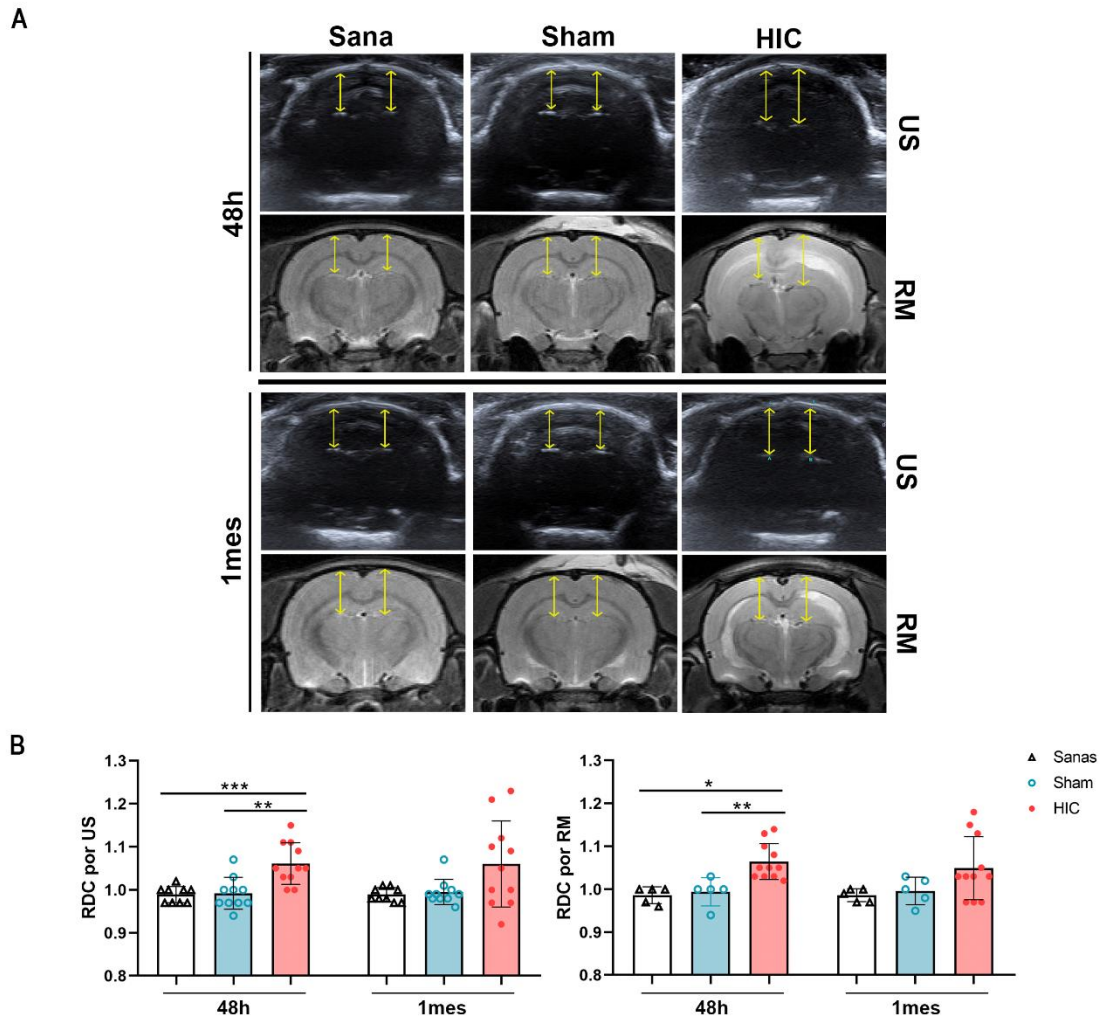


Figura 16. Desplazamiento de las estructuras cerebrales determinado por ultrasonidos y RM (imágenes T2). (A) Imágenes representativas de las cisternas subaracnoideas identificadas por los ultrasonidos y la RM en los grupos experimentales a las 48 horas y 1 mes tras la inducción de la HIC. Las flechas amarillas indican la distancia medida. (B) Cuantificación por ultrasonidos y RM de la ratio de desplazamiento de las cisternas subaracnoideas con respecto a la duramadre entre los grupos experimentales. Los datos se muestran como media \pm DE. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abreviaturas: DE: desviación estándar; HIC: hemorragia intracerebral; RDC: ratio de desplazamiento de las cisternas; RM: resonancia magnética; US: ultrasonidos.

Tabla 6. RDC y distancia entre las cisternas subaracnoideas y la duramadre de los animales utilizados en el estudio.

| | | Tiempo | Sanas (n=10) | Sham (n=10) | HIC (n=11) | p valor |
|---------------------------|---|--------|-----------------|----------------|---------------|--------------|
| RDC | US (media ± DE) | 48 h | 0,99 ± 0,02 | 0,99 ± 0,04 | 1,06 ± 0,04 | 0,002 |
| | | 1 mes | 0,99 ± 0,02 | 0,99 ± 0,03 | 1,06 ± 0,06 | 0,201 |
| | RM (media ± DE) | 48 h | 0,98 ± 0,02 | 0,99 ± 0,03 | 1,06 ± 0,04 | 0,001 |
| | | 1 mes | 0,98 ± 0,01 | 1,00 ± 0,03 | 1,05 ± 0,07 | 0,096 |
| Dist. cisternas-duramadre | Distancia lado contralateral US (mm [media ± DE]) | 48 h | -- | -- | 3,63 ± 0,44 | -- |
| | | 1 mes | -- | -- | 3,44 ± 0,29 | -- |
| | Distancia lado contralateral RM (mm [media ± DE]) | 48 h | -- | -- | 3,84 ± 0,23 | -- |
| | | 1 mes | -- | -- | 3,49 ± 0,26 | -- |
| | Distancia lado ipsilateral US (mm [media ± DE]) | 48 h | -- | -- | 3,84 ± 0,41 | -- |
| | | 1 mes | -- | -- | 3,64 ± 0,46 | -- |
| | Distancia lado ipsilateral RM (mm [media ± DE]) | 48 h | -- | -- | 4,09 ± 0,30 | -- |
| | | 1 mes | -- | -- | 3,67 ± 0,45 | -- |

Abreviaturas: DE: desviación estándar; HIC: hemorragia intracerebral; RDC: ratio de desplazamiento de las cisternas; RM: resonancia magnética; US: ultrasonidos. Los datos fueron comparados con el test de Kruskal-Wallis. Los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) están en negrita.

Tras analizar el desplazamiento de las estructuras cerebrales, se estudió la correlación de esta variable entre las 2 técnicas de imagen utilizadas. A las 48 horas, se observó que, en la distancia entre las cisternas y la duramadre del lado contralateral a la hemorragia, entre los ultrasonidos y la RM existía una correlación de $r=0,296$ ($p=0,376$). La correlación en esta distancia en el lado ipsilateral a la lesión entre los ultrasonidos y la RM fue de $r=0,529$ ($p=0,094$). En cambio, a 1 mes, la distancia medida por ambas técnicas de imagen mostró una correlación de $r=0,906$ ($p=0,001$) en el lado contralateral y de $r=0,870$ ($p=0,001$) en el lado ipsilateral (**Figura 17**) (**Tabla 6**).

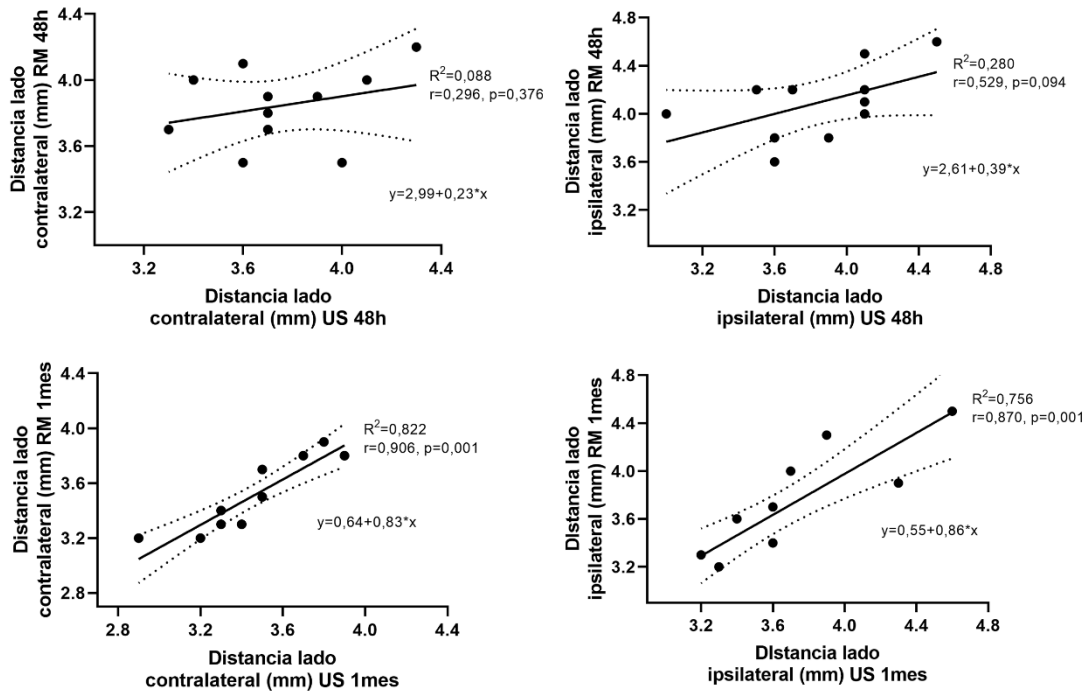


Figura 17. Correlaciones. Representación gráfica de la correlación entre los ultrasonidos y la RM en la distancia entre las cisternas subaracnoideas y la duramadre en el lado contralateral (**izquierda**) e ipsilateral (**derecha**) a las 48 horas y 1 mes tras la HIC. Abreviaturas: RM: resonancia magnética; US: ultrasonidos.

OBJETIVO 3

Valorar la utilidad de los ultrasonidos en la monitorización de los cambios evolutivos en el volumen de la hemorragia intracerebral y en el desplazamiento de las estructuras cerebrales

1. MONITORIZACIÓN DEL VOLUMEN DE LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL CON ULTRASONIDOS

Al analizar los cambios con el paso del tiempo del volumen de la HIC por ultrasonidos, se observó que, a las 5 horas de la inducción de la HIC, la hiperecogenicidad de la señal de HIC fue disminuyendo paulatinamente hasta que se observaron señales hipoecogénicas a 1 mes (**Figura 18A**). Además, el volumen de la HIC mostró una disminución significativa entre las 5 horas y el mes ($p=0,001$), las 48 horas y el mes ($p=0,001$) y las 96 horas y el mes ($p=0,001$) (**Figura 18B**) (**Tabla 7**). Este seguimiento también fue realizado por RM donde se observó una reducción en el volumen de la HIC entre las 48 horas y el mes ($71,86 \pm 24,75 \text{ mm}^3$ vs $21,49 \pm 9,74 \text{ mm}^3$, $p=0,001$), como se ha detallado en el objetivo 2.

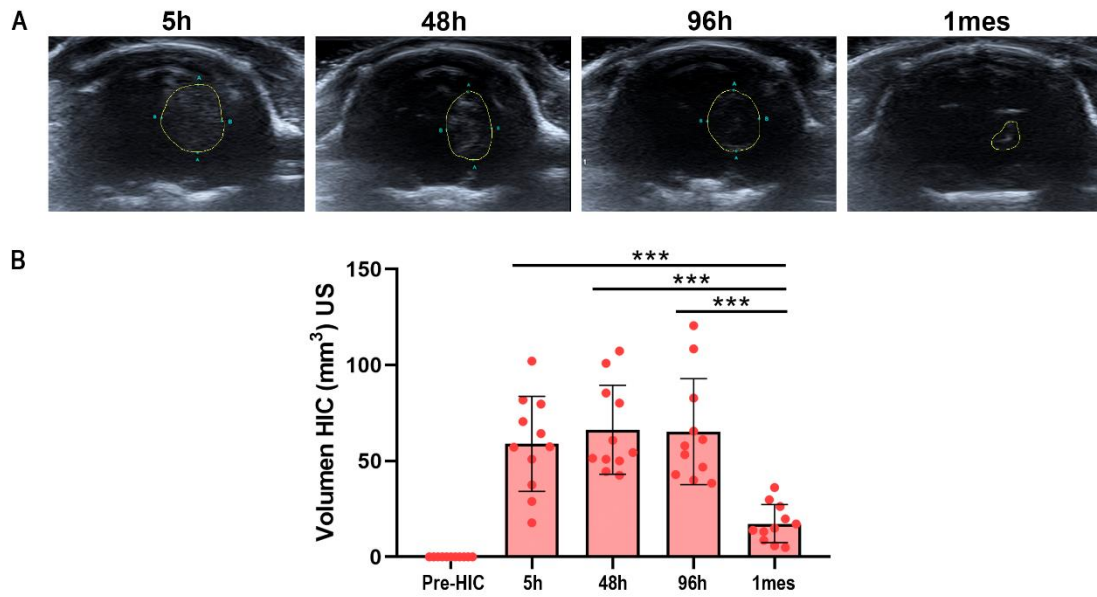


Figura 18. Seguimiento del volumen de la HIC por ultrasonidos. (A) Imágenes representativas de la ecogenicidad de la HIC a lo largo del tiempo. La hiperecogenicidad de la hemorragia fue decreciendo desde las 5 horas tras la inducción de la HIC hasta 1 mes. (B) Cuantificación del volumen de HIC a lo largo del tiempo. Los datos se muestran como media \pm DE. *** $p < 0,001$. Abreviaturas: DE: desviación estándar; HIC: hemorragia intracerebral; US: ultrasonidos.

Tabla 7. Volumen de HIC por ultrasonidos de los animales analizados en el estudio.

| | Tiempo | Sanas (n=10) | Sham (n=10) | HIC (n=11) |
|--|--------|--------------|-------------|-------------------|
| Volumen HIC (mm ³ [media \pm DE]) | 5 h | -- | -- | 58,92 \pm 24,70 |
| | 48 h | -- | -- | 66,22 \pm 23,19 |
| | 96 h | -- | -- | 65,27 \pm 27,62 |
| | 1 mes | -- | -- | 17,36 \pm 9,97 |

Abreviaturas: DE: desviación estándar; HIC: hemorragia intracerebral; RM: resonancia magnética; US: ultrasonidos.

2. MONITORIZACIÓN DEL DESPLAZAMIENTO DE ESTRUCTURAS CEREBRALES CON ULTRASONIDOS

Para determinar por ultrasonidos el desplazamiento de las estructuras cerebrales a lo largo de todo el estudio, se utilizó nuevamente la RDC. No se observaron diferencias significativas en la RDC entre los grupos de animales sanos y sham antes de la inducción de la HIC (pre-HIC) ($p=0,422$), a las 5 horas ($p=0,295$), 48 horas ($p=0,933$), 96 horas ($p=0,213$) y 1 mes ($p=0,870$) tras la HIC (**Figura 19**) (**Tabla 8**).

Antes de la inducción de la HIC (pre-HIC), la RDC del grupo HIC no mostró diferencias significativas con respecto al grupo sano ($p=0,352$) o al grupo sham ($p=0,788$). Tampoco se observaron diferencias a las 5 horas entre el grupo HIC y el grupo sano ($p=0,192$) o entre el grupo HIC y el grupo sham ($p=1,00$). Sin embargo, sí se encontró un aumento de la distancia de las cisternas con respecto a la duramadre en el lado ipsilateral debido a un incremento significativo en la RDC del grupo HIC comparado con el grupo sano ($p=0,001$) y con el grupo sham ($p=0,004$) a las 48 horas. A las 96 horas, también se observó de forma estadísticamente significativa, una mayor RDC de los animales con HIC respecto de los animales sanos ($p=0,026$); pero solo se encontró una tendencia con los animales sham en dicho tiempo ($p=0,062$). Estas diferencias significativas desaparecieron al mes entre el grupo HIC y sano ($p=0,118$) y entre el grupo HIC y sham ($p=0,139$) (**Figura 19**) (**Tabla 8**). Este seguimiento también fue realizado por RM donde se observó en el hemisferio ipsilateral una mayor distancia de las cisternas-duramadre en el grupo de animales con HIC ($1,06 \pm 0,04$) con respecto al grupo sano ($0,98 \pm 0,02$, $p=0,002$) y sham ($0,99 \pm 0,03$, $p=0,008$) a las 48 horas, como se he detallado en el objetivo 2.

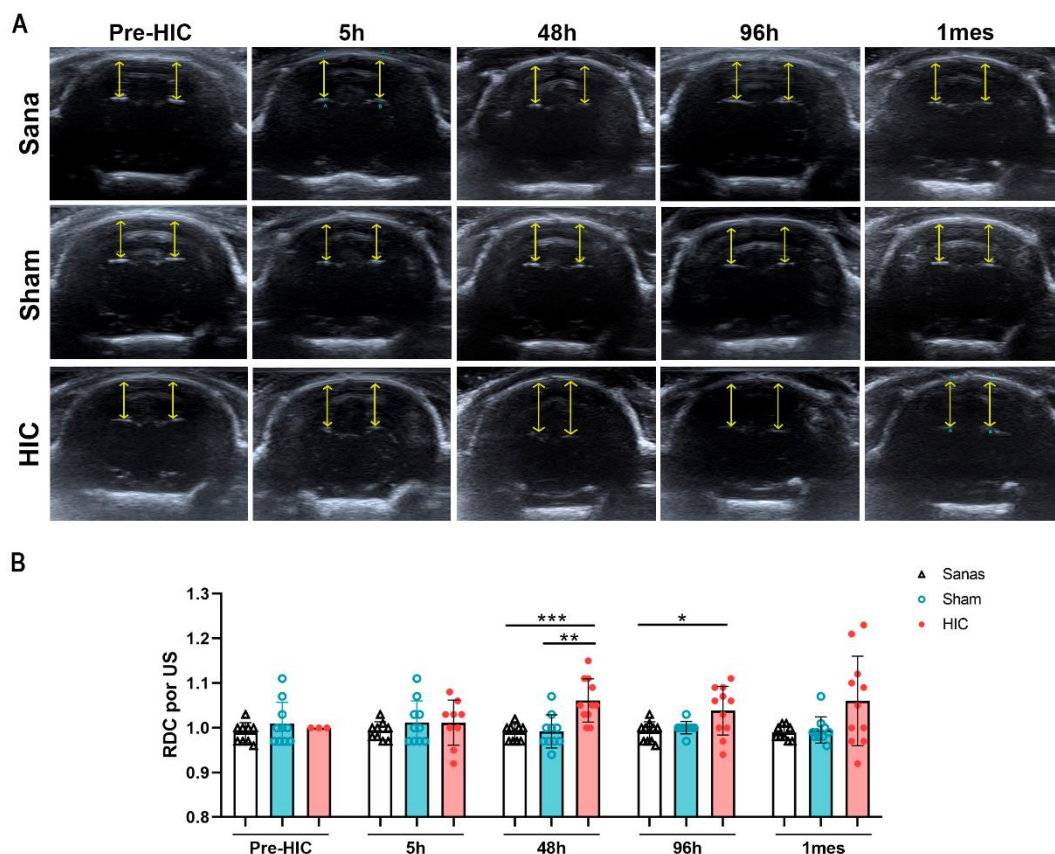


Figura 19. (A) Imágenes representativas de las cisternas subaracnoideas identificadas por los ultrasonidos en los grupos experimentales de animales sanos, animales sham y animales con HIC antes de la inducción de la HIC (pre-HIC), a las 48 horas, 96 horas y 1 mes post-HIC. Las flechas amarillas indican la distancia medida. **(B)** Cuantificación por ultrasonidos y RM de la ratio de desplazamiento de las cisternas subaracnoideas con respecto a la duramadre entre los grupos experimentales. Los datos se muestran como media \pm DE. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abreviaturas: DE: desviación estándar; HIC: hemorragia intracerebral; RM: resonancia magnética; US: ultrasonidos.

Tabla 8. RDC medido por ultrasonidos de los animales utilizados en el estudio.

| | Tiempo | Sanas (n=10) | Sham (n=10) | HIC (n=11) | p valor |
|----------------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|
| RDC (media \pm DE) | Pre-HIC | 0,99 \pm 0,02 | 1,01 \pm 0,05 | 1,00 \pm 0,00 | 0,587 |
| | 5 h | 0,99 \pm 0,02 | 1,01 \pm 0,05 | 0,99 \pm 0,04 | 0,401 |
| | 48 h | 0,99 \pm 0,02 | 0,99 \pm 0,04 | 1,06 \pm 0,04 | 0,002 |
| | 96 h | 0,99 \pm 0,02 | 1,00 \pm 0,01 | 1,04 \pm 0,05 | 0,033 |
| | 1 mes | 0,99 \pm 0,02 | 0,99 \pm 0,03 | 1,06 \pm 0,06 | 0,201 |

Abreviaturas: DE: desviación estándar; HIC: hemorragia intracerebral; RDC: ratio de desplazamiento de las cisternas; RM: resonancia magnética; US: ultrasonidos. Los datos fueron comparados con el test de Kruskal-Wallis. Los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) están en negrita.

Por otra parte, se cuantificó el desplazamiento de las cisternas subaracnoideas en términos de la diferencia de distancia entre el lado ipsilateral y el contralateral. En el grupo HIC, antes de la inducción de la HIC no se produjo desplazamiento; a las 5 horas de la HIC, la distancia en el hemisferio ipsilateral a la lesión fue de media 0,03 mm más grande que en el lado contralateral; a las 48 horas era 0,21 mm mayor de media; a las 96 horas el incremento medio de la distancia fue de 0,13 mm en el lado ipsilateral; y al mes fue de 0,21 mm (**Figura 20**).

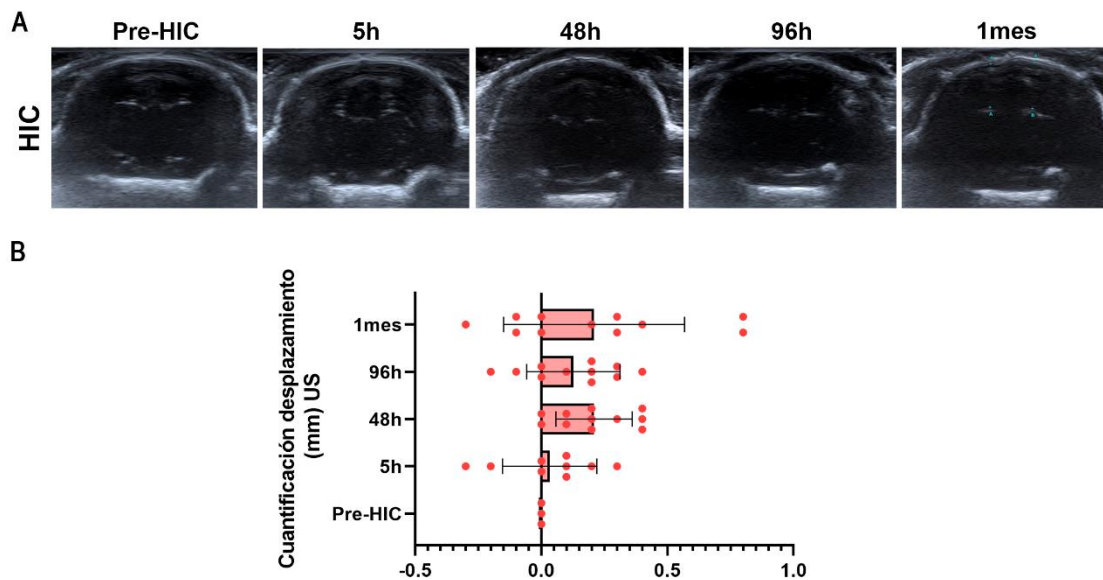


Figura 20. (A) Imágenes representativas de las cisternas subaracnoideas identificadas por los ultrasonidos en los animales con HIC antes de la inducción de la HIC (pre-HIC), a las 48 horas, 96 horas y 1 mes post-HIC. **(B)** Cuantificación por ultrasonidos del desplazamiento de las cisternas subaracnoideas con respecto a la duramadre en el grupo de HIC. Los valores positivos indican un desplazamiento de las cisternas-duramadre mayor en el lado ipsilateral a la lesión, y los valores negativos un desplazamiento mayor en el lado contralateral. Los datos se muestran como media \pm DE. Abreviaturas: DE: desviación estándar; HIC: hemorragia intracerebral; US: ultrasonidos.

OBJETIVO 4

Analizar la correlación del volumen de la hemorragia intracerebral, medido por ultrasonidos y por resonancia magnética, con la evaluación funcional

1. MORTALIDAD

De un total de 33 ratas, 2 ratas fueron excluidas del estudio: 1 rata falleció durante la cirugía (del grupo de HIC) y 1 rata falleció en la RM (del grupo de ratas sanas) a las 48 horas.

2. ESTADO CLÍNICO DE LOS ANIMALES

En relación al estado clínico de los animales, se llevó a cabo una evaluación funcional en todos los animales mediante la realización del test de la barra, barra con escalón, cilindro rotatorio o Rotarod y test de Rogers.

Los grupos de ratas sanas y sham no mostraron diferencias significativas en los test de evaluación funcional realizados en ninguno de los tiempos de estudio ($p > 0,05$), con puntuaciones cercanas a 0 en el test de la barra, barra con escalón y de Rogers y, tiempos de permanencia próximos a 120 s en el Rotarod, lo que muestra ausencia de déficit funcional (**Figura 21**) (**Tabla 9**).

En el test de la barra, el grupo HIC mostró mayor déficit funcional que el grupo de ratas sanas a las 48 horas ($p=0,001$), 96 horas ($p=0,001$) y 1 mes ($p=0,003$). En este test, el grupo HIC también mostró mayor déficit que el grupo sham a las 48 horas ($p=0,001$), 96 horas ($p=0,001$) y 1 mes ($p=0,003$) (**Figura 21**) (**Tabla 9**).

Al analizar el test de la barra con escalón, los animales con HIC mostraron una peor evaluación funcional que los animales sanos a las 48 horas ($p=0,001$), 96 horas ($p=0,001$) y un mes ($p=0,001$). Este grupo de animales con HIC también mostró peores resultados que los animales sham a las 48 horas ($p=0,001$), 96 horas ($p=0,001$) y un mes ($p=0,001$) tras la inducción de la HIC **(Figura 21) (Tabla 9)**.

El tiempo de permanencia en el Rotarod fue significativamente superior en el grupo de ratas sanas comparado con el grupo HIC a las 48 horas ($p=0,019$) y 96 horas ($p=0,037$), sin diferencias significativas al mes ($p=0,097$). Se observaron los mismos resultados en los animales sham con respecto a los animales con HIC a las 48 horas ($p=0,002$) y 96 horas ($p=0,003$), y tampoco se observaron diferencias al mes ($p=0,202$) **(Figura 21) (Tabla 9)**.

En el test de Rogers, los animales sanos mostraron mejor evaluación funcional que los animales con HIC a las 48 horas ($p=0,001$), 96 horas ($p=0,001$) y 1 mes ($p=0,041$). El grupo sham también mostró mejor evaluación funcional con respecto al grupo HIC a las 48 horas ($p=0,001$) y a las 96 horas ($p=0,001$) pero, no hubo diferencias significativas al mes ($p=0,078$) **(Figura 21) (Tabla 9)**.

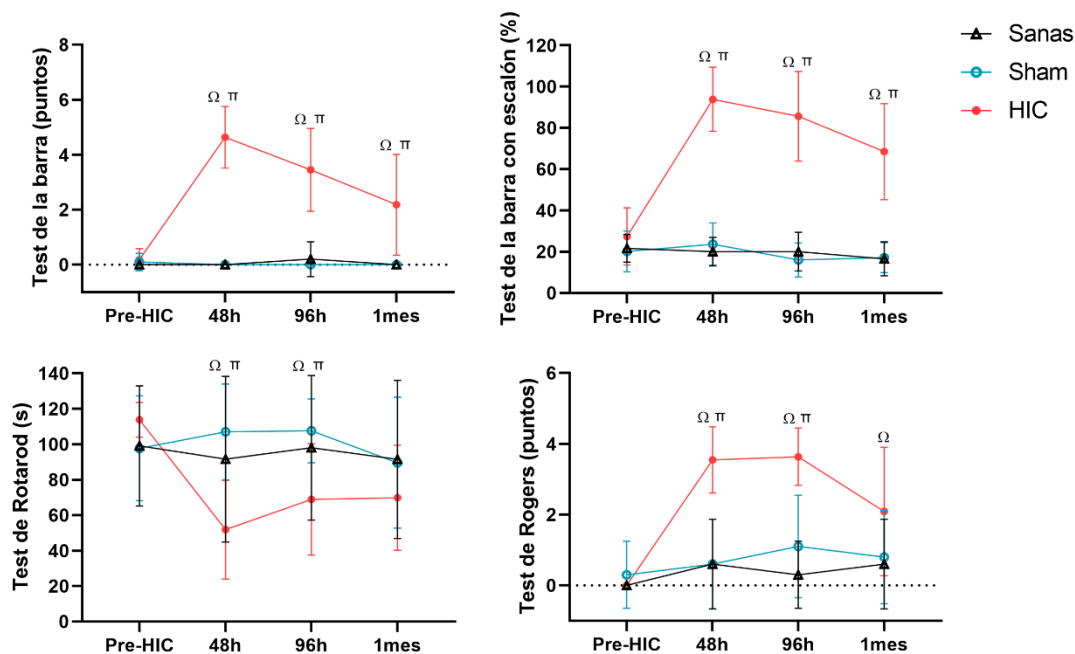


Figura 21. Test funcionales. Gráficos del test de la barra, de la barra con escalón, del cilindro rotatorio (Rotarod) y de Rogers en los grupos experimentales antes de la inducción de la HIC (pre-HIC), a las 48 horas, 96 horas y 1 mes tras la HIC. Los datos se muestran como media ± DE. Ω p < 0,05 sanas vs HIC; π p < 0,05 sham vs HIC. Abreviaturas: DE: desviación estándar; HIC: hemorragia intracerebral.

Tabla 9. Evaluación funcional de los animales utilizados en el estudio.

| | | Tiempo | Sanas (n=10) | Sham (n=10) | HIC (n=11) | p valor |
|----------------------|---|---------|---------------|----------------|---------------|--------------|
| Evaluación funcional | Test de la barra (puntos [media ± DE]) | Pre-HIC | 0,00 ± 0,00 | 0,10 ± 0,32 | 0,18 ± 0,40 | 0,383 |
| | | 48 h | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 4,64 ± 1,12 | 0,001 |
| | | 96 h | 0,20 ± 0,63 | 0,00 ± 0,00 | 3,45 ± 1,51 | 0,001 |
| | | 1 mes | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 2,18 ± 1,83 | 0,001 |
| | Test de la barra con escalón (% [media ± DE]) | Pre-HIC | 21,65 ± 6,68 | 20,16 ± 9,90 | 27,38 ± 13,88 | 0,376 |
| | | 48 h | 20,08 ± 6,91 | 23,70 ± 10,21 | 93,89 ± 15,57 | 0,001 |
| | | 96 h | 20,04 ± 9,42 | 16,01 ± 8,27 | 85,61 ± 21,70 | 0,001 |
| | | 1 mes | 16,60 ± 8,27 | 17,16 ± 7,31 | 68,53 ± 23,24 | 0,001 |
| | Rotarod (s [media ± DE]) | Pre-HIC | 99,07 ± 33,86 | 97,73 ± 29,55 | 113,76 ± 9,79 | 0,613 |
| | | 48 h | 91,63 ± 46,73 | 107,00 ± 27,01 | 51,82 ± 27,79 | 0,004 |
| | | 96 h | 98,00 ± 40,74 | 107,57 ± 17,97 | 68,88 ± 31,37 | 0,010 |
| | | 1 mes | 91,47 ± 44,59 | 89,57 ± 36,93 | 69,82 ± 29,60 | 0,223 |
| | Rogers (puntos [media ± DE]) | Pre-HIC | 0,00 ± 0,00 | 0,30 ± 0,95 | 0,00 ± 0,00 | 0,350 |
| | | 48 h | 0,60 ± 1,26 | 0,60 ± 1,26 | 3,54 ± 0,93 | 0,001 |
| | | 96 h | 0,30 ± 0,95 | 1,10 ± 1,45 | 3,64 ± 0,81 | 0,001 |
| | | 1 mes | 0,60 ± 1,26 | 0,80 ± 1,32 | 2,09 ± 1,81 | 0,065 |

Abreviaturas: DE: desviación estándar; HIC: hemorragia intracerebral. Los datos fueron comparados con el test de Kruskal-Wallis. Los valores estadísticamente significativos (p < 0,05) están en negrita.

3. CORRELACIÓN ENTRE EL VOLUMEN DE LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL Y LA EVALUACIÓN FUNCIONAL

Para estudiar el valor pronóstico de las herramientas de imagen, ultrasonidos y RM, se estudió la correlación entre el volumen de la HIC determinado por ambas técnicas y la evaluación funcional obtenida de los animales. De este modo, el volumen de la HIC a las 48 horas determinado por ultrasonidos mostró una correlación al mes con el test de la barra de $\rho=0,860$ ($p=0,001$), con el test de la barra con escalón de $\rho=0,755$ ($p=0,007$) y con el test de Rotarod de $\rho=0,909$ ($p=0,001$). Sin embargo, el test de Rogers mostró una correlación de $\rho=0,344$ ($p=0,300$) al mes de la HIC (**Figura 22**) (**Tablas 5 y 9**).

Por RM, el volumen de la HIC a las 48 horas mostró una correlación con el test de la barra de $\rho=0,884$ ($p=0,001$), con el test de la barra con escalón de $\rho=0,691$ ($p=0,019$) y con el test de Rotarod de $\rho=0,800$ ($p=0,003$) al mes de la inducción de la HIC. No obstante, el test de Rogers al mes de la HIC mostró una correlación de $\rho=0,210$ ($p=0,535$) (**Figura 22**) (**Tablas 5 y 9**).

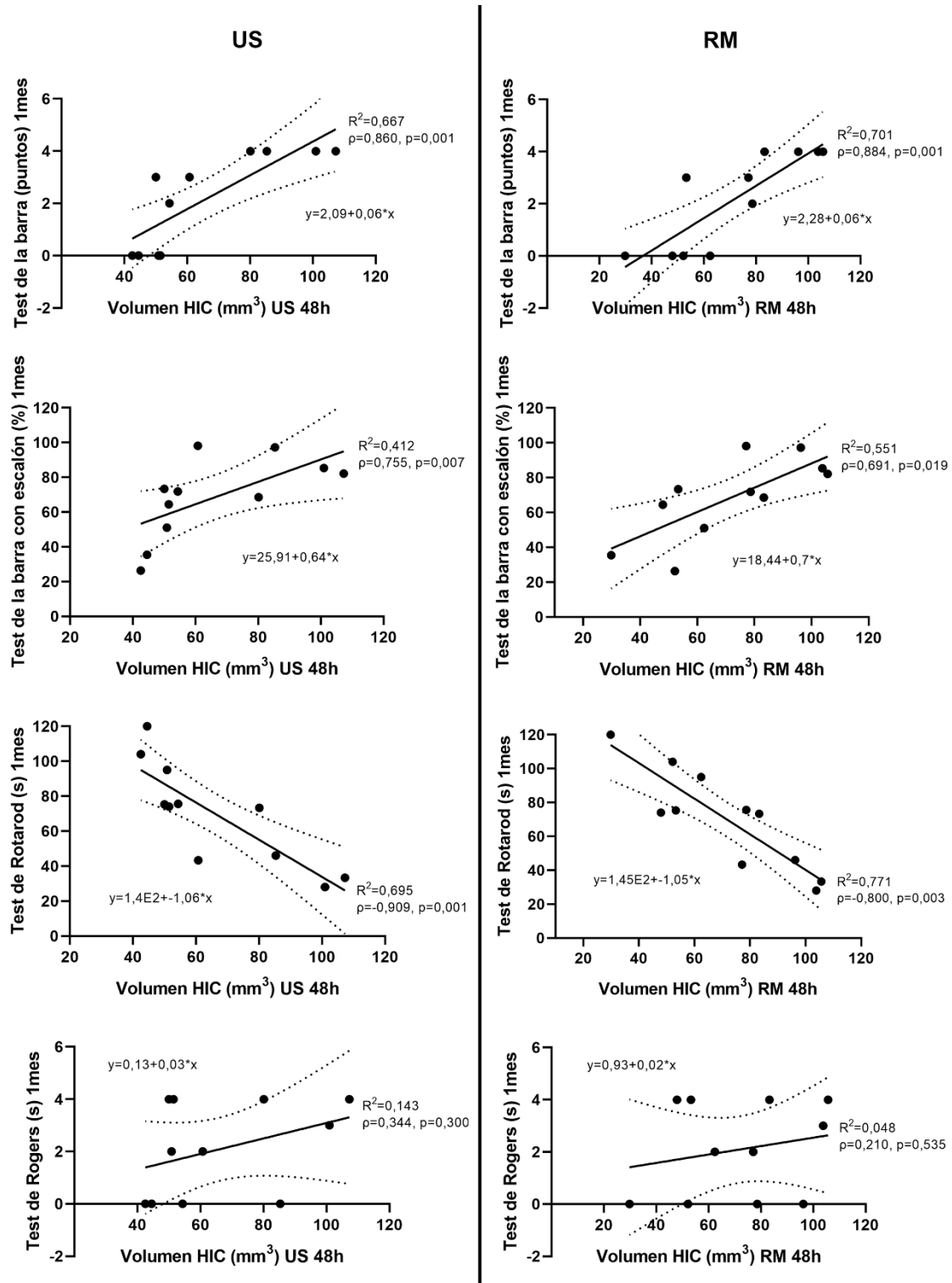


Figura 22. Correlaciones. Representación gráfica de las correlaciones entre el volumen de la HIC a las 48 horas medido por ultrasonidos (izquierda) y por RM (derecha) con los test funcionales al mes de la hemorragia. Abreviaturas: HIC: hemorragia intracerebral; RM: resonancia magnética; US: ultrasonidos.

DISCUSIÓN

El desarrollo de este apartado se va a estructurar siguiendo el mismo orden en el que se plantearon los objetivos.

1. Establecer la utilidad de los ultrasonidos en la visualización e identificación de las estructuras cerebrales en rata

Para entender las patologías cerebrovasculares es fundamental tener conocimiento acerca de la anatomía cerebral, sobre todo en los modelos animales, ya que cada especie presenta diferencias con el humano que deben ser reconocidas para interpretar correctamente los resultados y en este sentido los atlas cerebrales desempeñan un papel primordial. Específicamente, los atlas histológicos proporcionan información microscópica básica para la delimitación de las estructuras cerebrales (70). Sin embargo, estas técnicas *ex vivo* pueden mostrar artefactos o distorsiones debidas a los procesos de extracción, preparación y tinción del cerebro (36,70). Estos problemas serían solucionados con las técnicas *in vivo* no invasivas como la RM, que permiten realizar estudios anatómicos de forma repetida y manteniendo la estructura original (70). La capacidad de la RM para recoger información anatómica, patológica y funcional en los modelos *in vivo* con una alta resolución espacial sin que sean expuestos a radiaciones ionizantes potencialmente dañinas (34–36,70), la han convertido en la herramienta de referencia en los estudios preclínicos. No obstante, también cuenta con importantes desventajas como son el tiempo, la tolerancia, la disponibilidad y el alto coste (5,21,23). Estas limitaciones podrían ser resueltas con los ultrasonidos que permiten revelar contornos anatómicos (44) y son además, una herramienta rápida, no invasiva, reproducible, bien tolerada y económica que puede ser realizada sin necesidad del desplazamiento del sujeto (19,28,29).

Estudios previos llevados a cabo en animales sanos, han utilizado los ultrasonidos funcionales como método de neuroimagen para la obtención de información sobre los cambios en la actividad cerebral a través de variaciones en el flujo sanguíneo (71–73). Otros trabajos han sido capaces de visualizar regiones cerebrales profundas y la vasculatura cerebral de ratas usando la imagen fotoacústica combinada con

ultrasonidos de alta frecuencia (74). Sin embargo, en nuestro conocimiento, no hay trabajos preclínicos que utilicen los ultrasonidos convencionales para el estudio de la anatomía cerebral. Por ello, en este trabajo se pretendió analizar la capacidad de los ultrasonidos en modo B para visualizar las estructuras cerebrales en ratas. Al abordar este aspecto, se tuvo en cuenta la limitación de esta herramienta en relación a las estructuras óseas. Dicha limitación se debe a que el hueso es un importante atenuador, ya que absorbe las ondas de ultrasonidos, produce refracción y que parte de los ultrasonidos se reflejen (reflexión) en su superficie y no penetren (46), disminuyendo la sensibilidad y produciendo aberraciones u anomalías en las imágenes (74), lo que complica la observación del cerebro. Para evitar la reflexión de los ultrasonidos por el hueso, estudios previos combinaron los ultrasonidos de alta frecuencia y la fotoacústica en la fosa temporal y occipital del cráneo, observando así el parénquima cerebral de ratas (74). Sin embargo, dichos abordajes limitan la observación a unas zonas específicas del cerebro y no permiten la visualización completa del mismo. Por este motivo, en el presente trabajo se aplicaron los ultrasonidos sobre una craneotomía total y una craneotomía delimitada realizadas en el hueso parietal. En relación a la craneotomía total, se identificaron diversas estructuras como la corteza cerebral, el estriado, los ventrículos laterales, el tercer ventrículo, el acueducto cerebral y las cisternas subaracnoideas. Cuando los ultrasonidos se aplicaron a través de la craneotomía delimitada, la visualización de las estructuras fue menor identificándose solamente los ventrículos laterales y las cisternas subaracnoideas. Otros autores, para resolver el problema de la atenuación de las imágenes por el hueso, llevaron a cabo en sus estudios una disminución del grosor del cráneo de forma quirúrgica (72,75) o, lo retiraron directamente (76). Sin embargo, algunos autores han reportado que la craneotomía puede inducir cambios vasculares y morfológicos en el cerebro de la rata (72). Teniendo en cuenta estos hallazgos, la obtención de las imágenes anatómicas por ultrasonidos en el presente trabajo se llevó a cabo, no sólo a través de una craneotomía total y una craneotomía delimitada, sino también a través de otras 2 ventanas transcraneales. En concreto, los ultrasonidos se aplicaron sobre el cráneo y directamente sobre la piel.

De esta forma, al emplear los ultrasonidos sobre el cráneo se observaron, al igual que sobre la craneotomía delimitada, los ventrículos laterales y las cisternas

subaracnoideas, sugiriendo que ésta última no representa un aporte sustancial para la identificación de las estructuras. Finalmente, la aplicación de los ultrasonidos directamente sobre la piel permitió observar únicamente las cisternas subaracnoideas. Estas cisternas están llenas de líquido cefalorraquídeo, conectan el sistema ventricular y el espacio subaracnoideo, proporcionando vías naturales para nervios craneales y vasos sanguíneos (77,78). Se continúan unas con otras y se clasifican en cisterna cuadrigeminal, ambiens e interpeduncular. Concretamente en la parte superior del mesencéfalo se encuentra la cisterna cuadrigeminal, que continua con la cisterna ambiens, la cual se extiende hacia el cerebro y se continua con la cisterna interpeduncular (79). Cabe señalar que, en condiciones patológicas, el líquido cefalorraquídeo puede circular por vías compensatorias entre los ventrículos y las cisternas (77), lo que destaca la importancia de esta estructura en las enfermedades cerebrovasculares. Por tanto, la visualización de las cisternas mediante este abordaje a través de la piel, prueba la capacidad de los ultrasonidos para distinguir entre las cavidades llenas de líquido y el tejido cerebral de la rata sin necesidad de retirar el cráneo. Este aspecto confiere un gran potencial traslacional a los ultrasonidos, dado que permite mimetizar la situación clínica mediante la aplicación no invasiva de los ultrasonidos en la piel. Por otro lado, estos resultados muestran que la ampliación de la ventana transcraneal mediante la eliminación de los obstáculos (concretamente del hueso parietal), permite visualizar un mayor número de estructuras cerebrales y con mayor claridad, pero con mayor invasividad. De este modo, el uso de los ultrasonidos puede adaptarse a las necesidades experimentales específicas de cada estudio preclínico. El presente trabajo ha demostrado la validez de los ultrasonidos en la identificación de las estructuras cerebrales en la rata, lo que ha permitido elaborar un atlas cerebral con diferentes abordajes transcraneales estudiados por ultrasonidos. Este atlas presenta un gran potencial para la aplicación de los ultrasonidos en el estudio de las patologías cerebrovasculares en roedores.

2. Evaluar en un modelo animal de hemorragia intracerebral la utilidad de los ultrasonidos en el estudio de la lesión cerebral (volumen de hemorragia y desplazamiento de estructuras cerebrales) comparando los datos obtenidos con la resonancia magnética

Una vez demostrada la capacidad de los ultrasonidos para estudiar anatómicamente el cerebro de ratas *in vivo*, se evaluó la utilidad de esta herramienta para analizar la lesión cerebral (volumen de lesión y desplazamiento de estructuras cerebrales). Para ello, se compararon los resultados obtenidos por ultrasonidos con los obtenidos mediante RM, técnica más utilizada en modelos animales. En estudios previos, la señal de la HIC por RM en imágenes T2, ha sido descrita a las pocas horas, 0-12 horas, como hipointensa con algunos focos de isointensidad o ligera hiperintensidad (38-41), correspondientes a áreas edematosas (39). Esta hipointensidad cambia a hiperintensidad después de 24-72 horas debido a la degeneración de los eritrocitos y a los restos celulares, que están rodeados por un anillo hipointenso correspondiente a los neutrófilos y macrófagos (38,39,41). En concordancia con dichos estudios, en este trabajo se observó una lesión hiperintensa a las 48 horas, aunque el anillo de hipointensidad no era tan claro en muchas de las imágenes. La ausencia de visualización de este anillo en el presente trabajo podría deberse a que la agregación de neutrófilos es máxima a las 48 horas pero, a partir de ese momento, se dispersan hacia el centro de la lesión para ser sustituidos por macrófagos, dando lugar a un anillo menos definido (39). Estudios previos han observado que a los 7 días la lesión presenta un anillo hipointenso de macrófagos y continúa siendo hiper/isointensa debido a los restos celulares y a los espacios llenos de líquido (38,39,41). Es en este momento cuando se ha observado que la hemorragia en ratas comienza a resolverse produciéndose también un agrandamiento de los ventrículos laterales (39). Desde las 2-3 semanas y hasta los 28 días, el lugar del hematoma queda ocupado por una cavidad llena de líquido que da lugar a una señal iso/hiperintensa rodeada por un anillo hipointenso (macrófagos) con áreas oscuras correspondientes a zonas de necrosis y cavitaciones (39,41,42), equivalentes con las imágenes obtenidas en este trabajo a 1 mes. En el presente estudio

de acuerdo con trabajos anteriores (39), también se ha podido observar una disminución del volumen de la HIC con el tiempo.

Sin embargo, debido a las desventajas que presenta la RM se deberían buscar alternativas a la misma. Por este motivo, se estudió si los ultrasonidos en modo B, en base a sus múltiples ventajas frente a la RM, podrían ser utilizados como alternativa en la evaluación de la HIC. Para ello, primero se debe verificar la seguridad de esta herramienta. En este sentido, datos previos de nuestro grupo de investigación ya demostraron la seguridad de los mismos (80). Además, otros autores observaron que el uso combinado de los ultrasonidos con fines diagnósticos junto con microburbujas, no causaba daño adicional en ratas con HIC ya que no tuvo efectos significativos en el tamaño de la hemorragia, la extensión del edema cerebral o la muerte celular analizados en los cortes histológicos (81). Asimismo, otros autores no describieron la formación de hemorragias secundarias en ratas con HIC al utilizar el Doppler transcraneal (48).

A pesar de ser una herramienta que ha demostrado su seguridad, ha sido infravalorada en la evaluación de la HIC. De hecho, los primeros estudios en este aspecto realizados en un modelo animal, son de la década de los 80. El primer estudio en evaluar la HIC con ultrasonidos en un modelo animal fue el realizado por Enzmann DR et al. en 1981. En este trabajo, se inyectó sangre venosa en el lóbulo parietal de perros mediante una craneotomía, identificando una lesión hemorrágica altamente ecogénica que representaba la HIC aguda (49). Entre los días 9 y 13, observaron la formación de una red de colágeno y macrófagos que daría lugar a un anillo hipodenso alrededor del hematoma que posteriormente se estrecha por el aumento de la cápsula de tejido conectivo (49). Coincidiendo con estos estudios, pero utilizando un ecógrafo más avanzado, en la presente investigación se ha identificado la HIC como una masa hiperecogénica a las 48 horas que aparecía menos definida al cabo de 1 mes debido a su transformación en una señal más hipoeecogénica.

Una vez constatado que ambas técnicas de imagen, ultrasonidos y RM, son útiles para la evaluación de la HIC en un modelo animal en ratas, se compararon los resultados entre ambas técnicas. En este estudio, los ultrasonidos y la RM detectaron un volumen

de HIC muy similar en estadios tempranos (48 horas), con una correlación significativa entre ambas técnicas. Esta correlación significativa se mantuvo en los estadios tardíos (1 mes), aunque fue inferior a la obtenida a las 48 horas de la hemorragia. Esta menor correlación que se observa en el estadio tardío, podría explicarse por los siguientes motivos: la disminución del volumen de hemorragia con el tiempo (82,83); la resolución del hematoma como una cavidad llena de líquido o en forma de hendidura (37,83); el estrechamiento del anillo hipodenso que se muestra en el último estadio en la ecografía (24) y, la heterogeneidad obtenida en la señal de la RM que podrían dificultar la visualización y la medición en este tiempo. Los resultados de este estudio demuestran que los ultrasonidos son útiles en la monitorización de la HIC en ratas, con una precisión similar a la obtenida con la RM. En este sentido, son necesarios más estudios preclínicos que reproduzcan estos hallazgos, para poner de manifiesto el potencial de esta herramienta y así poder implementarla en la práctica clínica habitual.

En paralelo al estudio del volumen de la HIC, se llevó a cabo el análisis del desplazamiento de las estructuras cerebrales como consecuencia de la misma. Otros autores han demostrado que, durante la fase aguda, la hemorragia provoca el desplazamiento de las estructuras adyacentes debido al efecto de masa (84). Estos desplazamientos pueden comprimir o romper otras arterias, causando infartos o hemorragias secundarias (1,85). En fases tardías, la atrofia cerebral tiene lugar junto con la atrofia del caudado y el agrandamiento del ventrículo ipsilateral (86,87). En pacientes el desplazamiento de la línea media es un factor pronóstico muy importante (88). Este desplazamiento se determina midiendo la distancia entre el tercer ventrículo y el cráneo en ambos hemisferios cerebrales (89). Sin embargo, en este trabajo el tercer ventrículo no ha podido ser visualizado a través del abordaje menos invasivo que simula la situación clínica, es decir, colocando el transductor directamente sobre la piel. Es por esto, que fue necesario plantear nuevos marcadores que reflejen el desplazamiento que sufren las estructuras cerebrales como consecuencia del efecto de masa que produce la hemorragia. De esta manera, dada la anteriormente demostrada capacidad de los ultrasonidos para identificar como estructura principal a las cisternas subaracnoideas, en este trabajo se definió la ratio de desplazamiento de las cisternas (RDC) como indicador del desplazamiento de las cisternas subaracnoideas con respecto a la

duramadre. Así a las 48 horas, se observó en el lado ipsilateral de la lesión, un desplazamiento de las cisternas que podría explicarse como una consecuencia tardía del efecto de masa de la hemorragia. Sin embargo, el desplazamiento de estas estructuras se revirtió al mes de la HIC, probablemente debido a la resolución de la misma. Al comparar de nuevo los resultados entre las dos técnicas de imagen, en la medición de la distancia entre las cisternas subaracnoideas y la duramadre no se observó una correlación significativa en las 48 horas posteriores a la inducción de la HIC. Esto podría explicarse nuevamente como una consecuencia del efecto de masa de la HIC, el cual dificultaría la visualización de las estructuras y complicaría a su vez la medición de forma precisa. Sin embargo, al mes se pudo observar una alta correlación entre las mediciones de la distancia de las cisternas subaracnoideas a la duramadre entre los ultrasonidos y la RM. Este resultado pone de nuevo de manifiesto la utilidad de los ultrasonidos en la evaluación del desplazamiento de las estructuras cerebrales como consecuencia de la HIC.

3. Valorar la utilidad de los ultrasonidos en la monitorización de los cambios evolutivos en el volumen de la hemorragia intracerebral y en el desplazamiento de las estructuras cerebrales

Tras demostrarse la utilidad de los ultrasonidos en la evaluación de la HIC, con una precisión equiparable a la RM, en este trabajo se analizó el potencial de los ultrasonidos en el seguimiento de la HIC para su posible implementación en la práctica preclínica y, posteriormente, en la clínica.

Como se ha comentado previamente, los trabajos en modelos animales que han estudiado la monitorización de la HIC por ultrasonidos son de los años 80. Enzmann DR et al. identificó la señal hemorrágica como hiperecogénica en la fase aguda (49). Esta señal de la hemorragia aguda fue más detallada en 1984 por Lillehei KO et al. cuando se especificó concretamente su hiperecogenicidad entre 16 y 23 segundos tras la inyección de sangre autóloga en perros (50). Enzmann DR et al. también demostraron que la señal

de la hemorragia se volvía hipoecogénica con bordes ecogénicos a los 3-4 días debido a la pérdida de integridad de los eritrocitos (49). En concordancia con estos estudios, en el presente trabajo en el seguimiento de la HIC se ha observado la señal hemorrágica hiperecogénica a las 5 horas, 48 horas y 96 horas. Es alrededor de los 9 días cuando otros estudios han podido observar la disminución del volumen de la hemorragia (49). En este trabajo el volumen de la HIC se detectó a las 5 horas, permaneció estable las primeras 96 horas y disminuyó significativamente al mes. Finalmente, entre los días 9 y 13, otros autores han descrito la formación de un anillo hipointenso alrededor del hematoma (49). Sin embargo, en el estudio presente la señal hemorrágica sólo pudo definirse como una señal hipoecogénica al cabo de 1 mes.

En relación al seguimiento en el desplazamiento de las cisternas subaracnoideas producido por el efecto de masa, se tuvo de nuevo en cuenta la RDC. En este estudio a las 5 horas de la inducción de la HIC, no se observó ningún desplazamiento de las cisternas con respecto a la duramadre. Sin embargo, a las 48-96 horas se observó un aumento de la distancia entre las cisternas subaracnoideas y la duramadre en el lado ipsilateral a la lesión, debido a un efecto tardío del efecto de masa de la HIC. No obstante, al mes de la HIC el desplazamiento ya no fue observado en los animales.

4. Analizar la correlación del volumen de la hemorragia intracerebral, medido por ultrasonidos y por resonancia magnética, con la evaluación funcional

El daño cerebral producido por la HIC va a dar lugar a unos signos y síntomas específicos de la localización de la lesión, por ello, deben utilizarse test de evaluación que permitan valorar el deterioro funcional. Se ha demostrado que el modelo de HIC inducido por colagenasa induce déficit neurológicos graves, siendo importante evaluar la función sensitivo-motora (90). Entre los test de evaluación funcional, el de la barra, la barra con escalón, el cilindro rotatorio (Rotarod) y el de Rogers han demostrado ser capaces de evaluar la función neurológica en modelos de HIC en roedores (90,91). En el

presente trabajo, los animales sometidos a la HIC mostraron peor equilibrio y coordinación motora a la hora de atravesar las vigas de madera en el test de la barra y la barra con escalón, y permanecieron menos tiempo en el cilindro rotatorio (Rotarod) que los animales control. También en el test de Rogers, los animales con HIC mostraron una peor evaluación funcional que los animales control. De esta forma, se demuestra que los test realizados en este estudio son capaces de proporcionar una medida objetiva del deterioro funcional de los animales tras una HIC.

Una vez constatado que el modelo de inyección de colagenasa en ratas induce un empeoramiento de la función motora, se evaluó si estos déficits funcionales se correlacionaban con el volumen de la HIC determinado tanto por ultrasonidos como por RM, lo que proporcionaría información relevante sobre la evolución de los animales. Los resultados del presente trabajo mostraron que, en ambas técnicas de imagen, existía una elevada correlación positiva entre el volumen de la lesión a las 48 horas y el déficit motor al mes de la HIC. En esta línea, otros trabajos han hallado una correlación significativa entre el edema en cortes histológicos cerebrales y los déficit sensitivo-motores (92). Pero a nuestro conocimiento, no hay estudios preclínicos publicados que analicen la correlación entre el volumen de la HIC y la evaluación funcional. Este tipo de análisis sí se han llevado a cabo en los pacientes, donde se ha demostrado que el volumen de hemorragia medido por dúplex transcraneal es un predictor de mal pronóstico (27). En pacientes, otro factor que juega un papel importante en el pronóstico es la línea media (27). En este sentido, el desplazamiento de la línea media es conocido como un factor de mal pronóstico en pacientes tras la HIC (88). Como se ha comentado anteriormente, para determinar este desplazamiento se debe medir la distancia entre el tercer ventrículo y el cráneo (89). Sin embargo, en este trabajo no fue posible localizar el tercer ventrículo por ultrasonidos cuando se aplicaban sobre la piel. Por ello, sería interesante analizar en futuros estudios preclínicos si los déficits funcionales se podrían correlacionar con el desplazamiento de las estructuras cerebrales.

Los ultrasonidos son una herramienta con un enorme potencial para visualizar las estructuras cerebrales y monitorizar la HIC en los modelos preclínicos, sin embargo, no están exentos de limitaciones. En este sentido, aunque los ultrasonidos permiten observar el efecto de masa como consecuencia de la HIC, no identifican componentes importantes de la lesión como el edema (49). El edema puede visualizarse por RM, pero incluso por esta técnica, no siempre es posible su identificación (41), lo que podría indicar que también es una variable que presenta cierta dificultad a la hora de estudiarse por esta herramienta. En este trabajo, así como en otros, el edema circundante no ha podido visualizarse por ultrasonidos (49), por lo que no se tuvo en cuenta su análisis en los estudios por RM. Aparte de esta desventaja referente al edema, los ultrasonidos presentan limitaciones en la adquisición de imágenes debido a la barrera que representan las estructuras óseas (29). Otra de las limitaciones es que son una herramienta operador-dependiente que requiere de personal bien entrenado para obtener imágenes repetidas, precisas y de buena calidad (29). Aunque esta técnica permite obtener una gran cantidad de información relevante, su complejidad puede llevar a imprecisiones si no se cuenta con la formación adecuada. No obstante, esta limitación es relativamente fácil de solventar con un entrenamiento y supervisión llevados a cabo por personal cualificado en la materia.

A modo de corolario se podría decir que el desarrollo tecnológico actual posibilita la incorporación de técnicas tradicionalmente usadas en la práctica clínica a las investigaciones preclínicas con enfoques traslacionales que proporcionen nuevos conocimientos con aplicaciones tanto diagnósticas como terapéuticas. En esta línea, se planteó un primer trabajo que incorporó el estudio ultrasonográfico para la descripción de la anatomía cerebral de la rata y que demostró su capacidad para la monitorización de la HIC en un modelo animal experimental.

Al tratarse de una técnica más accesible, rápida y barata que las que se utilizan actualmente, podría incorporarse en los laboratorios experimentales generando mayor autonomía, aunque precisa de una validación prospectiva. Los futuros estudios deberían continuar con la investigación con ultrasonidos para evaluar las distintas fases de la hemorragia en el modelo animal, sus cambios evolutivos y las alteraciones estructurales,

como consecuencia de la misma. Además, podría ser de gran utilidad en la identificación de nuevos parámetros de desplazamiento de las estructuras cerebrales que se asemejen a lo que ocurre con el desplazamiento de la línea media en la HIC de humanos.

Siendo la “traslacionalidad” el objetivo principal de este tipo de investigaciones, debemos comentar que de manera paralela se ha realizado un estudio clínico, con diseño similar, para la monitorización de la HIC en pacientes que permitiría, en la misma Unidad de Ictus, realizar su diagnóstico y seguimiento en la cabecera de los mismos, sin necesidad de ser trasladados a la sala de TC o RM y cuyos resultados serán publicados próximamente, así como en una nueva tesis doctoral. Se pretende que la investigación preclínica y clínica avancen como un continuum que posibilite aumentar el conocimiento del comportamiento de la HIC mediante una línea de investigación consolidada.

Consideramos que los resultados del estudio que aquí se presentan permiten sentar las bases para incorporar los ultrasonidos como una herramienta útil, tanto para la investigación preclínica como para el seguimiento de los pacientes con HIC.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo de tesis doctoral son las siguientes:

1. Los ultrasonidos demostraron utilidad en la visualización e identificación de las estructuras cerebrales en la rata. A través de la craneotomía total se observaron la corteza cerebral, el estriado, los ventrículos laterales, el tercer ventrículo, el acueducto cerebral y las cisternas subaracnoideas; a través de la craneotomía delimitada y el cráneo se observaron los ventrículos laterales y las cisternas subaracnoideas y, a través de la piel se observaron las cisternas subaracnoideas. Esto ha permitido la elaboración de un atlas anatómico en el que la resolución de las imágenes y las estructuras identificadas se incrementan a medida que se retiran las barreras de la ventana transcraneal.
2. Los ultrasonidos permiten la evaluación del volumen de la hemorragia y del desplazamiento de las estructuras cerebrales como consecuencia de la misma, con una precisión equiparable a la resonancia magnética.
3. Los ultrasonidos permiten monitorizar los cambios evolutivos que se producen en el volumen de la hemorragia intracerebral y el desplazamiento de las estructuras cerebrales.
4. El volumen de hemorragia, medido por ultrasonidos y resonancia magnética, presentó una excelente correlación con la evolución funcional demostrando resultados equiparables entre ambas técnicas de imagen.

BIBLIOGRAFÍA

1. Díez Tejedor E, Egido Herrero JA, Alonso de Leciana M, Martínez Vila E, Comité Ad Hoc del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares S. Guía oficial para el diagnóstico y tratamiento del ictus. Guías oficiales de la Sociedad Española de Neurología. Sociedad Española de Neurología; 2004. 265 p.
2. Hankey GJ. Stroke. *Lancet*. 2017;389(10069):641–54.
3. World Health Organization. Neurological disorders: a public health approach. World Health Organization. Genève; 2006. 1–232 p.
4. Ariesen MJ, Claus SP, Rinkel GJE, Algra A. Risk Factors for Intracerebral Hemorrhage in the General Population A Systematic Review. *Stroke*. 2003;34(8):2060–5.
5. Dastur CK, Yu W. Current management of spontaneous intracerebral haemorrhage. *Stroke Vasc Neurol*. 2017;2(1):21–9.
6. Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med*. 2001;344(19):1450–60.
7. Campbell BCV, Khatiri P. Stroke. *Lancet*. 2020;396(10244):129–42.
8. Steiner T, Al-Shahi Salman R, Beer R, Christensen H, Cordonnier C, Csiba L, et al. European Stroke Organisation (ESO) guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage. *Int J Stroke*. 2014;9(7):840–55.
9. Muñoz-Rivas N, Méndez-Bailón M, Hernández-Barrera V, de Miguel-Yanes JM, Jimenez-Garcia R, Esteban-Hernández J, et al. Type 2 Diabetes and Hemorrhagic Stroke : A Population-Based Study in Spain from 2003 to 2012. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016;25(6):1431–43.
10. Pinho J, Costa AS, Araújo JM, Amorim JM, Ferreira C. Intracerebral hemorrhage outcome: A comprehensive update. *J Neurol Sci*. 2019;398:54–66.
11. Hostettler IC, Seiffge DJ, Werring DJ. Intracerebral hemorrhage: an update on diagnosis and treatment. *Expert Rev Neurother*. 2019;19(7):679–94.
12. Tatlisumak T, Cucchiara B, Kuroda S, Kasner SE, Putaala J. Nontraumatic intracerebral haemorrhage in young adults. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(4):237–50.
13. Zheng H, Chen C, Zhang J, Hu Z. Mechanism and Therapy of Brain Edema after Intracerebral Hemorrhage. *Cerebrovasc Dis*. 2016;42(3–4):155–69.
14. Wilkinson DA, Pandey AS, Thompson BG, Keep RF, Hua Y, Xi G. Injury mechanisms in acute intracerebral hemorrhage. *Neuropharmacology*. 2018;134(Pt B):240–8.
15. Senn R, Elkind MSV, Montaner J, Christ-Crain M, Katan M. Potential role of blood biomarkers in the management of nontraumatic intracerebral hemorrhage. *Cerebrovasc Dis*. 2014;38(6):395–409.
16. Brunswick AS, Hwang BY, Appelboom G, Hwang RY, Piazza MA, Connolly ES, et al. Serum

- biomarkers of spontaneous intracerebral hemorrhage induced secondary brain injury. *J Neurol Sci.* 2012;321(1–2):1–10.
17. Qureshi AI, Mendelow AD, Hanley DF. Intracerebral haemorrhage. *Lancet.* 2009;373(9675):1632–44.
 18. Siaw-Debrah F, Nyanzu M, Ni H, Lin X, Xu Z, Ruan L, et al. Preclinical Studies and Translational Applications of Intracerebral Hemorrhage. *Biomed Res Int.* 2017;2017(5135429):1–18.
 19. Blanco P, Do Pico JL, Matteoda M. Intracranial hematoma and midline shift detected by transcranial color-coded duplex sonography. *Am J Emerg Med.* 2015;33(11):1715.e5-1715.e7.
 20. Aguilar MI, Brott TG. Update in Intracerebral Hemorrhage. *Neurohospitalist.* 2011;1(3):148–59.
 21. Hemphill JC 3rd, Greenberg SM, Anderson CS, Becker K, Bendok BR, Cushman M, et al. Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2015;46(7):2032–60.
 22. Li Z, You M, Long C, Bi R, Xu H, He Q, et al. Hematoma Expansion in Intracerebral Hemorrhage: An Update on Prediction and Treatment. *Front Neurol.* 2020;11:1–13.
 23. Lin JB, Phillips EH, Riggins TE, Sangha GS, Chakraborty S, Lee JY, et al. Imaging of small animal peripheral artery disease models: Recent advancements and translational potential. *Int J Mol Sci.* 2015;16(5):11131–77.
 24. Seidel G, Kaps M, Dorndorf W. Transcranial color-coded duplex sonography of intracerebral hematomas in adults. *Stroke.* 1993;24(10):1519–27.
 25. Kern R, Kablau M, Sallustio F, Fatar M, Stroick M, Hennerici MG, et al. Improved detection of intracerebral hemorrhage with transcranial ultrasound perfusion imaging. *Cerebrovasc Dis.* 2008;26(3):277–83.
 26. Pérez ES, Delgado-Mederos R, Rubiera M, Delgado P, Ribó M, Maisterra O, et al. Transcranial duplex sonography for monitoring hyperacute intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2009;40(3):987–90.
 27. Camps-Renom P, Méndez J, Granell E, Casoni F, Prats-Sánchez L, Martínez-Domeño A, et al. Transcranial duplex sonography predicts outcome following an intracerebral hemorrhage. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2017;38(8):1543–9.
 28. Meyer-Wiethe K, Sallustio F, Kern R. Diagnosis of intracerebral hemorrhage with transcranial ultrasound. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27(suppl. 2):40–7.
 29. Coatney RW. Ultrasound imaging: Principles and applications in rodent research. *ILAR J.*

- 2001;42(3):233–47.
30. Bai Q, Sheng Z, Liu Y, Zhang R, Yong VW, Xue M. Intracerebral haemorrhage: From clinical settings to animal models. *Stroke Vasc Neurol*. 2020;5(4):388–95.
 31. MacLellan CL, Paquette R, Colbourne F. A critical appraisal of experimental intracerebral hemorrhage research. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(4):612–27.
 32. Chen Y, Chang J, Wei J, Feng M, Wang R. Assessing the Evolution of Intracranial Hematomas by using Animal Models: A Review of the Progress and the Challenges. *Metab Brain Dis*. 2021;36(8):2205–14.
 33. Rehni AK, Liu A, Perez-Pinzon MA, Dave KR. Diabetic aggravation of stroke and animal models. *Exp Neurol*. 2017;292:63–79.
 34. Denic A, Macura SI, Mishra P, Gamez JD, Rodriguez M, Pirko I. MRI in Rodent Models of Brain Disorders. *Neurotherapeutics*. 2011;8(1):3–18.
 35. Weber R, Ramos-Cabrer P, Hoehn M. Present status of magnetic resonance imaging and spectroscopy in animal stroke models. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26(5):591–604.
 36. Welniak-Kaminska M, Fiedorowicz M, Orzel J, Bogorodzki P, Modlinska K, Stryjek R, et al. Volumes of brain structures in captive wild-type and laboratory rats: 7T magnetic resonance in vivo automatic atlas-based study. *PLoS One*. 2019;14(4):1–18.
 37. Smith EE, Rosand J, Greenberg SM. Hemorrhagic Stroke. *Neuroimaging Clin N Am*. 2005;15(2):259–72.
 38. Belayev L, Obenaus A, Zhao W, Saul I, Busto R, Wu C, et al. Experimental intracerebral hematoma in the rat: Characterization by sequential magnetic resonance imaging, behavior, and histopathology. Effect of albumin therapy. *Brain Res*. 2007;1157(1):146–55.
 39. Del Bigio MR, Yan H-J, Buist R, Peeling J. Experimental Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Stroke*. 1996;27(12):2312–20.
 40. Wang M, Hong X, Chang CF, Li Q, Ma B, Zhang H, et al. Simultaneous detection and separation of hyperacute intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia using amide proton transfer (APT) MRI. *Magn Reson Med*. 2015;74(1):42–50.
 41. Knight RA, Han Y, Nagaraja TN, Whitton P, Ding J, Chopp M, et al. Temporal MRI assessment of intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*. 2014;39(9):2596–602.
 42. Liu Y, Yang S, Cai E, Lin L, Zeng P, Nie B, et al. Functions of lactate in the brain of rat with intracerebral hemorrhage evaluated with MRI/MRS and in vitro approaches. *CNS Neurosci Ther*. 2020;26(10):1031–44.
 43. Irimia P, Segura T, Serena J, Moltó J, Sociedad española de Neurosonología S. *Neurosonología. Aplicaciones diagnósticas para la práctica clínica*. 1st ed. España:

- Editorial Médica Panamericana; 2011. 370 p.
44. Maresca D, Anupama L, Abedi M, Bar-Zion A, Farhadi A, Lu G, et al. Biomolecular Ultrasound and Sonogenetics. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2018;229–52.
 45. Díaz-Rodríguez N, Garrido-Chamorro RP, Castellano-Alarcón J. Ecografía: principios físicos, ecógrafos y lenguaje ecográfico. *Semergen.* 2007;33(7):362–9.
 46. Shriki J. Ultrasound physics. *Crit Care Clin.* 2014;30(1):1–24.
 47. Fan CH, Liu HL, Huang CY, Ma YJ, Yen TC, Yeh CK. Detection of Intracerebral Hemorrhage and Transient Blood-Supply Shortage in Focused-Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Disruption by Ultrasound Imaging. *Ultrasound Med Biol.* 2012;38(8):1372–82.
 48. Ke Z, Ying M, Li L, Zhang S, Tong KY. Evaluation of transcranial Doppler flow velocity changes in intracerebral hemorrhage rats using ultrasonography. *J Neurosci Methods.* 2012;210(2):272–80.
 49. Enzmann DR, Britt RH, Lyons BE, Buxton JL, Wilson DA. Natural history of experimental intracerebral hemorrhage: sonography, computed tomography and neuropathology. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1981;2(6):517–26.
 50. Lillehei KO, Chandler WF, Knake JE. Real time ultrasound characteristics of the acute intracerebral hemorrhage as studied in the canine model. *Neurosurgery.* 1984;14(1):48–51.
 51. Participants HSAI (HEADS) R. Basic and translational research in intracerebral hemorrhage: Limitations, priorities, and recommendations. *Stroke.* 2018;49(5):1308–14.
 52. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke.* 2009;40(6):2244–50.
 53. Lapchak PA, Zhang JH, Noble-Haeusslein LJ. RIGOR Guidelines: Escalating STAIR and STEPS for Effective Translational Research. *Transl Stroke Res.* 2013;4(3):279–85.
 54. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG, National Centre for the Replacement Refinement and Reduction of Animals in Research. Animal research: reporting in vivo experiments--the ARRIVE guidelines. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(4):991–3.
 55. Britton GL, Kim H, Kee PH, Aronowski J, Holland CK, McPherson DD, et al. In Vivo Therapeutic Gas Delivery for Neuroprotection with Echogenic Liposomes. *Circulation.* 2010;122(16):1578–87.
 56. Carter RJ, Morton J, Dunnett SB. Motor Coordination and Balance in Rodents. *Curr Protoc Neurosci.* 2001;15(1):1–14.
 57. Schallert T, Woodlee M, Fleming S. Disentangling multiple types of recovery from brain

- injury. *Pharmacol Cereb Ischemia*. 2002;201–216.
58. Otero L, Zurita M, Bonilla C, Aguayo C, Vela A, Rico MA, et al. Late transplantation of allogeneic bone marrow stromal cells improves neurologic deficits subsequent to intracerebral hemorrhage. *Cytotherapy*. 2011;13(5):562–71.
 59. Boltze J, Lukomska B, Jolkkonen J, Irbi M. Mesenchymal stromal cells in stroke : improvement of motor recovery or functional compensation? *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34(8):1420–1.
 60. Zarruk JG, García-Yébenes I, Romera VG, Ballesteros I, Moraga A, Cuartero MI, et al. Neurological tests for functional outcome assessment in rodent models of ischaemic stroke. *Rev Neurol*. 2011;53(10):607–18.
 61. Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, Vallejo-Cremades MT, Fuentes B, Cerdán S, et al. Effects of intravenous administration of allogenic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(1):11.
 62. Ramos-Cejudo J, Gutierrez-Fernandez M, Otero-Ortega L, Rodriguez-Frutos B, Fuentes B, Vallejo-Cremades MT, et al. Brain-derived neurotrophic factor administration mediated oligodendrocyte differentiation and myelin formation in subcortical ischemic stroke. *Stroke*. 2015;46(1):221–8.
 63. Cenci MA, Lundblad M. Utility of 6-hydroxydopamine lesioned rats in the preclinical screening of novel treatments for parkinson disease. In: *Animal Models of Movement Disorders*. Elsevier Inc.; 2005. p. 193–208.
 64. Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB. Correlation Between Motor Impairment and Infarct Volume After Permanent and Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. *Stroke*. 1997;28(10):2060–6.
 65. Swanson LW. Brain maps 4.0—Structure of the rat brain: An open access atlas with global nervous system nomenclature ontology and flatmaps. *J Comp Neurol*. 2018;526(6):935–43.
 66. Paxinos G. *The Rat Nervous System*. 4th ed. Londres: Elsevier Inc.; 2015. 1–1309 p.
 67. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th, illustr ed. Londres: Elsevier Inc.; 2009. 340 p.
 68. Zhang ZL, Song Y, Li F, Huang QB. Bimodal Distribution of Nuclear Factor- κ B Activation and Expression of Subunits in Experimental Models of Intracerebral Hemorrhage In Vivo. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2019;28(3):821–9.
 69. Kothari RU, Brott T, Broderick JP, Barsan WG, Sauerbeck LR, Zuccarello M, et al. The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes. *Stroke*. 1996;27(8):1304–5.

70. Hess A, Hinz R, Keliris GA, Boehm-Sturm P. On the Usage of Brain Atlases in Neuroimaging Research. *Mol Imaging Biol.* 2018;20(5):742–9.
71. Macé E, Montaldo G, Cohen I, Baulac M, Fink M, Tanter M. Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat Methods.* 2011;8(8):662–4.
72. Osmanski BF, Pezet S, Ricobaraza A, Lenkei Z, Tanter M. Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution. *Nat Commun.* 2014;5(5023):1–14.
73. Rabut C, Correia M, Finel V, Pezet S, Pernot M, Deffieux T, et al. 4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents. *Nat Methods.* 2019;16(10):994–7.
74. Giustetto P, Filippi M, Castano M, Terreno E. Non-invasive parenchymal, vascular and metabolic high-frequency ultrasound and photoacoustic rat deep brain imaging. *J Vis Exp.* 2015;52162(97):1–20.
75. Brunner C, Isabel C, Martin A, Dussaux C, Savoye A, Emmrich J, et al. Mapping the dynamics of brain perfusion using functional ultrasound in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(1):263–76.
76. Macé E, Cohen I, Montaldo G, Miles R, Fink M, Tanter M. In vivo mapping of brain elasticity in small animals using shear wave imaging. *IEEE Trans Med Imaging.* 2011;30(3):550–8.
77. Bedussi B, Van Der Wel NN, de Vos J, Van Veen H, Siebes M, VanBavel E, et al. Paravascular channels, cisterns, and the subarachnoid space in the rat brain: A single compartment with preferential pathways. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(4):1374–85.
78. Altafulla J, Bordes S, Jenkins S, Litvack Z, Iwanaga J, Loukas M, et al. The Basal Subarachnoid Cisterns: Surgical and Anatomical Considerations. *World Neurosurg.* 2019;129:190–9.
79. Ghersi-Egea JF, Finnegan W, Chen JL, Fenstermacher JD. Rapid distribution of intraventricularly administered sucrose into cerebrospinal fluid cisterns via subarachnoid velae in rat. *Neuroscience.* 1996;75(4):1271–88.
80. Rodríguez-Frutos B, Otero-Ortega L, Ramos-Cejudo J, Martínez-Sánchez P, Barahona-Sanz I, Navarro-Hernanz T, et al. Enhanced brain-derived neurotrophic factor delivery by ultrasound and microbubbles promotes white matter repair after stroke. *Biomaterials.* 2016;100:41–52.
81. Stroick M, Alonso A, Fatar M, Griebel M, Kreisel S, Kern R, et al. Effects of simultaneous application of ultrasound and microbubbles on intracerebral hemorrhage in an animal model. *Ultrasound Med Biol.* 2006;32(9):1377–82.

82. Zhou Y, Wang Y, Wang J, Anne Stetler R, Yang QW. Inflammation in intracerebral hemorrhage: From mechanisms to clinical translation. *Prog Neurobiol.* 2014;115:25–44.
83. Keep RF, Hua Y, Xi G. Intracerebral haemorrhage: Mechanisms of injury and therapeutic targets. *Lancet Neurol.* 2012;11(8):720–31.
84. Mittal MK, Lackamp A. Intracerebral hemorrhage: Perihemorrhagic edema and secondary hematoma expansion: From bench work to ongoing controversies. *Front Neurol.* 2016;7(210):1–12.
85. Altumbabic M, Peeling J, Del Bigio MR. Intracerebral hemorrhage in the rat: Effects of hematoma aspiration. *Stroke.* 1998;29(9):1917–22.
86. Felberg RA, Grotta JC, Shirzadi AL, Strong R, Narayana P, Hill-Felberg SJ, et al. Cell death in experimental intracerebral hemorrhage: The “black hole” model of hemorrhagic damage. *Ann Neurol.* 2002;51(4):517–24.
87. Xi G, Strahle J, Hua Y, Keep RF. Progress in translational research on intracerebral hemorrhage: Is there an end in sight? *Prog Neurobiol.* 2014;115:45–63.
88. Kiphuth IC, Huttner HB, Breuer L, Schwab S, Köhrmann M. Sonographic monitoring of midline shift predicts outcome after intracerebral hemorrhage. *Cerebrovasc Dis.* 2012;34(4):297–304.
89. Mäurer M, Shambal S, Berg D, Woydt M, Hofmann E, Georgiadis D, et al. Differentiation between intracerebral hemorrhage and ischemic stroke by transcranial color-coded duplex-sonography. *Stroke.* 1998;29(12):2563–7.
90. Shi X, Bai H, Wang J, Wang J, Huang L, He M, et al. Behavioral Assessment of Sensory, Motor, Emotion, and Cognition in Rodent Models of Intracerebral Hemorrhage. *Front Neurol.* 2021;12(667511):1–17.
91. Beray-Berthat V, Delifer C, Besson VC, Girgis H, Coqueran B, Plotkine M, et al. Long-term histological and behavioural characterisation of a collagenase-induced model of intracerebral haemorrhage in rats. *J Neurosci Methods.* 2010;191(2):180–90.
92. Krafft PR, McBride DW, Lekic T, Rolland WB, Mansell CE, Ma Q, Tang J ZJ. Correlation between subacute sensorimotor deficits and brain edema in two mouse models of intracerebral hemorrhage. *Behav Brain Res.* 2014;264:151–60.

Esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. *Identification of brain structures and blood vessels by conventional ultrasound in rats.* Gómez-de Frutos MC, et al. *J Neurosci Methods.* 2020;346:108935. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2020.108935.
2. *The role of ultrasound as a diagnostic and therapeutic tool in experimental animal models of stroke: a review.* Gómez-de Frutos MC, et al. *Biomedicines.* 2021;9(11):1609. DOI: 10.3390/biomedicines9111609.
3. *B-mode ultrasound, a reliable tool for monitoring experimental intracerebral hemorrhage.* Gómez-de Frutos MC, et al. *Front Neurol.* 2021;12(771402):1-10. DOI: 10.3389/fneur.2021.771402.



Identification of brain structures and blood vessels by conventional ultrasound in rats

Mari Carmen Gómez-de Frutos^{a,1}, Iván García-Suárez^{b,1}, Fernando Laso-García^a,
 Luke Diekhorst^a, Laura Otero-Ortega^a, Elisa Alonso-López^a, Exuperio Díez-Tejedor^{a,2},
 María Gutiérrez-Fernández^{a,2,*}, Gerardo Ruiz-Ares^{a,2,*}

^a Neurological Sciences and Cerebrovascular Research Laboratory, Department of Neurology and Stroke Center, La Paz University Hospital, Neuroscience Area of IdiPAZ Health Research Institute, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^b Emergency Service, San Agustín University Hospital, Avilés, Asturias, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Brain anatomy
 Blood flow
 Rat
 Transcranial
 Ultrasound

ABSTRACT

Background: Ultrasound is a safe, non-invasive and affordable imaging technique for the visualization of internal structures and the measurement of blood velocity using Doppler imaging. However, despite all these advantages, no study has identified the structures of the rat brain using conventional ultrasound.

Methods: A 13 MHz high frequency transducer was used to identify brain structures in the rat. The enlargement of the transcranial window was performed gradually using the ultrasound directly on the skin of the animal, then against the skull, then through a delimited craniotomy and finally through a complete craniotomy.

Results: Our results showed that ultrasound allowed the identification of cerebral ventricles and subarachnoid cisterns, as well as the analysis of real-time monitoring of cerebral blood flow in the main brain arteries of the rat.

Comparison with existing methods: Ultrasound is a tool with the potential to identify brain structures and blood vessels. In contrast to MRI, transcranial ultrasound is a fast, non-invasive, well tolerated and low-cost method and can be done at the bedside.

Conclusion: In the present study, we described an atlas of the main brain structures as well as the main vasculature in the rat using ultrasound. This technique could be applied in animal models of various neurological diseases.

1. Introduction

Perfect knowledge of brain anatomy is mandatory for better understanding of cerebrovascular pathologies and testing of novel therapies. Magnetic Resonance Imaging (MRI) has so far been the tool of choice for measuring cerebral blood flow (Mandeville et al., 2017; Denic et al., 2011) and for studying the rat brain due to its capacity to collect anatomical, pathological and functional information in *in vivo* preclinical models without exposing them to potentially harmful ionizing radiation (Denic et al., 2011; Welniak-Kaminska et al., 2019). However, as in patients, MRI in animals has several downsides such as time, transport, tolerance, availability and high cost (Hemphill et al., 2015; Dastur and Yu, 2017; Lin et al., 2015).

In contrast to MRI, transcranial ultrasound is a fast, non-invasive, well tolerated and low-cost method and can be done at the bedside (Meyer-Wiethe et al., 2009; Blanco et al., 2015; Greco et al., 2012). In the early twentieth century, experiments using ultrasound (US) emission on brain structures were performed, with investigators trying to interpret the images obtained. This method was abandoned when they ran into the technical limitations of US at the time, which did not allow tissue beneath bone structures to be examined (García and Del Arco, 2019). US is now a first-line diagnostic technique that can reveal anatomical contours and show biological functions in *in vivo* models (Maresca et al., 2018). Nonetheless, conventional US is not the method of choice for transcranial imaging in preclinical studies, probably due to the lack of scientific studies. Currently, US examination of the brain in

* Corresponding authors at: Neurological Sciences and Cerebrovascular Research Laboratory, Department of Neurology and Stroke Center, La Paz University Hospital, IdiPAZ Health Research Institute, Universidad Autónoma de Madrid, Paseo de la Castellana 261, 28046, Madrid, Spain.

E-mail addresses: mgutierrezfernandez@salud.madrid.org (M. Gutiérrez-Fernández), adalbertog.ruiz@salud.madrid.org (G. Ruiz-Ares).

¹ These authors share first author position.

² These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108935>

Received 21 April 2020; Received in revised form 16 July 2020; Accepted 2 September 2020

Available online 8 September 2020

0165-0270/© 2020 The Author(s).

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

animal models uses specific, sophisticated techniques such as shear wave imaging, (Macé et al., 2011) functional US (Brunner et al., 2017; Macé et al., 2011; Osmanski et al., 2014), also in 4D (Rabut et al., 2019), and photoacoustic and high-frequency US (Giustetto et al., 2015), which are not widely available to everyone. Besides, US has also been applied in the study of cerebral blood flow in animal models (Brunner et al., 2017; Giustetto et al., 2015; Ke et al., 2012; Lapergue et al., 2011; Seidel et al., 2000). However, few vessels have been identified, such as the internal carotid artery (Giustetto et al., 2015; Lapergue et al., 2011) and the middle cerebral artery (Ke et al., 2012). In this sense, more in-depth monitoring of vascular flow and identification of the cerebral arteries are required with an accessible tool such as conventional US.

In this work we have focused on preclinical imaging of rats using conventional US as a more accessible technique compared to others. This approach enables us to identify the main brain structures and blood flow. Thus, the aim of this study was to construct a basis for an US atlas of the main structures and main vasculature of the brain, performed in the rat. This in turn would be a powerful tool for the study of neurological diseases.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

The experiments were carried out at the Cerebrovascular and Neuroscience Research Laboratory, La Paz University Hospital, Madrid, Spain. Animal care and experimental procedures were designed to minimize animal suffering in compliance with and approved by the medical school's Ethics Committee for the Care and Use of Animals in Research (Ref. PROEX 296/16) according to Spanish and European Union regulations (directive 86/609/CEE and Spanish Royal Decree 53/2013).

2.2. Animals

A total of 6 male and female (proportion 1:1) Sprague-Dawley rats (8–9 weeks old, weighing 225–275 g) were used for the study. During the imaging session, the rats were anesthetized by inhaling 8% sevoflurane in a 1 L/min oxygen flow and maintained with 4% sevoflurane in a 1 L/min oxygen flow. Body temperature was maintained using a heating pad. Analgesia was administered by intraperitoneal injection of meloxicam (2 mg/kg).

The animals were euthanized by an intracardial potassium chloride injection; death was confirmed by cervical dissection. The brains were fixated by immersion in 4% paraformaldehyde, 30% sucrose and stored at -80 °C for the histological studies.

2.3. Transcranial ultrasound

Brain structures were analyzed by transcranial duplex US (Xario 200, TUS-X200, Canon). A 13 MHz lineal multi-frequency transducer was used (PLU-1204BT, Canon). All images were acquired in B-mode with optimization and constant adjustments in gain and depth throughout the experiments.

Doppler imaging was used to study cerebral blood flow. In red are colored flows that move toward the transducer, blue represent flows that move away. The tissue reflectivity function (TRF) was 18.8 cm/s.

Superb Micro-vascular Imaging (SMI) was also used to study cerebral blood flow. SMI is an innovative Doppler US technique that allows visualization of low-velocity blood flows but without having to use a contrast agent.

To obtain the images, the animals were placed in the prone position with the transducer perpendicular to the head to obtain images from the coronal view. To identify brain structures observed by US, we performed a total craniotomy in the animals and compared images obtained with B-mode US with a drawn anatomical atlas based on the W. Swanson L.

(Swanson, 2018) and Paxinos G. and Watson C. atlases (Paxinos and Watson, 2009). The total craniotomy was performed to enlarge the transcranial window. It consisted of removing the calvarial part of the skull (2 cm × 1 cm) (length × width). For the delimited craniotomy, a small line of 1 cm × 0.5 cm was performed along the coronal suture. An anterior to posterior incision was made in such a way that the skull was clearly visible. The head was shaved in order to obtain images directly from the skin. (Fig. 1).

2.4. Magnetic resonance imaging and magnetic resonance angiography

We also analyzed brain structures by MRI (Bruker Pharmascan, Ettlingen, Germany); 7-T horizontal bore magnets using T2-weighted (T2-W) spin-echo anatomical images acquired with a rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE) sequence in axial orientations and the following parameters: two echo images (TE, 29.54 ms and 88.61 ms); TR = 3000 ms; RARE factor = 4; Av = 3; FOV = 3.5 cm; acquisition matrix = 256 × 256 corresponding to an in-plane resolution of 137 × 137 μm²; slice thickness = 1.00 mm without gap; and number of slices = 16. For this procedure, animals were anesthetized with a 2% isoflurane-oxygen mixture in an induction chamber and the flow of anesthetic gas was constantly regulated to maintain a breathing rate of 50 ± 20 bpm.

2D Time of Flight (TOF) Magnetic Resonance Angiography (MRA) method was used without contrast agent and displayed in maximum intensity projection (MIP) in a Biospec spectrometer 7 T 16 cm bore magnet (Bruker, Germany) equipped with a 360 m T/cm gradient with a 40 mm quadrature coil for RF transmission and reception. The sequence has the following parameters: TE: 2.6 ms, TR: 15 ms, FA: 80°, 160 slices of 0.3 mm without gap, matrix 256 × 256 and FOV 38 × 38 mm.

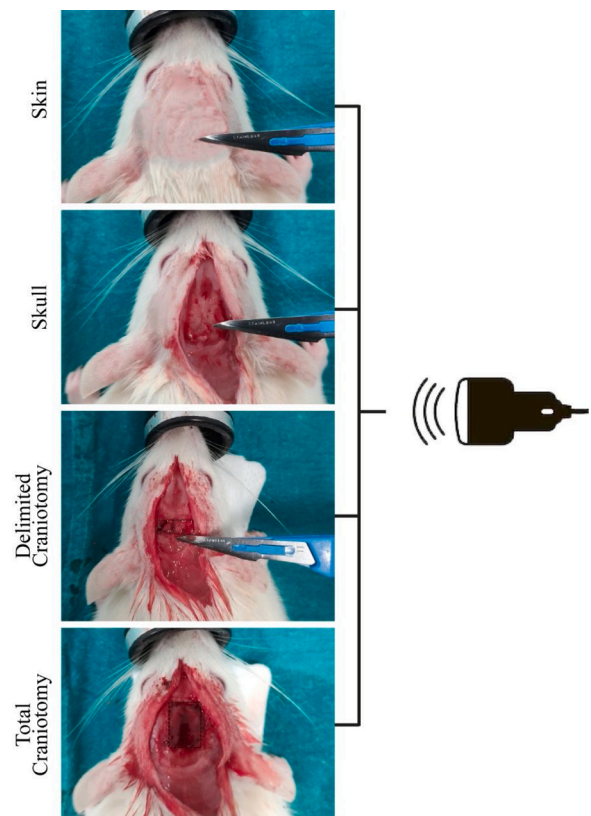


Fig. 1. Representative images of the various transcranial windows. Images of the transcranial windows (skin, skull, delimited and total craniotomy) used for the US study of the brain structures and vasculature in rats.

2.5. Microbubble administration

Lipid microbubbles (MB) (Sonovue®, BRACCO, Italy) were prepared following the manufacturer's instructions and administrated by the tail vein in bolus of 200 μ L to a maximum volume of 1 mL/rat in the Doppler and SMI study.

2.6. Nissl stain

To identify brain structures by immunochemistry we used Nissl stain in 40 μ m sections from rat brain. The slices were stained in Cresyl Violet 0.5% for 4 min. Finally, the slices were dehydrated in alcohol, cleared in xylene and mounted in DePeX. The structures were observed using a 20x objective lens and processed by image analysis software (Image-Pro Plus 4.1, Media Cybernetics).

3. Results

3.1. Identification of brain structures

We were able to identify several structures: in the anterior part of the brain (around 4.20 mm from bregma), the cerebral cortex can be identified (Fig. 2A). Moving on near to -0.48 mm from bregma allowed for the visualization of the cerebral cortex, two interconnected cavities (lateral ventricles), and the striatum outside the walls of the lateral ventricles (Fig. 2B). Posteriorly, around -3.48 mm from bregma, we visualized the third ventricle located in the ventral part of the brain and between the spaces of the subarachnoid cisterns. In addition, the ventral part of the lateral ventricles can also be seen, specifically, near the ventral part of the brain, on both sides of the final part of the cisterns (Fig. 2C). Approximately -5.04 mm posterior to bregma, we were able

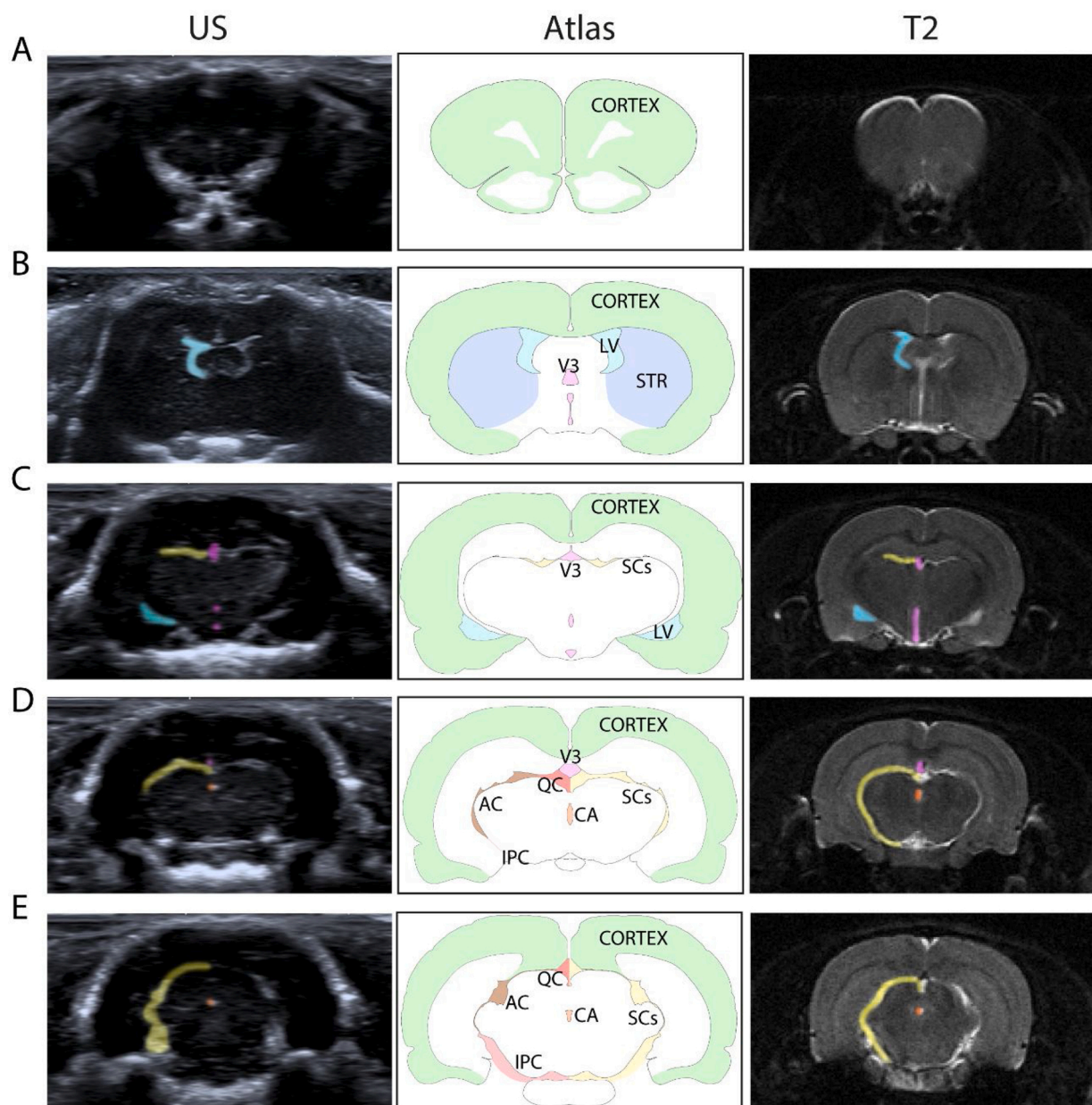


Fig. 2. Brain structures by US with a total craniotomy, anatomical atlas and T2. Principal brain structures observed at around 4.20 mm (A), -0.48 mm (B), -3.48 mm (C), -5.04 mm (D) and -6.72 mm (E). Sections were colored: cortex (green), lateral ventricles (blue), striatum (light blue), third ventricle (purple), subarachnoid cisterns (yellow) and cerebral aqueduct (orange). The quadrigeminal cistern (red) communicates with the ambient (brown) and interpeduncular (pink) cisterns in the posterior part of the brain. Abbreviations: AC: ambient cistern; CA: cerebral aqueduct; IPC: interpeduncular cistern; QC: quadrigeminal cistern; SCs: subarachnoid cisterns; STR: striatum; V3: third ventricle; LV: lateral ventricle.

to see the channel that connects the third and fourth ventricles (cerebral aqueduct) and more clearly define the subarachnoid cisterns. We can find the quadrigeminal cistern that connects to the ambient cistern and the interpeduncular cistern towards the base of the brain (Fig. 2D). Finally, we can continue visualizing the cerebral aqueduct and the route of the subarachnoid cisterns around -6.72 mm from bregma (Fig. 2E).

T2 images were used as a complementary imaging technique to US. The brain structures were thus first identified using T2 images, based again on the W. Swanson L. and Paxinos G. and Watson C. atlases. The same structures were identified both in US and T2 images (Fig. 2).

3.2. Correlation of brain structures in the various transcranial windows

Once we identified the brain structures, these were localized in post-mortem assays (fixed brain slices [Fig. 3A] and brain slices stained with Nissl [Fig. 3B]), in T2 *in vivo* images (Fig. 3C) and in atlas images (Fig. 3H). Once we identified the brain structures, we correlated those structures observed with US through total craniotomy (Fig. 3D), through delimited craniotomy (Fig. 3E), on the skull (Fig. 3F) and non-invasively, directly on the skin (Fig. 3G) (Table 1).

The placement of the transducer through the delimited craniotomy

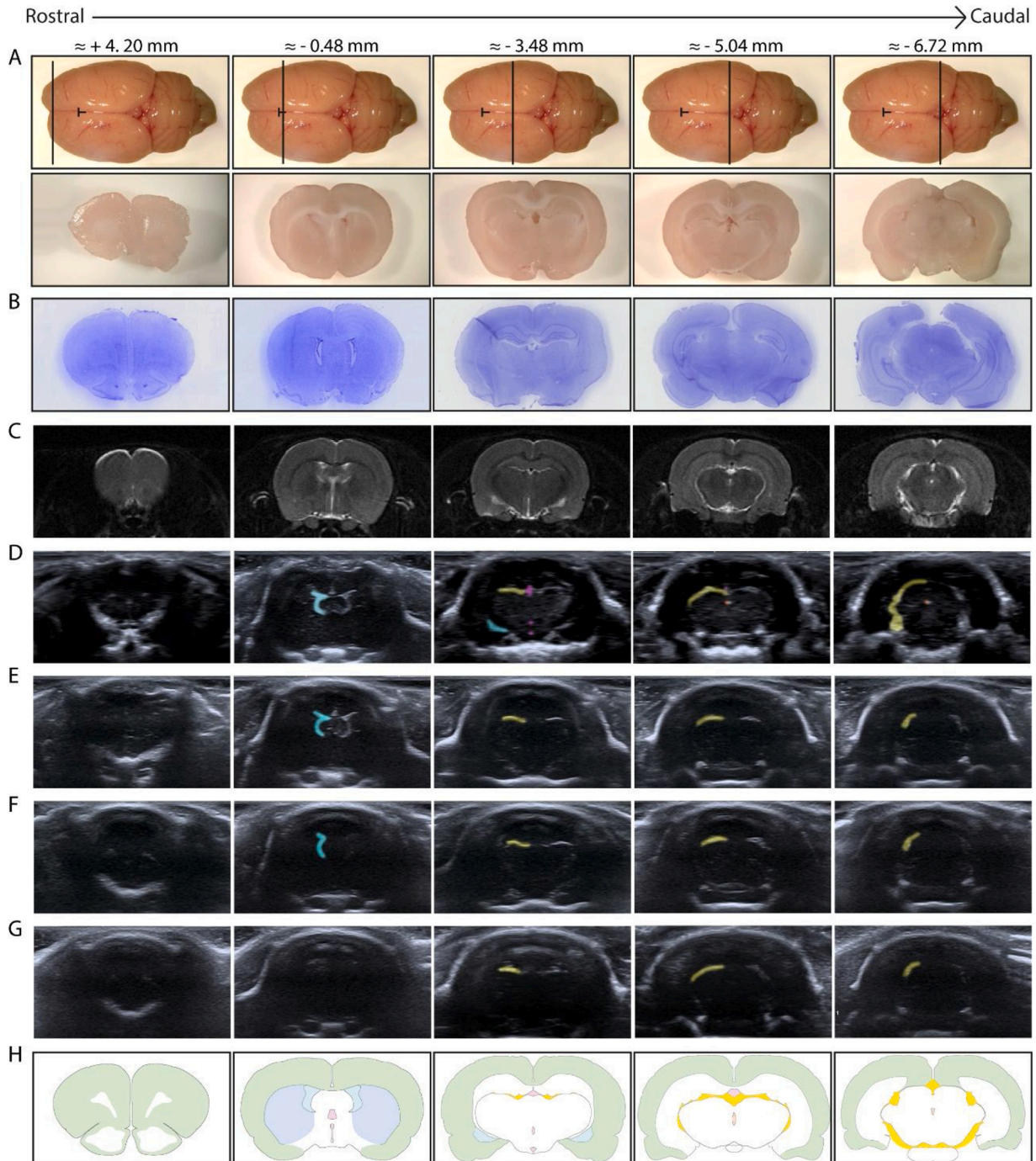


Fig. 3. Representative images of brain structures from anterior (rostral) to posterior (caudal). Sagittal view of the brain and coronal images in post-mortem slices (A). Coronal section of the brain using Nissl stain (B), T2 (C) and a drawn atlas (H). Coronal sections of the brain using US with total craniotomy (D), delimited craniotomy (E), on the skull (F) and the skin (G). The “I” marks bregma. Half sections were colored: lateral ventricles (blue), third ventricle (purple), subarachnoid cisterns (yellow) and cerebral aqueduct (orange).

allowed visualization of the lateral ventricles approximately -0.48 mm from bregma, and the subarachnoid cisterns in the posterior part of the brain (-3.48 mm, -5.04 mm and -6.72 mm from bregma) (Fig. 3E). The silhouette of the lateral ventricles (-0.48 mm from bregma) and the subarachnoid cisterns (-3.48 mm, -5.04 mm and -6.72 mm from bregma) could also be observed by placing the transducer on the skull. (Fig. 3F). If we put the transducer directly on the skin of the animals, only the subarachnoid cisterns could be identified (-3.48 mm, -5.04 mm and -6.72 mm from bregma) (Fig. 3G).

3.3. Blood flow analysis by US

A comparative study between a vascular atlas in rats (Paxinos, 2015), MRA and the images obtained using Doppler US was carried out. However, no visual differences in Doppler signal could be obtained when the transducer was placed directly on the skin (Fig. 4 and Fig. 5A), on the skull, through the delimited craniotomy or through the total craniotomy (supplementary Fig. 1).

SMI analysis allowed us to identify low blood flow. As with the identification of the brain structures, in this case the total craniotomy allowed for a better and greater signal with SMI. The images obtained through total craniotomy were therefore used to identify the cerebral arteries.

In our study, MRA allowed for the identification of practically the same brain arteries as Doppler (Fig. 4). No arteries could be identified at around 4.20 mm from bregma, either with Doppler, SMI or MRA (Fig. 4A). We could not detect any Doppler and MRA signal around -0.48 mm from bregma (Fig. 4B). However, the SMI software allowed the visualization of the middle internal frontal artery in the cortex, the striate arteries in both hemispheres and a branch of the middle cerebral artery at the base of the brain (Fig. 4B). Around -3.48 mm from bregma, we could visualize the internal carotid arteries with Doppler, SMI and MRA techniques (in both sides of the brain's base) and the azygos pericallosal artery with the SMI software and with the MRA (cortex) (Fig. 4C). The anterior choroidal arteries and the posterior medial choroidal artery showed up with Doppler, SMI and MRA techniques, in the hemispheres approximately -5.04 mm posterior to the bregma (Fig. 4D).

Around -6.72 mm from bregma, and continuing with the arrangement of the subarachnoid cisterns, using Doppler, SMI and MRA we visualized the supracollicular arterial network and posterior cerebral artery (Fig. 4E).

As well as identifying brain structures, we correlated the vascular system observed by Doppler and SMI through the delimited craniotomy,

Table 1
Main brain structures and vasculature identified by US.

| TRANSCRANIAL WINDOW | BRAIN STRUCTURES | ARTERIES | |
|----------------------|--|---------------------------|---|
| | | Doppler | SMI |
| Skin | Subarachnoid cisterns | Ach, ica, pca, pmch, scol | Ach, ica, pca, pmch, scol |
| Skull | Lateral ventricles, subarachnoid cisterns | Ach, ica, pca, pmch, scol | Ach, ica, pca, pmch, scol |
| Delimited craniotomy | Lateral ventricles, subarachnoid cisterns | Ach, ica, pca, pmch, scol | Ach, ica, pca, pmch, scol |
| Total craniotomy | Cerebral cortex, lateral ventricles, striatum, third ventricle, subarachnoid cisterns, cerebral aqueduct | Ach, ica, pca, pmch, scol | Ach, azp, ica, mca, mif, pca, pmch, scol, str |

Ach: anterior choroidal artery; azp: azygos pericallosal artery; ica: internal carotid artery (common carotid); mca: middle cerebral artery; mif: middle internal frontal artery; pca: posterior cerebral artery (superior cerebellar); pmch: posterior medial choroidal artery (supracollicular network); scol: supracollicular arterial network (posterior cerebral); str: striate artery.

the skull and the skin (Fig. 5) (Table 1).

As previously described, the Doppler signal was the same when placing the transducer on the skin, the skull or through the craniotomy. Therefore, we decided to represent the Doppler images obtained on the skin, since it is non-invasive (Fig. 5A). However, low velocity and small diameter blood vessel flow was recorded with SMI software in all the modalities. We could only visualize the arteries (middle internal frontal artery, striate arteries and middle cerebral artery), at around -0.48 mm from bregma, with the transducer in the total craniotomy (Fig. 5B). No SMI signal was obtained when the transducer was placed through the delimited craniotomy (Fig. 5C), the skull (Fig. 5D) or the skin (Fig. 5E). However, the transducer placed through the delimited craniotomy (Fig. 5C), the skull (Fig. 5D) and also directly on the skin (Fig. 5E) allowed the visualization of the internal carotid arteries at -3.48 mm from bregma, anterior choroidal arteries and posterior medial choroidal artery at -5.04 mm from bregma and the supracollicular arterial network and posterior cerebral artery at -6.72 mm from bregma.

3.4. Combined use of MB and US

To increase contrast and improve the identification of blood vessels, MB administration enhanced the visualization of the cerebral blood vessels by both Doppler and SMI analysis (Fig. 6).

Despite the fact that MB increased signal intensity in Doppler studies, we could hardly identify differences in the visualization of the different cerebral arteries through the total craniotomy (Fig. 6A), delimited craniotomy (Fig. 6B), on the skull (Fig. 6C) and on the skin (Fig. 6D).

However, with SMI we could observe in addition to an increase in the signal with respect to the administration without MB, a variable number of vessels according to the transcranial window studies. We observed that as the transcranial window was enlarged, the number of arteries that could be identified also increased. Specifically, the combined use of MB and US at around -0.48 mm, -3.48 mm and -5.04 mm on the total craniotomy (Fig. 6E) allowed to identify a greater number of arteries in comparison to the delimited craniotomy (Fig. 6F), the skull (Fig. 6G) and the skin (Fig. 6H). Studies around +4.20 mm and -6.72 mm did not show visual differences in the identification of vessels in the transcranial windows (Fig. 6E-H).

4. Discussion

To get to know the changes that occur in the brain structures as a consequence of neurological disease, it is essential to have perfect knowledge of the cerebral anatomy. In this way, pitfalls in the translation of therapeutic strategies when passing from the animal model to the patient would be minimized. Traditional neuroanatomical studies use histological and microscopic techniques that provide superb spatial resolution, but do not allow for *in vivo* imaging and are labor- and time-intensive. These studies could be carried out with conventional techniques such as MRI (T2 and MRA) and US, or by more sophisticated techniques such as laser speckle. Regarding laser speckle, this tool allows for rapid monitoring of microcirculation and taking velocity measurements. This makes it very useful for neurovascular imaging so it is a versatile tool (Kazmi et al., 2015; Vaz et al., 2016). However, its computational complexity and ambiguity in its spatial specificity may be considered (Kazmi et al., 2015).

On the other hand, MRI is non-invasive and suitable for small nervous systems when sufficient contrast between different brain parts can be detected (Herberholz et al., 2011). Although MRI is considered the gold standard imaging technique to follow-up on brain lesions, it has some issues, including contrast-related side effects, limited accessibility and high costs (Morelli et al., 2019). For this reason, the incorporation of conventional US in the visualization of brain structures, as well as for monitoring cerebral blood flow, opens a new window of possibilities in experimental research of neurological diseases. The major advantages of US are its safety, fast imaging speed, and portability without the need for

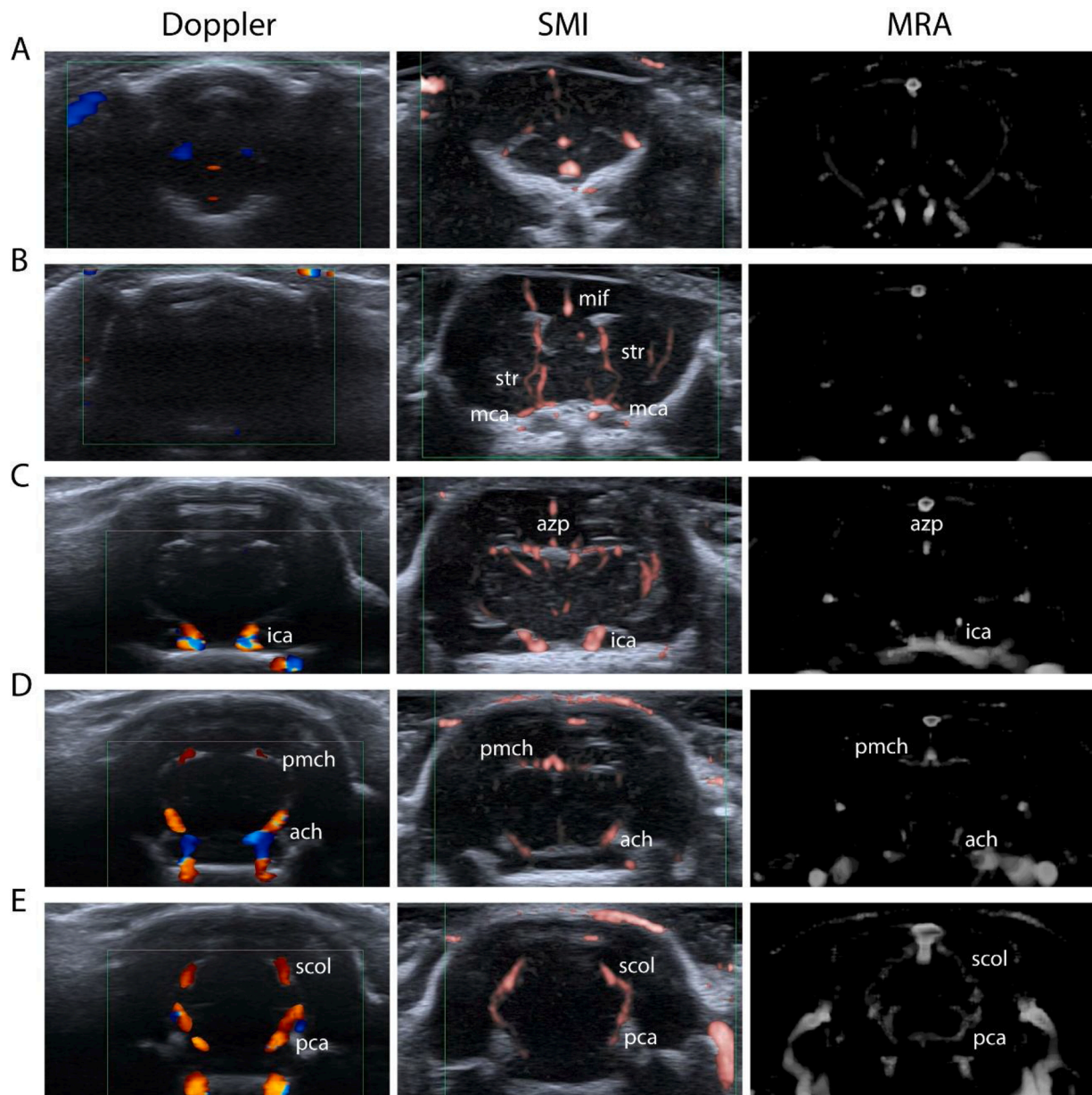


Fig. 4. Identification of the main cerebral arteries by Doppler with the skin intact, by SMI with a total craniotomy and by MRA. Brain arteries observed at around 4.20 mm (A), -0.48 mm (B), -3.48 mm (C), -5.04 mm (D) and -6.72 mm (E). Abbreviations: ach: anterior choroidal artery; azp: azygos pericallosal artery; ica: internal carotid artery (common carotid); mca: middle cerebral artery; mif: middle internal frontal artery; pca: posterior cerebral artery (superior cerebellar); pmch: posterior medial choroidal artery (supracollicular network); scol: supracollicular arterial network (posterior cerebral); str: striate artery.

special shielding, as is required with MRI (Lin et al., 2015). Besides, US can still be used when metallic biomedical implants or devices have been introduced into the brain or skull, while with MRI this is not possible (Dill, 2008).

But it has limitations, such as the acquisition of brain images through the skull. In experimental adult animal models, the skull causes low sensitivity, aberrations in the images and loss of spatial resolution in US studies of the brain (Giustetto et al., 2015). For this reason, studies have used not only specific US, such as photoacoustic and high-frequency US and functional US (MacÉ et al., 2011; Osmanski et al., 2014; Giustetto et al., 2015), but investigators have also performed skull-thinning surgical procedures (Brunner et al., 2017; Osmanski et al., 2014) or have removed the skull (Macé et al., 2011) of the animals to obtain high quality images. However, some authors reported that craniotomy can induce morphological and vascular changes in the rat brain. Osmanski et al., 2014 Furthermore, blood flow can also be studied with this tool

(Brunner et al., 2017; Giustetto et al., 2015) but a more complete study of the brain vasculature in animal models is necessary with this technique. To our knowledge, this work presents for the first time a neuro-imaging study in rats with conventional transcranial US. The identification of the brain structures and the blood flow with this technique offers the possibility of introducing US in future preclinical experiments to study brain pathologies.

As is well known, bone absorbs US waves, (Jesse, 2014) complicating the study of the brain. Therefore, US imaging was attempted on various surfaces: directly on the skin, on the skull or after a craniotomy (a craniotomy limited to a small size to emulate a less invasive situation, and a complete craniotomy). In our study, deep brain anatomy is clearly visible after craniotomy. As we enlarged the transcranial window, we were able to visualize more clearly the brain structures in the rats. While the use of US on the skin allows only the study of the subarachnoid cisterns, if we place the transducer on the skull or through the delimited

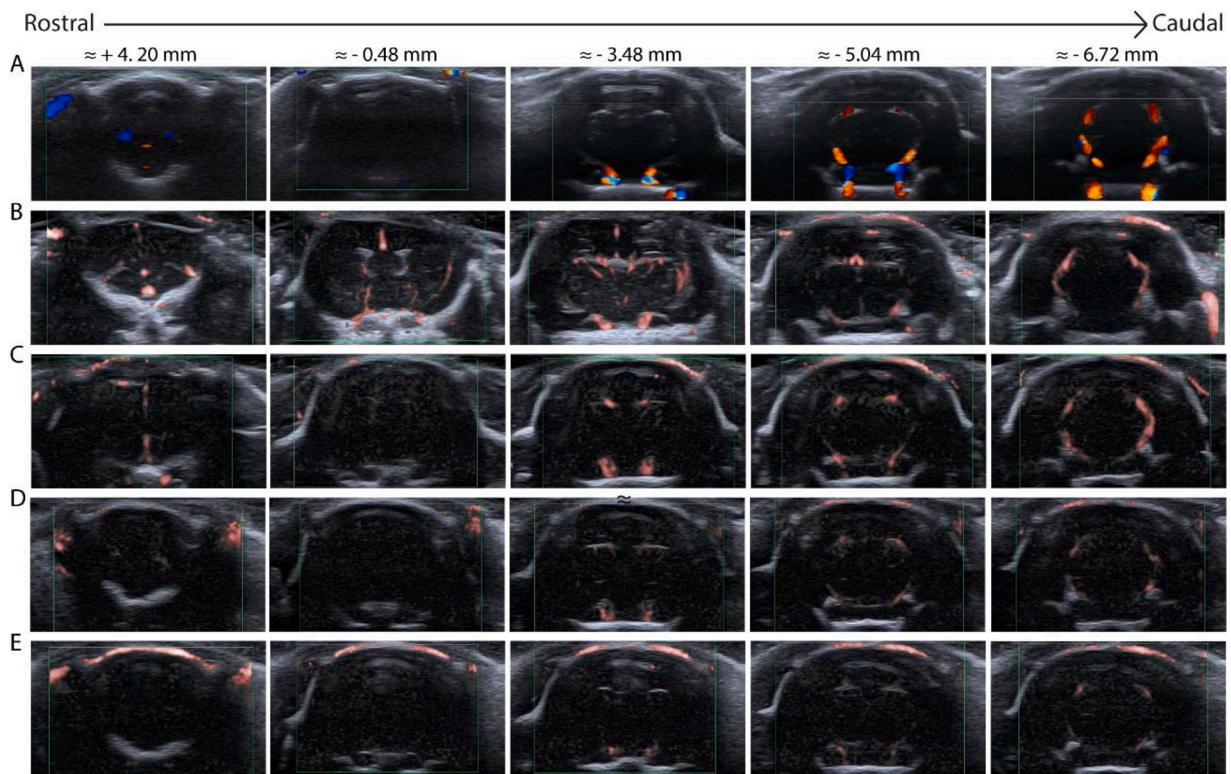


Fig. 5. Representative US images of blood flow. Various visualizations of the arteries by Doppler (A) and SMI (B, C, D and E) in anterior to posterior coronal sections of the brain. The images are representative of the Doppler assessed on the skin (A), and of the SMI with total craniotomy (B), delimited craniotomy (C), on the skull (D) and the skin (E) of the animals.

craniotomy we can observe, in addition to the cisterns, the lateral ventricles. Nevertheless, total craniotomy allowed the visualization of more structures such as the lateral and third ventricles, cerebral aqueduct and subarachnoid cisterns. Consequently, performing a total craniotomy allowed study of the brain structures in greater detail than the other approaches (delimited craniotomy, skull and skin).

As we have just mentioned, the subarachnoid cisterns are the main structure that can be seen through all the transcranial windows. These subarachnoid cisterns connect with the subarachnoid space, providing natural pathways to nerves and vessels (Bedussi et al., 2017; Altafulla et al., 2019). The quadrigeminal, ambient and the interpeduncular cisterns are part of the subarachnoid cisterns. On top of the midbrain lies the quadrigeminal cistern, which is continuous with the ambient cistern. Extending to the cerebellum, the ambient cistern is continuous with the interpeduncular cistern (Gherzi-Egea et al., 1996). Previously studies showed that under pathological conditions the cerebrospinal fluid can circulate by compensatory pathways between the ventricles and the cisterns (Bedussi et al., 2017; Yoon et al., 2015).

As other authors had already done, we also performed blood flow monitoring. Previous studies have been able to identify through the skin the internal carotid artery and the anterior cerebral artery from temporal and occipital viewpoints of the brain (Giustetto et al., 2015). Other authors describe the circle of Willis arteries using a horizontal cross-sectional view parallel to the base of the skull (Lapergue et al., 2011). However, these transcranial windows limit the wider vascular study of the animals. In our work, the internal carotid artery, posterior medial and anterior choroidal arteries, supracollicular arterial network and the posterior cerebral artery were the main arteries that could be identified by Doppler studies. The Doppler showed no difference in the number of vessels identified regardless of whether it was performed on the skin, the skull or through both craniotomies. It is deduced that for this type of study, the placement of the transducer directly on the skin allows the visualization of the entire vasculature. This non-invasive

approach on the skin closely mimics the clinical reality.

Previous studies have been able to visualize the middle cerebral artery in the coronal position (Ke et al., 2012). However, previous (unpublished) data from our laboratory located the middle cerebral artery closer to the surface of the brain. In our study, the Doppler did not allow its visualization, probably due to the need to perform a lateral craniotomy to be able to see it (Fox et al., 1993), its small diameter in rats, its proximity to the skull and the difficulty of placing the transducer in the correct position (Lapergue et al., 2011). This implies that the other authors might be observing something else.

In addition, this paper shows for the first time that the SMI feature allows visualization of low-velocity and small-diameter blood vessels, helping us to identify more vessels than with Doppler. Until now, the visualization of these vessels was not possible, thus increasing the efficiency of the technique. Because of these SMI features, and contrary to the Doppler, we were able to observe the middle cerebral artery with a total craniotomy. Besides, with the SMI software, and as was the case with the visualization of brain structures, the enlargement of the transcranial window made it possible to identify a greater number of vessels. We could obtain coronal images with the placement of the transducer through the total craniotomy, identifying the middle internal frontal artery, striate arteries, middle cerebral artery, azygos pericallosal artery, internal carotid artery, anterior and posterior medial choroidal arteries, supracollicular arterial network and the posterior cerebral artery. However, we did not find differences in the vessels identified by SMI through the delimited craniotomy, the skull and skin. In these 3 approaches the anterior choroidal artery, the internal carotid artery, the posterior cerebral artery, the posterior medial choroidal artery and the supracollicular arterial network could be identified. Again, the total craniotomy will allow, with the SMI, a deeper study of the cerebral vasculature than the other transcranial windows.

Finally, the use of contrast agents such as MB together with US allows for imaging of the blood flow (Mears et al., 2012). It has been

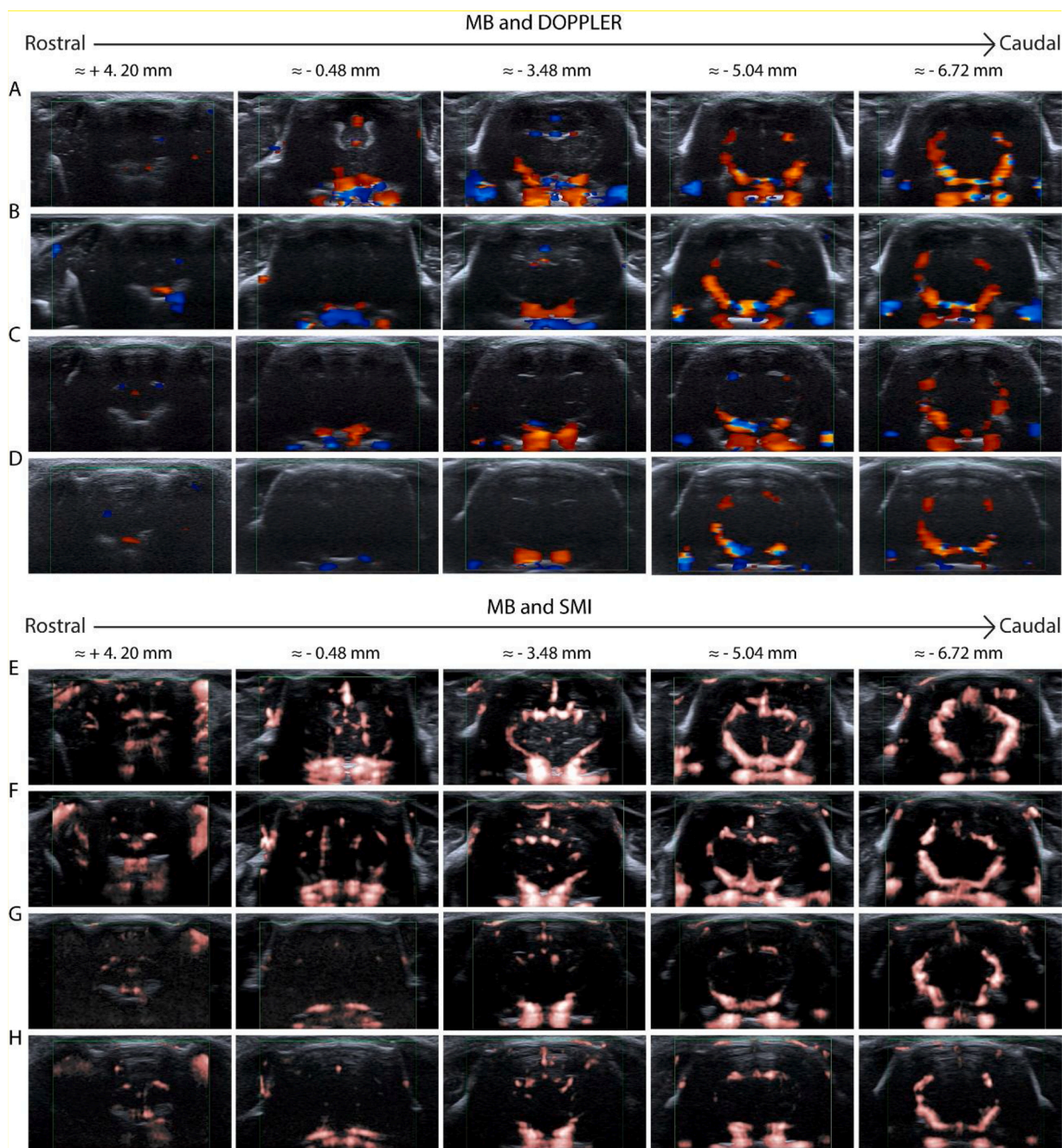


Fig. 6. Blood flow images by US with MB. Cerebral arteries visualization from anterior to posterior by Doppler (**upper panel**) and SMI (**lower panel**). The representative images are in coronal sections of the brain obtained through the total craniotomy (**A and E**), delimited craniotomy (**B and F**), on the skull (**C and G**) and on the skin (**D and E**).

demonstrated, that the combination of US and MB is safe and helpful in transcranial Doppler examinations, enhancing the effectiveness of diagnostic (Meairs et al., 2012). Our studies using MB—US in tandem, improved the visualization of the cerebral blood flow with both Doppler and SMI in all experimental groups. Therefore, this combination could help, in any of the transcranial windows chosen, to a better analysis of the vessels in those cases where MB are available.

5. Conclusions

Despite the limitations of US – it requires extensive knowledge, exhaustive training and is user-dependent (Greco et al., 2012) – it is a technique with multiple advantages. In our study we found that

conventional US allows for the distinction between fluid-filled cavities and brain tissue in the rat. We have been able to provide various views of the brain structures and a vascular brain map according to the various approaches (skin, skull, delimited and total craniotomy). We provide not only a non-invasive view, but also performed a descriptive study through the skull and craniotomy. In this manner, the use of US could be adapted to the specific experimental needs of each study. This also gives US great translational potential and can mimic the clinical situation through non-invasive application on the skin. However, further pre-clinical research is required.

Funding

This work was sponsored by the FIS PI16/01052 project from the Spanish Ministry of Health—Carlos III Health Institute (ISCIII) and the European Regional Development Fund (FEDER Funding), Miguel Servet (CP15/00069 to María Gutiérrez-Fernández) and predoctoral fellowship (FI17/00188 to Mari Carmen Gómez-de Frutos, FI18/00026 to Fernando Laso-García) and the INVICTUS PLUS Spanish Network (RD16/0019/0005) of the Carlos III Health Institute (ISCIII), and Juan de la Cierva postdoctoral fellowship (IJCI-2017–33505, to Laura Otero-Ortega, Spanish State Research Agency), Spanish Ministry of Science and Innovation.

Availability of data and material

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on request.

CRediT authorship contribution statement

Mari Carmen Gómez-de Frutos: Writing - original draft, Validation, Formal analysis, Investigation. **Iván García-Suárez:** Writing - original draft, Validation, Formal analysis, Investigation. **Fernando Laso-García:** Validation, Formal analysis, Investigation. **Luke Diekhorst:** Validation, Formal analysis, Investigation. **Laura Otero-Ortega:** Formal analysis. **Elisa Alonso-López:** Formal analysis. **Exuperio Díez-Tejedor:** Project administration, Methodology, Supervision, Writing - review & editing, Funding acquisition. **María Gutiérrez-Fernández:** Project administration, Methodology, Supervision, Writing - review & editing, Funding acquisition. **Gerardo Ruiz-Ares:** Project administration, Methodology, Supervision, Writing - review & editing, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgments

We appreciate the support of Canon (Spain) for providing the SMI software and Morote Traducciones S.L. support for editing assistance.

Appendix A. Supplementary data

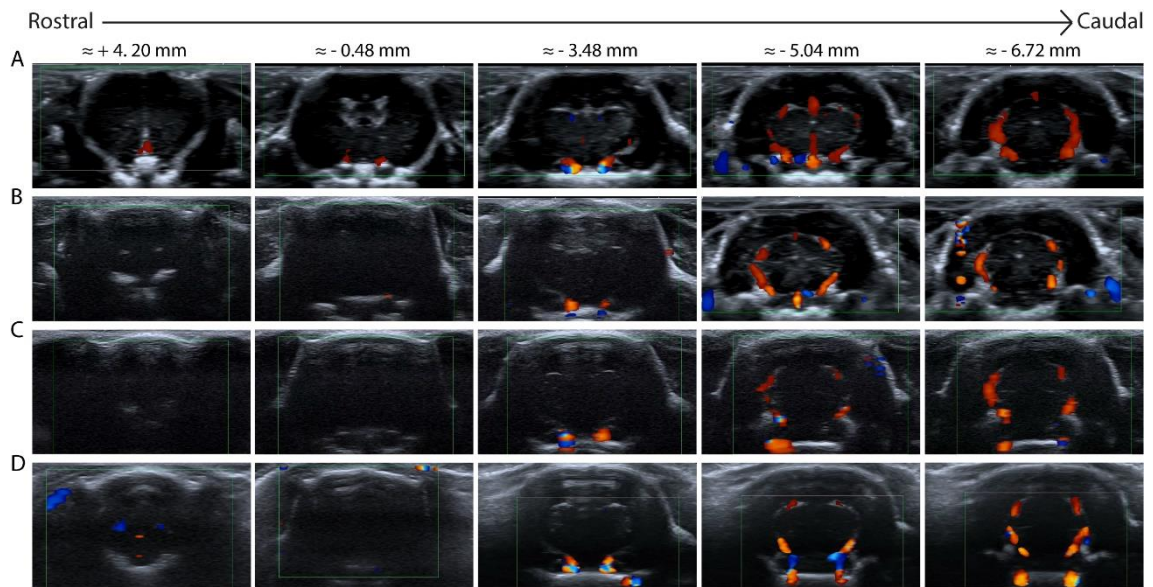
Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.10.8935>.

References

- Altafulla, J., Bordes, S., Jenkins, S., Litvack, Z., Iwanaga, J., Loukas, M., et al., 2019. The basal subarachnoid cisterns: surgical and anatomical considerations. *World Neurosurg.* 129, 190–199. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00281-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00281-3).
- Bedussi, B., Van Der Wel, N.N., de Vos, J., van Veen, H., Siebes, M., VanBavel, E., et al., 2017. Paravascular channels, cisterns, and the subarachnoid space in the rat brain: a single compartment with preferential pathways. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37 (4), 1374–1385. <https://doi.org/10.1177/0271678X16655550>.
- Blanco, P., Do Pico, J.L., Matteoda, M., 2015. Intracranial hematoma and midline shift detected by transcranial color-coded duplex sonography. *Am. J. Emerg. Med.* 33 (11) <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2015.03.040>, 1715.e5–1715.e7.
- Brunner, C., Isabel, C., Martin, A., Dussaux, C., Savoye, A., Emmrich, J., et al., 2017. Mapping the dynamics of brain perfusion using functional ultrasound in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37 (1), 263–276. <https://doi.org/10.1177/0271678X15622466>.
- Dastur, C.K., Yu, W., 2017. Current management of spontaneous intracerebral haemorrhage. *Stroke Vasc. Neurol.* 2 (1), 21–29. <https://doi.org/10.1136/svn-2016-000047>.
- Denic, A., Macura, S.I., Mishra, P., Gamez, J.D., Rodriguez, M., Pirko, I., 2011. MRI in rodent models of brain disorders. *Neurotherapeutics* 8 (1), 3–18. <https://doi.org/10.1007/s13311-010-0002-4>.
- Dill, T., 2008. Contraindications to magnetic resonance imaging: non-invasive imaging. *Heart* 94 (7), 943–948. <https://doi.org/10.1136/hrt.2007.125039>.
- Fox, G., Gallacher, D., Shevde, S., Loftus, J., Swayne, G., 1993. Anatomic variation of the middle cerebral artery in the sprague-dawley rat. *Stroke*. 24 (12), 2087–2092. <https://doi.org/10.1161/01.str.24.12.2087>.
- García, I., 2019. Concepto de ecografía clínica en urgencias y emergencias. *Recuerdo histórico*. In: Panamericana, M.édica (Ed.), Programa Oficial de Actualización Profesional en Medicina de Urgencias y Emergencias de las SEMES.
- Ghersli-Egea, J.F., Finnegan, W., Chen, J.L., Fenstermacher, J.D., 1996. Rapid distribution of intraventricularly administered sucrose into cerebrospinal fluid cisterns via subarachnoid velae in rat. *Neuroscience*. 75 (4), 1271–1288. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00281-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00281-3).
- Giustetto, P., Filippi, M., Castano, M., Terreno, E., 2015. Non-invasive parenchymal, vascular and metabolic high-frequency ultrasound and photoacoustic rat deep brain imaging. *J. Vis. Exp.* 2015 (97), 4–5. <https://doi.org/10.3791/52162>.
- Greco, A., Mancini, M., Gargiulo, S., Gramanzini, M., Claudio, P.P., Brunetti, A., et al., 2012. Ultrasound biomicroscopy in small animal research: applications in molecular and preclinical imaging. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 519238 <https://doi.org/10.1155/2012/519238>.
- Hemphill 3rd, J.C., Greenberg, S.M., Anderson, C.S., Becker, K., Bendok, B.R., Cushman, M., et al., 2015. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the american heart Association/American stroke association. *Stroke*. 46 (7), 2032–2060. <https://doi.org/10.1161/STR.000000000000069>.
- Herberholz, J., Mishra, S.H., Uma, D., Germann, M.W., Edwards, D.H., Potter, K., 2011. Non-invasive imaging of neuroanatomical structures and neural activation with high-resolution MRI. *Front. Behav. Neurosci.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00016>.
- Jesse, S., 2014. Ultrasound physics. *Crit. Care Clin.* 30 (1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2013.08.004>.
- Kazmi, S.M., Richards, L.M., Schrandt, C.J., Davis, M.A., Dunn, A.K., 2015. Expanding applications, accuracy, and interpretation of laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35 (7), 1076–1084. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.84>.
- Ke, Z., Ying, M., Li, L., Zhang, S., Tong, K.Y., 2012. Evaluation of transcranial Doppler flow velocity changes in intracerebral hemorrhage rats using ultrasonography. *J. Neurosci. Methods* 210 (2), 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.07.024>.
- Lapergue, B., Deroide, N., Pocard, M., Michel, J.B., Meilhac, O., Bonnin, P., 2011. Transcranial duplex sonography for monitoring circle of Willis artery occlusion in a rat embolic stroke model. *J. Neurosci. Methods* 197 (2), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.02.016>.
- Lin, J.B., Phillips, E.H., Riggins, T.E., Sangha, G.S., Chakraborty, S., Lee, J., et al., 2015. Imaging of small animal peripheral artery disease models: recent advancements and translational potential. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (5), 11131–11177. <https://doi.org/10.3390/ijms160511131>.
- Macé, E., Cohen, I., Montaldo, G., Miles, R., Fink, M., Tanter, M., 2011. In vivo mapping of brain elasticity in small animals using shear wave imaging. *IEEE Trans. Med. Imaging* 30 (3), 550–558. <https://doi.org/10.1109/TMI.2010.2079940>.
- MacÉ, E., Montaldo, G., Cohen, I., Baulac, M., Fink, M., Tanter, M., 2011. Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat. Methods* 8 (8), 662–664. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1641>.
- Mandeville, E.T., Ayata, C., Zheng, Y.M.J., 2017. Translational MR neuroimaging of stroke and recovery. *Transl. Stroke Res.* 8 (1), 22–32. <https://doi.org/10.1007/s12975-016-0497-z>.
- Maresca, D., Lakshmanan, A., Abedi, M., Bar-Zion, A., Farhadi, A., Lu, G.J., et al., 2018. Biomolecular ultrasound and sonogenetics. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 229–252. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060817-084034>.
- Meairs, S., Kern, R., Alonso, A., 2012. Why and how do microbubbles enhance the effectiveness of diagnostic and therapeutic interventions in cerebrovascular disease? *Curr. Pharm. Des.* 18 (15), 2223–2235. <https://doi.org/10.2174/138161212800099982>.
- Meyer-Wiethe, K., Sallustio, F., Kern, R., 2009. Diagnosis of intracerebral hemorrhage with transcranial ultrasound. *Cerebrovasc. Dis.* 27 (suppl 2), 40–47. <https://doi.org/10.1159/000203125>.
- Morelli, L., Guadagni, S., Borrelli, V., Pisano, R., Di Franco, G., Palmeri, M., et al., 2019. Role of abdominal ultrasound for the surveillance follow-up of pancreatic cystic neoplasms: a cost-effective safe alternative to the routine use of magnetic resonance imaging. *World J. Gastroenterol.* 25 (18), 2217–2228. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i18.2217>.
- Osmanli, B.F., Pezet, S., Ricobaraza, A., Lenkei, Z., Tanter, M., 2014. Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution. *Nat. Commun.* 5, 5023. <https://doi.org/10.1038/ncomms6023>.
- Paxinos, G., 2015. *The Rat Nervous System*, 4th ed. Elsevier.
- Paxinos, G., Watson, C., 2009. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Compact Si. Elsevier.
- Rabut, C., Correia, M., Finel, V., Pezet, S., Pernot, M., Deffieux, T., et al., 2019. 4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents. *Nat. Methods* 16 (10), 994–997. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0572-y>.
- Seidel, G., Algermissen, C., Christoph, A., Katzer, T., Kaps, M., 2000. Visualization of brain perfusion with harmonic gray scale and power doppler technology: an animal pilot study. *Stroke* 31 (7), 1728–1734. <https://doi.org/10.1161/01.str.31.7.1728>.
- Swanson, L.W., 2018. Brain maps 4.0—structure of the rat brain: an open access atlas with global nervous system nomenclature ontology and flatmaps. *J. Comp. Neurol.* 526 (6), 935–943. <https://doi.org/10.1002/cne.24381>.

- Vaz, P.G., Humeau-Heurtier, A., Figueiras, E., Correia, C., Cardoso, J., 2016. Laser speckle imaging to monitor microvascular blood flow: a review. *IEEE Rev. Biomed. Eng.* 9, 106–120. <https://doi.org/10.1109/RBME.2016.2532598>.
- Welniak-Kaminska, M., Fiedorowicz, M., Orzel, J., Bogorodzki, P., Modlinska, K., Stryjek, R., et al., 2019. Volumes of brain structures in captive wild-type and laboratory rats: 7T magnetic resonance in vivo automatic atlas-based study. *PLoS One* 14 (4), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215348>.
- Yoon, J.S., kyun, Nam T., taik, Kwon J., Park, S.W., Park, Y.S., 2015. CSF flow pathways through the ventricle–cistern interfaces in kaolin-induced hydrocephalus rats—laboratory investigation. *Childs Nerv. Syst.* 31 (12), 2277–2281. <https://doi.org/10.1007/s00381-015-2901-5>.

Supplementary material



Supplementary figure 1. Representative Doppler images of the main cerebral arteries by US. Coronal brain sections from anterior to posterior through a total craniotomy (A), delimited craniotomy (B), on the skull (C) and on the skin (D).



Review

The Role of Ultrasound as a Diagnostic and Therapeutic Tool in Experimental Animal Models of Stroke: A Review

Mari Carmen Gómez-de Frutos ^{1,2,†}, Fernando Laso-García ^{1,†}, Iván García-Suárez ^{1,3}, Luke Diekhorst ¹, Laura Otero-Ortega ¹, María Alonso de Leciñana ¹, Blanca Fuentes ¹, Dolores Piniella ¹, Gerardo Ruiz-Ares ^{1,‡}, Exuperio Díez-Tejedor ^{1,*} and María Gutiérrez-Fernández ^{1,*}

¹ Neurological Sciences and Cerebrovascular Research Laboratory, Department of Neurology and Stroke Centre, La Paz University Hospital, Neuroscience Area of IdiPAZ Health Research Institute, Universidad Autónoma de Madrid, 28046 Madrid, Spain; mcarmen.gomez@gmail.com (M.C.G.-d.F.); fernilaso.9@gmail.com (F.L.-G.); artedo05@yahoo.es (I.G.-S.); luke.diekhorst@gmail.com (L.D.); oteroortega.l@gmail.com (L.O.-O.); malecinanacases@salud.madrid.org (M.A.d.L.); blanca.fuentes@salud.madrid.org (B.F.); dolores.piniella.alcalde@idipaz.es (D.P.); adalbertog.ruiz@salud.madrid.org (G.R.-A.)

² PhD Program in Neuroscience, Department of Anatomy, Histology and Neuroscience, Universidad Autónoma de Madrid-Cajal Institute, 28029 Madrid, Spain

³ Emergency Service, San Agustín University Hospital, 33401 Avilés, Spain

* Correspondence: exuperio.diez@salud.madrid.org (E.D.-T.); mgutierrezfernandez@salud.madrid.org (M.G.-F.); Tel.: +34-91-207-1028 (M.G.-F. & E.D.-T.)

† These authors share first author position.

‡ These authors contributed equally to this work.



Citation: Gómez-de Frutos, M.C.; Laso-García, F.; García-Suárez, I.; Diekhorst, L.; Otero-Ortega, L.; Alonso de Leciñana, M.; Fuentes, B.; Piniella, D.; Ruiz-Ares, G.; Díez-Tejedor, E.; et al. The Role of Ultrasound as a Diagnostic and Therapeutic Tool in Experimental Animal Models of Stroke: A Review. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1609. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111609>

Academic Editor: Giuseppina Basta

Received: 7 October 2021

Accepted: 1 November 2021

Published: 3 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Ultrasound is a noninvasive technique that provides real-time imaging with excellent resolution, and several studies demonstrated the potential of ultrasound in acute ischemic stroke monitoring. However, only a few studies were performed using animal models, of which many showed ultrasound to be a safe and effective tool also in therapeutic applications. The full potential of ultrasound application in experimental stroke is yet to be explored to further determine the limitations of this technique and to ensure the accuracy of translational research. This review covers the current status of ultrasound applied to monitoring and treatment in experimental animal models of stroke and examines the safety, limitations, and future perspectives.

Keywords: animal model; hemorrhagic; ischemic; stroke; ultrasound

1. Introduction

Ultrasound has several well-known advantages, including its noninvasiveness, low cost, portability, safety, and rapid real-time imaging [1,2]. Point-of-care ultrasound therefore became an important modality for clinically evaluating critically ill and injured patients in emergency medicine [3–5]. Ultrasound could be an essential tool in many neurological diseases, particularly in stroke, in which “time is brain” and “imaging is brain” [6]. Ultrasound imaging not only enables the study of anatomical structures but also provides useful information on the organs’ function, blood vessel characteristics, and blood flow (Doppler imaging) [7]. Ultrasound can therefore help speed the decision-making process and improve and accelerate the diagnosis and treatment, resulting in reduced neurological sequelae.

Due to the enormous potential of ultrasound, we reviewed its application in experimental animal models of stroke (ischemic stroke and intracerebral hemorrhage [ICH]), in monitoring and therapeutics (Figure 1), and assessed its safety, limitations, and future perspectives.

For this review, we conducted a search on the Google Scholar, PubMed, and grey literature databases, employing the search terms ultrasound, ultrasonography, Doppler, microbubbles, stroke, ischemic stroke, hemorrhagic stroke, rat, animals, animal model, treatment,

For this review, we conducted a search on the Google Scholar, PubMed, and grey literature databases, employing the search terms ultrasound, ultrasonography, Doppler, microbubbles, stroke, ischemic stroke, hemorrhagic stroke, rat, animals, animal model, treatment, therapeutic, diagnostic, safety, limitations, brain, ultrasound frequency, low-frequency ultrasound, and high-frequency ultrasound. We restricted the search to animal studies, ultrasound, and stroke; however, no restriction was applied to the year of publication.

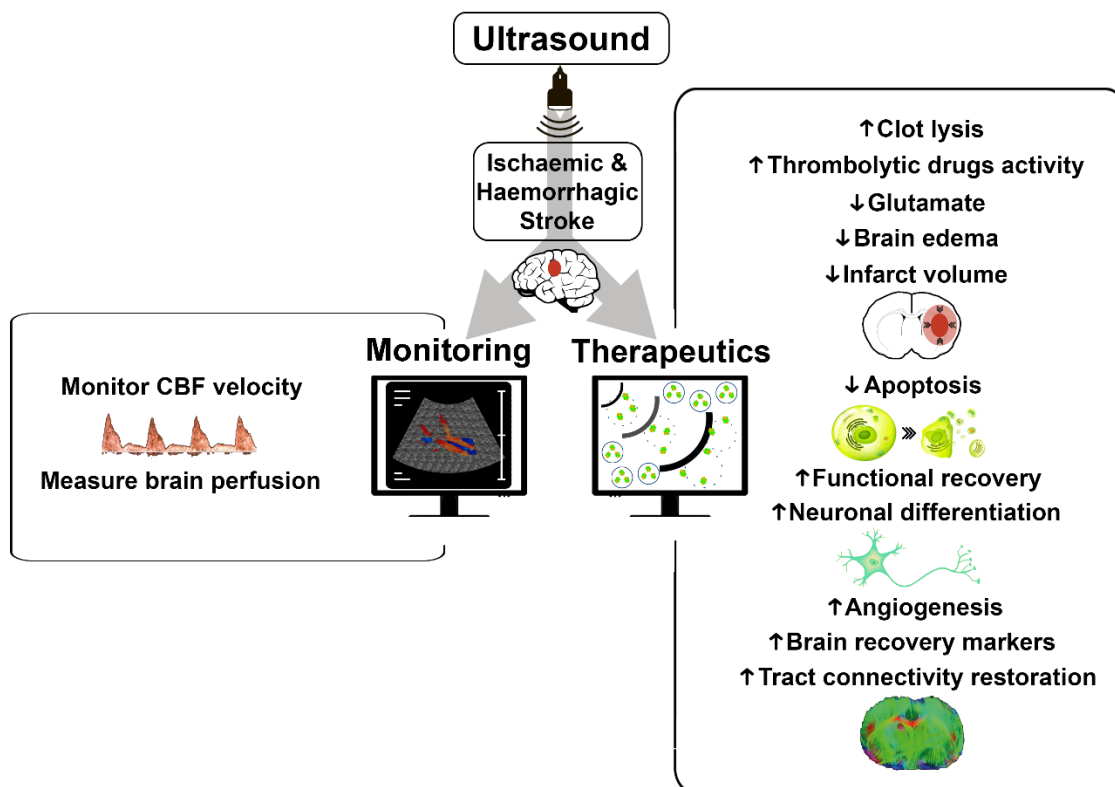


Figure 1. Potential of ultrasound in animal models of stroke. Ultrasound applied to brain after stroke can provide rapid and additional information for monitoring on a specific and local treatment. Main effects of ultrasound in monitoring and therapeutic tools are summarized in the figure. CBF: cerebral blood flow. Up arrow means increase and down arrow means decrease.

2. Ultrasound Applications in Ischemic Stroke

Ischemic stroke is the most common stroke type [8] and it occurs when a blood vessel is occluded by a thrombus or embolism, leading to loss of oxygen and glucose in cerebral tissue [9]. The resulting cerebral ischemia causes neuronal damage in the core zone shortly after onset. Surrounding the core zone is an area known as the penumbra [10], where the cells are not yet irreversibly damaged and can be recovered if cerebral blood flow (CBF) is restored [9]. Ultrasound can therefore play an important role in monitoring ischemic stroke.

2.1. Ultrasound Monitoring in Ischemic Stroke

In a 1999 study conducted on focal cerebral ischemia in rabbits, Els T et al. demonstrated the usefulness of ultrasound for the continuous monitoring of CBF velocity to follow rapid changes in the dynamics of the ischemic process [11], thereby offering a tool for stroke control from early monitoring to therapy. These changes in CBF were studied using contrast-enhanced ultrasound (CEUS) [12], Doppler velocimetry [13], and functional ultrasound [14]. Ultrasound contrast agents are encapsulated microbubbles in suspension with great echogenicity that can enhance the echo signals [15,16]. These microbubbles accumulate in the microvasculature providing anatomical reference information of molecular characteristics at target sites [15,16]. Microbubbles can be filled with air or gas. The most common gases are sulfur hexafluoride, decafluorobutane, perfluorobutane, perfluten, and octafluoropropane [15,16]. Microbubbles also need a cover to reduce gas diffusion into the blood. This cover can be made from polymers, lipids, or denatured albumin [15].

Along with the microbubble cover, other compounds like PEG (polyethylene glycol) can be used to enhance stability and reduce immune system recognition. Despite microbubbles are the most frequently used, other options, such as perfluorocarbon nanoparticles or echogenic liposomes, are being studied to improve ultrasound imaging [15]. Premilovac D et al. applied transcranial CEUS to rats with middle cerebral artery occlusion (MCAO) to measure cerebral perfusion after stroke in real-time. In this noninvasive manner, the authors observed a reduction in cerebral perfusion during ischemia and hyperperfusion during recanalization [12].

Doppler ultrasound made it possible to determine blood flow velocities in rats with ischemic stroke [17,18]. Specifically, ultrasound imaging of the circle of Willis made it possible to obtain information on cerebral collateral recruitment and thus the presence or absence of ischemic lesions, reflow, hemodynamic changes, and reperfusion, all of which can clarify the underlying recovery mechanism after stroke [17,18]. Functional ultrasound is a useful imaging technique for studying brain perfusion during and after MCAO in rats with acute and postacute stroke [14,19]. In a thromboembolic MCAO model of mice treated with tissue plasminogen activator (tPA), the ultrafast ultrasound study of brain reperfusion in the ischemic lesion helped predict the prognostic outcomes and thrombolytic treatment response [20]. There is also an enhanced form of Doppler ultrasound known as the triplex ultrasonographic mode, which can be useful for studying blood flow in experimental animal models of stroke [13] (Table 1). This evidence indicates that ultrasound is a feasible, effective, and rapid method for evaluating/monitoring the dynamics of the ischemic process in experimental studies.

2.2. Therapeutic Ultrasound in Ischemic Stroke

In a 1974 study by Sobbe et al., ultrasound was employed to recanalize thrombosed femoral arteries in dogs, obtaining good results with no complications [40]. The application of low- or high-intensity pulsed ultrasound in an MCAO rat model opens possibilities for developing new therapies [21,22]. Specifically, low-intensity pulsed ultrasound (0.5 MHz) might have protective effects and promote CBF [21], while 1 MHz can trigger the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), reduce brain damage [23], and reduce neuronal apoptosis [24]. Low-intensity pulsed ultrasound (2 MHz) can reduce brain oedema and ischemic damage [24], thus facilitating the recovery of ischemic areas. In a mouse stroke model after the administration of human bone marrow mesenchymal stem cells, ultrasound was shown to promote neuronal differentiation, improving functional recovery, and reducing infarct volume [25].

Ultrasound is known to enhance thrombolytic drug activity [41,42] and to improve clot lysis. High-intensity focused ultrasound (1.5 MHz) initiates thrombolysis safely and effectively in rabbits subjected to an embolic stroke [43]. Low-intensity ultrasound (25.570 Hz) was employed in parallel to tPA infusion in a rat model of embolic ischemic stroke. The combination was more effective than tPA treatment alone in reducing infarct volume [26]. The administration of microbubbles, with or without tPA, can further enhance ultrasound thrombolysis [27,44,45]. Gao S et al. reported that intravenous microbubble administration (without tPA) and the use of ultrasound improved CBF by recanalizing the ipsilateral carotid artery of pigs [28]. This strategy also reduced infarct volume in rabbits with internal carotid embolization [29] and reduced glutamate concentration, suggesting a protective role for ultrasound and microbubbles in rats with acute ischemic stroke [30]. The combination of tPA and microbubble+ultrasound in a rabbit arterial embolic stroke model led to a reduction in infarct volume and hemorrhage formation [27] and improved microvascular patency in rats after MCAO [31]. Culp WC et al. demonstrated that the intravenous administration of microbubbles loaded with a glycoprotein 2b/3a receptor antagonist successfully augmented the effect of transcutaneous low-frequency ultrasound (1 MHz) in dissolving acute intracranial thrombi without thrombolytic drugs in a swine stroke model [32].

Table 1. Main experimental animal models of stroke (ischemic stroke and intracerebral hemorrhage) using ultrasound with monitoring and therapeutic application.

| ISCHEMIC STROKE | | | | | | | |
|---------------------|-------------------------|-------------|--------------------------------------|-----------|--|---|--|
| Reference | Sex/Species/n | Stroke type | Ultrasound | Frequency | Duration | Application | Findings |
| Els T. [11] | M/New Zealand rabbits/9 | MCAO | Transcranial Doppler | 4 MHz | Burst interval of 2 s | Monitoring: CBF velocity measurements | Decrease in CBF in the affected hemisphere |
| Premilova D. [12] | M/SD rats/16 | MCAO | Transcranial CEU | 15.2 Hz | 3 times, 60 s | Monitoring: CBF velocity measurements | Hyperemia poststroke |
| Brunner C. [14] | M/SD rats/18 | MCAO | fUS | 15 MHz | 3 min | Monitoring: CBF velocity measurements | Mapping changes of CBF in stroke |
| Li L. [17] | M/SD rats/12 | MCAO | Transcranial Doppler ultrasonography | 6.3 MHz | – | Monitoring: CBF velocity measurements | Redistribution of CBF after stroke |
| Bonnin P. [18] | M&F/Wistar rats/92 | MCAO | Colour Doppler | 12 MHz | 15 min | Monitoring: CBF velocity measurements | Collateral CBF protective role |
| Brunner C. [19] | M/SD rats/12 | MCAO | fUS | 1.43 MHz | 30 min (baseline), 90 min (occlusion period) and 90 min (after clip removal) | Monitoring: CBF velocity measurements | Contralesional CBF response after stroke |
| Hingot V. [20] | M/Swiss mice/19 | MCAO | Ultrafast | 500 Hz | – | Monitoring: CBF measurements | Hypoperfusion in ischemic lesion after stroke |
| Guo T. [21] | M/SD rats/38 | MCAO | pTUS | 0.5 MHz | 60 min | Therapeutic: protective role of ultrasound | Promotion of CBF, decrease of ischemic lesion |
| Alexandrov AV. [22] | –/Long-Evans rats/32 | MCAO | Pulsed-wave transcranial | 2 MHz | 90 min | Therapeutic: effect on infarct volume | Reduction of ischemic brain damage and oedema Promotion of microcirculation |
| Chen CM. [23] | M/C57BL/6 mice/18 | MCAO | Low-intensity pulsed | 1 MHz | 15 min daily | Therapeutic: protective effect | Reduction of brain damage VEGF levels recovered Increase BDNF protein expression |
| WU CT. [24] | M/C57BL/6 mice/40 | MCAO | Low-intensity pulsed | 1 MHz | 15 min daily | Therapeutic: prevention of recurrent stroke | Reduction of lethality rate Prevent histopathological changes in brain |

Table 1. Cont.

| ISCHEMIC STROKE | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------|-----------|------------------|---|--|
| Reference | Sex/Species/n | Stroke type | Ultrasound | Frequency | Duration | Application | Findings |
| Cho SE. [25] | M/C57BL/6N mice/30 | Photothrombosis | – | 0.04 MHz | 20 min/day | Therapeutic: evaluation of ultrasound effect <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> | Promotion of neuronal differentiation and neurogenesis |
| Daffertshofer M. [26] | –/Wistar & SD rats/47 | Embolic stroke | Low-intensity | 22.570 Hz | 1 h | Therapeutic: ultrasound with tPA | Reduction of infarct volume |
| Brown AT. [27] | –/New Zealand rabbits/– | Emboli | – | 1 MHz | 60 min | Therapeutic: ultrasound and MB with tPA | Significant clot lysis. Reduction of infarct volume and ICH |
| Gao S. [28] | –/Pigs/– | Bilateral ICAO | Transcranial | 1.6 MHz | 5 and 20 μ s | Therapeutic: ultrasound w/o MB | Improvement in CBF |
| Culp WC. [29] | –/New Zealand Rabbits/74 | Internal carotid embolization | Pulsed-wave | 1 MHz | 1 h | Therapeutic: ultrasound and MB or tPA | Reduction of infarct volume |
| Fatar M. [30] | M/Wistar rats/16 | MCAO | TCCD | 2 MHz | 30 min | Therapeutic: ultrasound and MB | Reduction of infarct volume |
| Schleicher N. [31] | M/Wistar rats/36 | MCAO | Transcranial | 3 MHz | 60 min | Therapeutic: ultrasound and MB with tPA | Improvement of microvascular patency |
| Culp WC. [32] | –/Pigs/15 | Autogenous thrombus | LFUS | 1 MHz | 24 min | Therapeutic: ultrasound and MB with glycoprotein | Augmented thrombolysis |
| Rodríguez-Frutos B. [33] | M/SD rats/143 | Subcortical stroke | UTMD | 7 MHz | 5 min | Therapeutic: ultrasound and MB with trophic factor | Functional recovery. Fiber connectivity restoration Increased brain marker expression |
| Zhao R. [34] | M/SD rats/30 | Intraluminal MCA blockage | UTMD | 1.03 MHz | 60 s | Therapeutic: ultrasound and MB with phosphatidylserine | Reduction in time of BBB opening Produced an early activated microglia/macrophage |
| Wang HB. [35] | F/CD1 mice/– | Transient MCAO | UTMD | 1.6 MHz | 5 min | Therapeutic: ultrasound and MB with VEGF gene | Infarct areas and apoptosis reduction Increased vessel density |

Table 1. Cont.

| HEMORRHAGIC STROKE | | | | | | | |
|--------------------|------------------|-------------|------------------------------|-----------|------------------------------------|--|--|
| Reference | Species | Stroke type | Ultrasound type | Frequency | Duration | Application | Findings |
| Mu HM. [36] | M/SD rats/280 | ICH | Therapeutic | 1 MHz | 15 min, once daily | Therapeutic: effects on brain angiogenesis | Increase expression of integrins and collagen Microvessels formation promotion Functional recovery |
| Ke Z. [37] | M/SD rats/18 | ICH | Transcranial Doppler | 4–13 MHz | – | Monitoring: CBF velocity measurements | Flow velocity changes after stroke |
| Stroick M. [38] | M/Wistar rats/14 | ICH | Transcranial | 2 MHz | 30 min | Therapeutic: ultrasound and MB safety | Ultrasound + MB due not increase additional damage |
| Zhou X. [39] | M/Dogs/12 | ICH | Contrast-enhanced ultrasound | 7 MHz | Every 30 min until hematoma formed | Monitoring: hematoma visualization | Brain hemorrhage imaging |

Abbreviations: BBB, blood brain barrier; CBF, cerebral blood flow; CEU, contrast-enhanced ultrasound; F, female; fUS, functional ultrasound; ICAO, internal carotid artery occlusion; ICH, intracerebral haemorrhage; LFUS, low-frequency ultrasound; M, male; MB, microbubbles; MCA, middle cerebral artery; MCAO, middle cerebral artery occlusion; MHz, megahertz; pTUS, pulsed transcranial ultrasound; SD, Sprague-Dawley; TCCD, transcranial color-coded duplex sonography; tPA, tissue plasminogen activator; UTMD, ultrasound-targeted microbubble destruction; –, not indicated.

Ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD) is a technique that uses low-frequency moderate-power ultrasound in combination with microbubbles that encapsulate drugs to enhance drug delivery into tissues. Ultrasound can increase microvessel permeability and trigger cavitation, thus allowing transport of microbubbles and release of drugs into the desired area [46,47].

Moreover, one of the applications of ultrasound in the brain is the temporary opening of the blood brain barrier (BBB) [48]. The detailed mechanism behind ultrasound-mediated BBB disruption is still under investigation, but two major mechanisms were proposed as an explanation. Both stable and inertial cavitation together with microbubbles can help open the BBB. However, whereas stable cavitation disrupts the BBB via wobbled expansion and contraction of microbubbles, inertial cavitation is caused by the violent collapse of the microbubbles, which could lead to vascular damage [49]. The first study of ultrasound-induced BBB opening showed small lesions with severe parenchymal damage [50]. Recent research has indicated that low-frequency and focused ultrasound noninvasively opens the BBB and increase expression of caveolin, which plays an important role in the transport of large vesicles [51,52]. The duration of BBB disruption is also under investigation and might be related to the diameter of the delivered substances. Small particles of 1 nm can cross several hours after BBB disruption, with complete BBB restoration after 24 h; 4 nm particles stopped crossing the BBB after 2 h [53]. Regardless of the duration of the BBB opening, cavitation allows large molecules and genes to cross the plasma membranes of cultured cells after the application of acoustic energy [54,55]. These findings improve our understanding of how ultrasound influences the BBB and help the development of new drugs.

Drug-loaded microbubbles can be excited and broken by ultrasound thus releasing substances to desired targets and, increasing the local drug concentration. For example, microbubble encapsulation and ultrasound delivery of BDNF to the lesion site improves functional recovery, which is associated with tract connectivity restoration, remyelination, and brain recovery markers in a rat model of ischemic stroke [33]. The release of phosphatidylserine contained in microbubbles using ultrasound activated microglia during neuroinflammation after stroke in rats [34]. UTMD could be also used in gene therapy. For instance, it was applied in mice after transient MCAO for delivery of *VEGF* (Vascular Endothelial Growth Factor) gene and demonstrated a reduction in ischemic injury [35] (Table 1).

3. Ultrasound Applications in Intracerebral Hemorrhage

ICH is produced by blood extravasation into the brain [39], with a significant increase in volume growth after the first few hours [36,56]. ICH lacks effective treatments, leading to high mortality and morbidity [36,39] and producing severe neurological outcomes. Therefore, the early detection of ICH and the development of effective therapeutic approaches assume great importance, with ultrasound-based technologies opening up a promising field of research and treatment.

3.1. Ultrasound Monitoring in Intracerebral Hemorrhage

Few studies employed it in an experimental animal model of ICH. Doppler can be used in ICH to study tissue perfusion in animal models [37]. To our knowledge, the study by Ke Z et al. [37] is the only one to use high-frequency Doppler ultrasound (4–13 MHz) to analyze blood flow velocity changes in certain arteries in rats before and after ICH. As the authors noted in the study, this tool could be employed in future studies combined with protective agents that affect cerebral hemodynamics after ICH [37] (Table 1).

Despite the use of ultrasound in ischemic stroke, ultrasound is underutilized in the monitoring of ICH, resulting from a lack of scientific evidence in this field. B-mode ultrasound could be used to monitor hematoma volume in experimental models of ICH.

3.2. Therapeutic Ultrasound in Intracerebral Hemorrhage

Only a few studies employed ultrasound as treatment for ICH. Repeated applications of ultrasound in rats following ICH were shown to promote brain angiogenesis by enhancing the expression of extracellular matrix molecules (such as collagen and integrins) and accelerating neurological recovery [36]. Stroick M et al. demonstrated that ultrasound combined with microbubbles did not increase the hematoma volume, brain oedema extent, or apoptosis rate in rat brains during ICH [38]. Moreover, in a study conducted in dogs with ICH, the tandem ultrasound-microbubbles was used visualizing successfully the hematoma through the bone window [39] (Table 1).

4. Safety of Ultrasound

Safety is the primary consideration when applying a technique in *in vivo* research. Brain barriers are crucial in neurological diseases. Preclinical studies in animals provide an overwhelming advantage when evaluating the safety of ultrasound exposure, given that there are various methods to evaluate the BBB integrity that cannot be performed on humans. The most commonly used technique to assess the opening of the BBB in preclinical studies was the administration of Evans Blue [57].

This chemical is intravenously administered during exposure with ultrasound and its extravasation to the brain parenchyma is studied using a fluorescence microscope post-mortem [33]. More advanced techniques allow for the observation of BBB integrity *in vivo*. The use of a gadolinium-based contrast can be imaged by magnetic resonance imaging (MRI), assessing BBB opening after ultrasound exposure and evaluating the extravasation of this agent into the brain parenchyma [58]. Lastly, hemorrhagic transformation is an important concern to consider because ultrasound exposure could disrupt the integrity of vessels in the brain. The presence of hemorrhage can be analyzed in animal models by using hematoxylin and eosin, Nissl staining in postmortem tissue and by MRI *in vivo* [59]. Immunohistochemistry and immunofluorescence are techniques used to evaluate the safety of ultrasound exposure by analyzing the integrity of the blood vessels by using antibodies against ZO-1 (Zona Occludens-1) or lectin markers [33]. These techniques also allow us to analyze apoptosis, necrosis, abnormal cell migration and membrane dysfunction in the parenchyma using a fluorescence microscope postmortem.

Several parameters are important to safety, such as frequency, intensity, mechanical index, duty cycle or pulse repetition frequency, no consensus was reached. Since different settings are used for monitoring and treatment using ultrasound, the safety concerns will be treated separately.

4.1. Safety Data of Ultrasound in Monitoring Stroke

Several studies using ultrasound imaging in animal models have reported no tissue damage using a 6.3 MHz linear transducer [17], 12 MHz linear transducer [18] and 15 MHz linear array transducer [14] in MCAO models. Other studies applied imaging ultrasound in an embolic stroke model using a 12 MHz linear transducer and did not report secondary effects [60]. Moreover, imaging ultrasound was also applied in an animal model of ICH using 13–14 MHz transcranial Doppler ultrasonography and did not report secondary hemorrhages [37]. Other studies examined the brain's blood flow and anatomical structures in healthy animals using a 13 MHz linear transcranial transducer [61] and 16 MHz transducer [62]. Considering these studies, the range of 12–16 MHz frequencies to be safe for imaging in the animal brain. However, other frequencies of ultrasound, such as 20 MHz, were shown to initiate cellular injury by inactivating several enzymes and causing free radical production in the brain [63], and ultrasound exposure of 3 MHz increased antioxidant enzyme activities in the rat brain [64]. Therefore, demonstrating safety at the 12–16 MHz frequency range does not directly lead to safety at lower frequencies. Further studies investigating the safety of ultrasound during imaging would help set limits on the machine output parameters and determine which frequency range is adequate and safe to use.

4.2. Safety Data of Therapeutic Ultrasound in Stroke

When ultrasound is used as a treatment, the waves need more energy compared with that of imaging applications. The absorption of energy within tissue leads to a rise in temperature. This phenomenon is known as the thermal effect [65]. The magnitude and duration of the temperature increase may cause tissue damage. Ultrasound waves also lead to mechanical effects that result in pressure changes, shear forces, and cellular damage with molecule release [65].

Lower frequencies demonstrated safety in experimental animal models of stroke: 0.5 MHz may have protective effects and promote CBF [21], 1 MHz can reduce brain damage [23] and neuronal apoptosis [24], and 2 MHz can reduce brain oedema and ischemic injury [22]. For ultrasound enhanced thrombolysis frequencies of 1.5 MHz [43] was shown to be safe.

Some studies analyzed how microbubble cavitation threshold can be reduced when combined with ultrasound [66]. Cavitation is indicated by the mechanical index [67], this is another important parameter to take into account for the safety of the technique. Although the optimal mechanical index to be used is yet to be determined [68], the British Medical Ultrasound Society established a mechanical index limit of 0.7 for microbubble cavitation [69]. Not only is the mechanical index important when evaluating the safety of ultrasound-induced microbubble cavitation as a treatment for stroke, but also the frequency is a relevant parameter. The first study that demonstrated the safety of combined ultrasound and microbubbles after acute cerebral ischemia in rats was performed by Fatar M et al. in 2008 and used 2 MHz of frequency [30]. Since then, ultrasound cavitation of microbubbles was also shown to not induce secondary hemorrhage in animal models of ischemia using frequencies between 1.6 and 7 MHz [53,55,70], and in models of hemorrhage using 2 MHz [38].

Another relevant safety aspect to consider is the intensity. Intensities 57 and 86 mW/cm² [21], 128 mW/cm² [22], and 528 mW/cm² [23] used as a therapy to promote brain protection and reduce ischemic damage were found to be safe in an experimental animal model of stroke.

The use of continuous Doppler mode was shown to induce greater tissue damage than the pulsed application in animal models. Schneider F et al. showed that transcranial application of 20 kHz continuous ultrasound as a treatment in rats caused vasogenic and cytotoxic brain oedema and a loss of neuronal cells, resulting in a higher death cell rate [71]. To prevent brain damage, as mentioned before, pulsed mode emerged as an option to reduce the adverse effects in terms of mortality, lesion volume and recovery [72]. The pulse repetition frequency of each mode should also be taken into consideration. In one study, the ischemic core was exposed to an ultrasound signal for 360 trials of 0.4 s every 10 s, which did not produce any adverse effects [21]. Another study targeted ultrasound on the injured cortical areas in rats every 5 min for 15 min per day for a maximum of 5 days, which also did not produce any adverse effects [23]. Again, no adverse effects were found when rats received 1 ms ultrasound bursts every second for 20 s [43]. Another study directed ultrasound waves at the left hemisphere for 5 min, giving ultrasound bursts every 500 ms; no adverse effects were detected [35]. No tissue damage was detected when using ultrasound with a duty cycle of 20% for 1 h in parallel to recombinant tPA infusion [26].

5. Limitations and Future of Ultrasound

5.1. Limitations of Ultrasound

Despite all its advantages, ultrasound currently has certain limitations. The technique requires the knowledge and expertise of a well-trained operator [2], and therefore caution is necessary when acquiring and interpreting images. A standardization of ultrasound parameters is also needed, given that several studies have failed to report the intensity, duration and mechanical index employed, hindering the studies' reproducibility [73]. Another limitation of ultrasound is its reduced penetration in the presence of bone structures [2,74]. In certain studies, this limitation was countered by thinning or removing the skull [14,75],

which causes additional damage. The lack of scientific articles on the use of ultrasound in experimental models of stroke also highlights the need for further research in this area, especially in ICH.

5.2. Future of Ultrasound in Preclinical Models

5.2.1. New Approaches of Ultrasound

The information on brain anatomy provided by ultrasound may help research on neurological diseases. B-mode echography was proven as a feasible tool for noninvasively studying anatomical structures of the rat brain [61] and, Superb Microvascular Imaging (SMI), an advanced and innovative ultrasound mode based on Doppler, allows study of microvascular blood flow with and without contrast agents, enabling the creation of an innovative vascular brain map [61].

Technological advances such as “ultrafast” ultrasound systems can process thousands of frames per second. The study conducted by Macé E et al. employed this technique to quantify blood perfusion differences in the rat brain [76]. Ultrasound localization microscopy (a super-resolution ultrasound imaging based on ultrafast ultrasound) increased sensitivity and image definition, enabling the study of cerebral blood volumes in mice after stroke [20]. This ultrasound modality could become an interesting tool for obtaining deep super-resolution vascular images and providing improved transcranial imaging.

Tan JK et al. demonstrated that gene transfer after prior administration in the intraventricular area could be increased by the use of ultrasound through a temporal opening of the choroid plexus epithelium [77]. The combined use of ultrasound-mediated BBB opening and microbubbles for drugs or gene delivery could be further developed for future clinical applications. Currently, several clinical trials are underway assessing the safety of BBB disruption in a variety of diseases [78]. Lastly, stem cell-based therapies offer a promising view of stroke treatment. In this field, a new therapeutic approach for ultrasound could be based on the biological effect of focus ultrasound in increasing the efficacy of stem cell homing in the brain parenchyma after their intravenous administration [79].

These advances could enhance the widespread use of ultrasound and its variants in future preclinical studies, as well as in the clinic. The versatility of ultrasound and its prospects provide the option of obtaining data in real-time and could lead to shorter delays to treatments for various neurological diseases.

5.2.2. Imaging 3D/4D in Ultrasound

Other novel techniques, such as 3D and 4D model ultrasound, could emerge as powerful modalities of choice in the diagnosis of various diseases [80]. Work performed on rodents [81,82], pigeons [83], and ferrets [84] were able to construct 3D maps of brain activity and to obtain 3D vascular imaging. Additionally, we also find ultrasound neuroimaging in 4D. In preclinical studies, 4D ultrasound microvascular imaging could become a valuable tool for studying brain hemodynamics, cerebral flow autoregulation and vascular remodeling after stroke [85]. Also, it was demonstrated that 4D functional ultrasound can be used to obtain 4D functional connectivity in rats [86]. These results suggest a possible new modality for neuroimaging of the brain that could expand the observation and study of the whole brain in animal models

6. From Preclinical Models to Clinical Practice

In humans, ultrasound is used extensively and the possibility of developing new advances for monitoring or therapeutic purposes in animals may help to expand its use in the clinic. Being able to use ultrasound in the laboratory will accentuate the similarity between the two scenarios, which is fundamental in translational research.

Ultrasound is widely used as a diagnostic tool in patients with ischemic stroke [7]. However, is not routinely employed in patients with ICH, despite its potential role in the measurement of ICH volume and growth [1,39,87,88].

In clinical practice, ultrasound was used ad and adjuvant to thrombolysis, the so-called sonothrombolysis. This approach improves arterial recanalization and functional outcomes. [89]. However, there is a shortfall in the translation of therapeutic studies with microbubbles. Currently, in vitro and in vivo studies are exploring the possibility to enhance transgene expression and targeted drug delivery without adverse effects [90]. For this reason, development in ultrasound application with microbubbles will allow new therapeutical approaches for stroke patients.

7. Conclusions

Ultrasound is a noninvasive, low-cost, rapid, and safe technique whose versatility makes it an imaging tool worth considering for stroke, given that stroke requires rapid and appropriate action. In preclinical studies of stroke (ischemic stroke and ICH), ultrasound proved to be useful in monitoring and as a therapeutic tool, and its safety profile was demonstrated in various experimental animal models. At present, however, only a few studies were performed on its use in stroke, particularly regarding ICH. The lack of scientific data on the application of ultrasound in the preclinical field of stroke necessitates continuing the study of this promising imaging technique to solve its present limitations and to safely transfer the results from bench to bedside.

Author Contributions: Writing—original draft preparation, M.C.G.-d.F. and F.L.-G.; writing—review & editing, I.G.-S., L.D., L.O.-O., M.A.d.L., B.F., D.P., G.R.-A., E.D.-T. and M.G.-F.; conceptualization, writing—review & editing, M.G.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Carlos III Health Institute Health Care Research Fund grant number FIS PI16/01052 and cofunded by the European Regional Development Fund (ERDF)—Miguel Servet (CP15/00069, CPII20/00002 to María Gutiérrez-Fernández; CP20/00024 to Laura Otero-Ortega) and predoctoral fellowship (FI17/00188 to Mari Carmen Gómez-de Frutos, FI18/00026 to Fernando Laso-García) and the INVICTUS PLUS Spanish Network (RD16/0019/0005) of the Carlos III Health Institute (ISCIII).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We appreciate the support of Morote traducciones S.L. for their editing assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Meyer-Wiethe, K.; Sallustio, F.; Kern, R. Diagnosis of intracerebral hemorrhage with transcranial ultrasound. *Cerebrovasc. Dis.* **2009**, *27*, 40–47. [[CrossRef](#)]
2. Greco, A.; Mancini, M.; Gargiulo, S.; Gramanzini, M.; Claudio, P.P.; Brunetti, A.; Salvatore, M. Ultrasound biomicroscopy in small animal research: Applications in molecular and preclinical imaging. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 519238. [[CrossRef](#)]
3. Neri, L.; Storti, E.; Lichtenstein, D. Toward an ultrasound curriculum for critical care medicine. *Crit. Care Med.* **2007**, *35* (Suppl. S5), S290–S304. [[CrossRef](#)]
4. Bobbia, X.; Zieleskiewicz, L.; Pradeilles, C.; Hudson, C.; Muller, L.; Claret, P.G.; Group, W.F. The clinical impact and prevalence of emergency point-of-care ultrasound: A prospective multicenter study. *Anaesth. Crit. Care Pain Med.* **2017**, *36*, 383–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Weile, J.; Frederiksen, C.A.; Laursen, C.B.; Graumann, O.; Sloth, E.; Kirkegaard, H. Point-of-care ultrasound induced changes in management of unselected patients in the emergency department—a prospective single-blinded observational trial. *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* **2020**, *28*, 47. [[CrossRef](#)]
6. Puig, J.; Shankar, J.; Liebeskind, D.; Terceño, M.; Nael, K.; Demchuk, A.M.; Menon, B.; Dowlatshahi, D.; Leiva-Salinas, C.; Demchuk, A.M.; et al. From “Time is Brain” to “Imaging is Brain”: A Paradigm Shift in the Management of Acute Ischemic Stroke. *J. Neuroimaging* **2020**, *30*, 562–571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Liu, Y.; Hua, Y.; Feng, W.; Ovbiagele, B. Multimodality ultrasound imaging in stroke: Current concepts and future focus. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **2016**, *14*, 1325–1333. [[CrossRef](#)]

8. Ojaghhighi, S.; Vahdati, S.S.; Mikaeilpour, A.; Ramouz, A. Comparison of neurological clinical manifestation in patients with hemorrhagic and ischemic stroke. *World J. Emerg. Med.* **2017**, *8*, 34–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Rink, C.; Khanna, S. Significance of brain tissue oxygenation and the arachidonic acid cascade in stroke. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *14*, 1889–1903. [[CrossRef](#)]
10. Prabhakaran, S.; Ruff, I.; Bernstein, R.A. Acute stroke intervention: A systematic review. *JAMA* **2015**, *313*, 1451–1462. [[CrossRef](#)]
11. Els, T.; Daffertshofer, M.; Schroeck, H.; Kuschinsky, W.; Hennerici, M. Comparison of transcranial Doppler flow velocity and cerebral blood flow during focal ischemia in rabbits. *Ultrasound Med. Biol.* **1999**, *25*, 933–938. [[CrossRef](#)]
12. Premilovac, D.; Blackwood, S.J.; Ramsay, C.J.; Keske, M.A.; Howells, D.W.; Sutherland, B.A. Transcranial contrast-enhanced ultrasound in the rat brain reveals substantial hyperperfusion acutely post-stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2020**, *40*, 939–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kreis, D.; Schulz, D.; Stein, M.; Preuss, M.; Nestler, U. Assessment of parameters influencing the blood flow velocities in cerebral arteries of the rat using ultrasonographic examination. *Neurol. Res.* **2011**, *33*, 389–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Brunner, C.; Isabel, C.; Martin, A.; Dussaux, C.; Savoye, A.; Emmrich, J.; Montaldo, G.; Mas, J.L.; Baron, J.C.; Urban, A. Mapping the dynamics of brain perfusion using functional ultrasound in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2017**, *37*, 263–276. [[CrossRef](#)]
15. Dayton, P.A.; Rychak, J.J. Molecular ultrasound imaging using microbubble contrast agents. *Front. Biosci.* **2007**, *12*, 5124–5142. [[CrossRef](#)]
16. Chong, W.K.; Papadopoulou, V.; Dayton, P.A. Imaging with ultrasound contrast agents: Current status and future. *Abdom. Radiol.* **2018**, *43*, 762–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Li, L.; Ke, Z.; Tong, K.Y.; Ying, M. Evaluation of Cerebral Blood Flow Changes in Focal Cerebral Ischemia Rats by Using Transcranial Doppler Ultrasonography. *Ultrasound Med. Biol.* **2010**, *36*, 595–603. [[CrossRef](#)]
18. Bonnin, P.; Leger, P.L.; Deroide, N.; Fau, S.; Baud, O.; Pocard, M.; Charriaut-Marlangue, C.; Renolleau, S. Impact of intracranial blood-flow redistribution on stroke size during ischemia-reperfusion in 7-day-old rats. *J. Neurosci. Methods* **2011**, *198*, 103–109. [[CrossRef](#)]
19. Brunner, C.; Korostelev, M.; Raja, S.; Montaldo, G.; Urban, A.; Baron, J.C. Evidence from functional ultrasound imaging of enhanced contralesional microvascular response to somatosensory stimulation in acute middle cerebral artery occlusion/reperfusion in rats: A marker of ultra-early network reorganization? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2018**, *38*, 1690–1700. [[CrossRef](#)]
20. Hingot, V.; Brodin, C.; Lebrun, F.; Heiles, B.; Chagnot, A.; Yetim, M.; Gauberti, M.; Orset, C.; Tanter, M.; Couture, O.; et al. Early Ultrafast Ultrasound Imaging of Cerebral Perfusion correlates with Ischemic Stroke outcomes and responses to treatment in Mice. *Theranostics* **2020**, *10*, 7480–7491. [[CrossRef](#)]
21. Guo, T.; Li, H.; Lv, Y.; Lu, H.; Niu, J.; Sun, J.; Yang, G.Y.; Ren, C.; Tong, S. Pulsed transcranial ultrasound stimulation immediately after the ischemic brain injury is neuroprotective. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2015**, *62*, 2352–2357. [[CrossRef](#)]
22. Alexandrov, A.V.; Barlinn, K.; Strong, R.; Alexandrov, A.W.; Aronowski, J. Low-Power 2-MHz Pulsed-Wave Transcranial Ultrasound Reduces Ischemic Brain Damage in Rats. *Transl. Stroke Res.* **2011**, *2*, 376–381. [[CrossRef](#)]
23. Chen, C.M.; Wu, C.T.; Yang, T.H.; Liu, S.H.; Yang, F.Y. Preventive Effect of Low Intensity Pulsed Ultrasound against Experimental Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury via Apoptosis Reduction and Brain-derived Neurotrophic Factor Induction. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5568. [[CrossRef](#)]
24. Wu, C.T.; Yang, T.H.; Chen, M.C.; Chung, Y.P.; Guan, S.S.; Long, L.H.; Liu, S.H.; Chen, C.M. Low Intensity Pulsed Ultrasound Prevents Recurrent Ischemic Stroke in a Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury Mouse Model via Brain-derived Neurotrophic Factor Induction. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cho, S.E.; Kim, Y.M.; Jeong, J.S.; Seo, Y.K. The effect of ultrasound for increasing neural differentiation in hBM-MSCs and inducing neurogenesis in ischemic stroke model. *Life Sci.* **2016**, *165*, 35–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Daffertshofer, M.; Huang, Z.; Fatar, M.; Popolo, M.; Schroeck, H.; Kuschinsky, W.; Moskowitz, M.A.; Hennerici, M.G. Efficacy of sonothrombolysis in a rat model of embolic ischemic stroke. *Neurosci. Lett.* **2004**, *361*, 115–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Brown, A.T.; Flores, R.; Hamilton, E.; Roberson, P.K.; Borrelli, M.J.; Culp, W.C. Microbubbles improve sonothrombolysis in vitro and decrease hemorrhage in vivo in a rabbit stroke model. *Investig. Radiol.* **2011**, *46*, 202–207. [[CrossRef](#)]
28. Gao, S.; Zhang, Y.; Wu, J.; Shi, W.T.; Lof, J.; Vignon, F.; Drvol, L.; Xie, F.; Muirhead, D.; Powers, J.E.; et al. Improvements in cerebral blood flow and recanalization rates with transcranial diagnostic ultrasound and intravenous microbubbles after acute cerebral emboli. *Investig. Radiol.* **2014**, *49*, 593–600. [[CrossRef](#)]
29. Culp, W.C.; Flores, R.; Brown, A.T.; Lowery, J.D.; Roberson, P.K.; Hennings, L.J.; Woods, S.D.; Hatton, J.H.; Culp, B.C.; Skinner, R.D.; et al. Successful Microbubble Sonothrombolysis without Tissue Plasminogen Activator in a Rabbit Model of Acute Ischemic Stroke. *Stroke* **2011**, *42*, 2280–2285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Fatar, M.; Stroick, M.; Griebbe, M.; Alonso, A.; Kreisel, S.; Kern, R.; Hennerici, M.; Meairs, S. Effect of Combined Ultrasound and Microbubbles Treatment in an Experimental Model of Cerebral Ischemia. *Ultrasound Med. Biol.* **2008**, *34*, 1414–1420. [[CrossRef](#)]
31. Schleicher, N.; Tomkins, A.J.; Kampschulte, M.; Hyvelin, J.M.; Botteron, C.; Juenemann, M.; Yeniguen, M.; Krombach, G.A.; Kaps, M.; Spratt, N.J.; et al. Sonothrombolysis with BR38 microbubbles improves microvascular patency in a rat model of stroke. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0152898. [[CrossRef](#)]
32. Culp, W.C.; Porter, T.R.; Lowery, J.; Xie, F.; Roberson, P.K.; Marky, L. Intracranial clot lysis with intravenous microbubbles and transcranial ultrasound in swine. *Stroke* **2004**, *35*, 2407–2411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Rodríguez-Frutos, B.; Otero-Ortega, L.; Ramos-Cejudo, J.; Martínez-Sánchez, P.; Barahona-Sanz, I.; Navarro-Hernanz, T.; Gómez-de Frutos, M.C.; Díez-Tejedor, E.; Gutiérrez-Fernández, M. Enhanced brain-derived neurotrophic factor delivery by ultrasound and microbubbles promotes white matter repair after stroke. *Biomaterials* **2016**, *100*, 41–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zhao, R.; Jiang, J.; Li, H.; Chen, M.; Liu, R.; Sun, S.; De, M.; Liang, X.; Wang, S. Phosphatidylserine-microbubble targeting-activated microglia/macrophage in inflammation combined with ultrasound for breaking through the blood-brain barrier. *J. Neuroinflamm.* **2018**, *15*, 334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wang, H.B.; Yang, L.; Wu, J.; Sun, L.; Wu, J.; Tian, H.; Weisel, R.D.; Li, R.K. Reduced ischemic injury after stroke in mice by angiogenic gene delivery via ultrasound-targeted microbubble destruction. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2014**, *73*, 548–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mu, H.M.; Wang, L.Y. Effect of therapeutic ultrasound on brain angiogenesis following intracerebral hemorrhage in rats. *Microvasc. Res.* **2015**, *102*, 11–18. [[CrossRef](#)]
37. Ke, Z.; Ying, M.; Li, L.; Zhang, S.; Tong, K.Y. Evaluation of transcranial Doppler flow velocity changes in intracerebral hemorrhage rats using ultrasonography. *J. Neurosci. Methods* **2012**, *210*, 272–280. [[CrossRef](#)]
38. Stroick, M.; Alonso, A.; Fatar, M.; Griebel, M.; Kreisel, S.; Kern, R.; Gaud, E.; Arditi, M.; Hennerici, M.; Meairs, S. Effects of simultaneous application of ultrasound and microbubbles on intracerebral hemorrhage in an animal model. *Ultrasound Med. Biol.* **2006**, *32*, 1377–1382. [[CrossRef](#)]
39. Zhou, X.; Chen, L.; Feng, C.; Li, B.; Tang, J.; Liu, A.; Lv, F.; Li, T. Establishing an animal model of intracerebral hemorrhage under the guidance of ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* **2013**, *39*, 2116–2122. [[CrossRef](#)]
40. Sobbe, A.; Stumpff, U.; Trübestein, G.; Figge, H.; Kozuschek, W. Die Ultraschall-Auflösung von Thromben. *Klin. Wochenschr.* **1974**, *52*, 1117–1121. [[CrossRef](#)]
41. Tsvigoulis, G.; Alexandrov, A.V. Ultrasound-enhanced thrombolysis in acute ischemic stroke: Potential, failures, and safety. *Neurotherapeutics* **2007**, *4*, 420–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Mikulik, R.; Alexandrov, A.V. Acute stroke: Therapeutic transcranial Doppler sonography. *Front. Neurol. Neurosci.* **2006**, *21*, 150–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Burgess, A.; Huang, Y.; Waspe, A.C.; Ganguly, M.; Goertz, D.E.; Hynynen, K. High-intensity focused ultrasound (HIFU) for dissolution of clots in a rabbit model of embolic stroke. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e42311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Molina, C.A.; Alexandrov, A.V. Transcranial ultrasound in acute stroke: From diagnosis to therapy. *Cerebrovasc. Dis.* **2007**, *1*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Auboire, L.; Sennoga, C.A.; Hyvelin, J.M.; Ossant, F.; Escoffre, J.M.; Tranquart, F.; Bouakaz, A. Microbubbles combined with ultrasound therapy in ischemic stroke: A systematic review of in-vivo preclinical studies. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0191788. [[CrossRef](#)]
46. Kiessling, F.; Fokong, S.; Koczera, P.; Lederle, W.; Lammers, T. Ultrasound microbubbles for molecular diagnosis, therapy, and theranostics. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53*, 345–348. [[CrossRef](#)]
47. Chen, H.; Hwang, J.H. Ultrasound-targeted microbubble destruction for chemotherapeutic drug delivery to solid tumors. *J. Ther. Ultrasound* **2013**, *1*, 10. [[CrossRef](#)]
48. Wang, J.B.; Di Ianni, T.; Vyas, D.B.; Huang, Z.; Park, S.; Hosseini-Nassab, N.; Aryal, M.; Airan, R.D. Focused Ultrasound for Noninvasive, Focal Pharmacologic Neurointervention. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 675. [[CrossRef](#)]
49. Cammalleri, A.; Croce, P.; Lee, W.; Yoon, K.; Yoo, S.S. Therapeutic Potentials of Localized Blood–Brain Barrier Disruption by Noninvasive Transcranial Focused Ultrasound: A Technical Review. *J. Clin. Neurophysiol.* **2020**, *37*, 104–117. [[CrossRef](#)]
50. Bakay, L.; Ballantine, J.R.; Hueter, T.F.; Sosa, D. Ultrasonically produced changes in the blood-brain barrier. *AMA Arch. Neurol. Psychiatry* **1956**, *76*, 457–467. [[CrossRef](#)]
51. Pandit, R.; Koh, W.K.; Sullivan, R.K.; Palliyaguru, T.; Parton, R.G.; Götz, J. Role for caveolin-mediated transcytosis in facilitating transport of large cargoes into the brain via ultrasound. *J. Control Release* **2020**, *327*, 667–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Xia, C.Y.; Liu, Y.H.; Wang, P.; Xue, Y.X. Low-frequency ultrasound irradiation increases blood–tumor barrier permeability by transcellular pathway in a rat glioma model. *J. Mol. Neurosci.* **2012**, *48*, 281–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Alonso, A. Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening for Drug Delivery. *Front. Neurol. Neurosci.* **2015**, *36*, 106–115. [[CrossRef](#)]
54. Meairs, S. Facilitation of Drug Transport across the Blood–Brain Barrier with Ultrasound and Microbubbles Stephen Meairs. *Pharmaceutics* **2015**, *7*, 275–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Escoffre, J.M.; de Senneville, B.D.; Sasaki, N.; Derieppe, M. Editorial: Bubbles, Droplets and Micelles for Acoustically-Mediated Drug/Gene Delivery. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Pérez, E.S.; Delgado-Mederos, R.; Rubiera, M.; Delgado, P.; Ribó, M.; Maisterra, O.; Ortega, G.; Alvarez-Sabin, J.; Molina, C.A. Transcranial duplex sonography for monitoring hyperacute intracerebral hemorrhage. *Stroke* **2009**, *40*, 987–990. [[CrossRef](#)]
57. Saunders, N.R.; Dziegielewska, K.M.; Møllgård, K.; Habgood, M.D. Markers for blood-brain barrier integrity: How appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Front. Neurosci.* **2015**, *9*, 385. [[CrossRef](#)]
58. Aryal, M.; Papademetriou, I.; Zhang, Y.Z.; Power, C.; McDannold, N.; Porter, T. MRI Monitoring and Quantification of Ultrasound-Mediated Delivery of Liposomes Dually Labeled with Gadolinium and Fluorophore through the Blood-Brain Barrier. *Ultrasound Med. Biol.* **2019**, *45*, 1733–1742. [[CrossRef](#)]
59. Chen, D.; Nie, Z.B.; Chi, Z.H.; Wang, Z.Y.; Wei, X.T.; Guan, J.H. Neuroprotective Effect of ZnT3 Knockout on Subarachnoid Hemorrhage. *Transl. Neurosci.* **2018**, *9*, 26–32. [[CrossRef](#)]

60. Lapergue, B.; Deroide, N.; Pocard, M.; Michel, J.-B.; Meilhac, O.; Bonnin, P. Transcranial duplex sonography for monitoring circle of Willis artery occlusion in a rat embolic stroke model. *J. Neurosci. Methods* **2011**, *197*, 289–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Gómez-de Frutos, M.C.; García-Suárez, I.; Laso-García, F.; Diekhorst, L.; Otero-Ortega, L.; Alonso-López, E.; Díez-Tejedor, E.; Gutiérrez-Fernández, M.; Ruiz-Ares, G. Identification of brain structures and blood vessels by conventional ultrasound in rats. *J. Neurosci. Methods* **2020**, *346*, 108935. [[CrossRef](#)]
62. Giustetto, P.; Filippi, M.; Castano, M.; Terreno, E. Non-invasive Parenchymal, Vascular and Metabolic High-frequency Ultrasound and Photoacoustic Rat Deep Brain Imaging. *J. Vis. Exp.* **2015**, *2*, 52162. [[CrossRef](#)]
63. Riesz, P.; Kondo, T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radic. Biol. Med.* **1992**, *13*, 247–270. [[CrossRef](#)]
64. Karagöz, I.; Biri, A.; Babacan, F.; Kavutu, M. Evaluation of biological effects induced by diagnostic ultrasound in the rat foetal tissues. *Mol. Cell Biochem.* **2007**, *294*, 217–224. [[CrossRef](#)]
65. Ter Haar, G. Ultrasonic imaging: Safety considerations. *Interface Focus* **2011**, *1*, 686–697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Dijkmans, P.A.; Juffermans, L.J.; Musters, R.J.; van Wamel, A.; ten Cate, F.J.; van Gilst, W.; Visser, C.A.; de Jong, N.; Kamp, O. Microbubbles and ultrasound: From diagnosis to therapy. *Eur. J. Echocardiogr.* **2004**, *5*, 245–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Daffertshofer, M.; Hennerici, M. Ultrasound in the treatment of ischaemic stroke. *Lancet Neurol* **2003**, *2*, 283–290. [[CrossRef](#)]
68. Vignon, F.; Shi, W.T.; Powers, J.E.; Everbach, E.C.; Liu, J.; Gao, S.; Xie, F.; Porter, T.R. Microbubble cavitation imaging. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2013**, *60*, 661–670. [[CrossRef](#)]
69. Burgess, A.; Shah, K.; Hough, O.; Hynynen, K. Focused ultrasound-mediated drug delivery through the blood-brain barrier. *Rev. Neurother.* **2015**, *15*, 477–491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Nedelmann, M.; Ritschel, N.; Doenges, S.; Langheinrich, A.C.; Acker, T.; Reuter, P.; Yeniguen, M.; Pukropski, J.; Kaps, M.; Mueller, C.; et al. Combined contrast-enhanced ultrasound and rt-PA treatment is safe and improves impaired microcirculation after reperfusion of middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2010**, *30*, 1712–1720. [[CrossRef](#)]
71. Schneider, F.; Gerriets, T.; Walberer, M.; Mueller, C.; Rolke, R.; Eicke, B.M.; Bohl, J.; Kempfski, O.; Kaps, M.; Bachmann, G.; et al. Brain edema and intracerebral necrosis caused by transcranial low-frequency 20-kHz ultrasound: A safety study in rats. *Stroke* **2006**, *37*, 1301–1306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Reuter, P.; Masomi, J.; Kuntze, H.; Fischer, I.; Helling, K.; Sommer, C.; Alessandri, B.; Heimann, A.; Gerriets, T.; Marx, J.; et al. Low-frequency therapeutic ultrasound with varied duty cycle: Effects on the ischemic brain and the inner ear. *Ultrasound Med. Biol.* **2010**, *36*, 1188–1195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Liu, D.D.; Ullah, M.; Concepcion, W.; Dahl, J.J.; Thakor, A.S. The role of ultrasound in enhancing mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cells Transl. Med.* **2020**, *9*, 850–866. [[CrossRef](#)]
74. Maresca, D.; Lakshmanan, A.; Abedi, M.; Bar-Zion, A.; Farhadi, A.; Lu, G.J.; Szablowski, J.O.; Wu, D.; Yoo, S.; Shapiro, M.G. Biomolecular Ultrasound and Sonogenetics. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Engl.* **2018**, *9*, 229–252. [[CrossRef](#)]
75. Macé, E.; Cohen, I.; Montaldo, G.; Miles, R.; Fink, M.; Tanter, M. In vivo mapping of brain elasticity in small animals using shear wave imaging. *IEEE Trans. Med. Imaging* **2011**, *30*, 550–558. [[CrossRef](#)]
76. Macé, E.; Montaldo, G.; Cohen, I.; Baulac, M.; Fink, M.; Tanter, M. Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat. Methods* **2011**, *8*, 662–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Tan, J.K.; Pham, B.; Zong, Y.; Perez, C.; Maris, D.O.; Hemphill, A.; Miao, C.H.; Matula, T.J.; Mourad, P.D.; Wei, H.; et al. Microbubbles and ultrasound increase intraventricular polyplex gene transfer to the brain. *J. Control Release* **2016**, *231*, 86–93. [[CrossRef](#)]
78. Deng, Z.; Sheng, Z.; Yan, F. Ultrasound-induced blood-brain-barrier opening enhances anticancer efficacy in the treatment of glioblastoma: Current status and future prospects. *J. Oncol.* **2019**, *2019*, 2345203. [[CrossRef](#)]
79. Lee, J.; Chang, W.S.; Shin, J.; Seo, Y.; Kong, C.; Song, B.W.; Na, Y.C.; Kim, B.S.; Chang, J.W. Non-invasively enhanced intracranial transplantation of mesenchymal stem cells using focused ultrasound mediated by overexpression of cell-adhesion molecules. *Stem Cell Res.* **2020**, *43*, 101726. [[CrossRef](#)]
80. Kwon, S.H.; Gopal, A.S. 3D and 4D Ultrasound: Current Progress and Future Perspectives. *Curr. Cardiovasc. Imaging Rep.* **2017**, *10*, 43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Macé, É.; Montaldo, G.; Trenholm, S.; Cowan, C.; Brignall, A.; Urban, A.; Roska, B. Whole-Brain Functional Ultrasound Imaging Reveals Brain Modules for Visuomotor Integration. *Neuron* **2018**, *100*, 1241–1251.e7. [[CrossRef](#)]
82. Gesnik, M.; Blaize, K.; Deffieux, T.; Gennisson, J.L.; Sahel, J.A.; Fink, M.; Picaud, S.; Tanter, M. 3D functional ultrasound imaging of the cerebral visual system in rodents. *Neuroimage* **2017**, *149*, 267–274. [[CrossRef](#)]
83. Rau, R.; Kruizinga, P.; Mastik, F.; Belau, M.; de Jong, N.; Bosch, J.G.; Scheffer, W.; Maret, G. 3D functional ultrasound imaging of pigeons. *Neuroimage* **2018**, *183*, 469–477. [[CrossRef](#)]
84. Bimbard, C.; Demene, C.; Girard, C.; Radtke-Chuller, S.; Shamma, S.; Tanter, M.; Boubenec, Y. Multi-scale mapping along the auditory hierarchy using high-resolution functional Ultrasound in the awake ferret. *eLife* **2018**, *7*, e35028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Demené, C.; Tiran, E.; Sieu, L.A.; Bergel, A.; Gennisson, J.L.; Pernot, M.; Deffieux, T.; Cohen, I.; Tanter, M. 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography. *Neuroimage* **2016**, *127*, 472–483. [[CrossRef](#)]
86. Rabut, C.; Correia, M.; Finel, V.; Pezet, S.; Pernot, M.; Deffieux, T.; Tanter, M. 4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents. *Nat. Methods* **2019**, *16*, 994–997. [[CrossRef](#)]

87. Vinciguerra, L.; Bösel, J. Noninvasive neuromonitoring: Current utility in subarachnoid hemorrhage, traumatic brain injury, and stroke. *Neurocritical Care* **2017**, *27*, 122–140. [[CrossRef](#)]
88. Camps-Renom, P.; Méndez, J.; Granell, E.; Casoni, F.; Prats-Sánchez, L.; Martínez-Domeño, A.; Guisado-Alonso, D.; Martí-Fàbregas, J.; Delgado-Mederos, R. Transcranial duplex sonography predicts outcome following an intracerebral hemorrhage. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **2017**, *38*, 1543–1549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Li, X.; Du, H.; Song, Z.; Wang, H.; Tan, Z.; Xiao, M.; Zhang, F. Efficacy and safety of sonothrombolysis in patients with acute ischaemic stroke: A systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Sci.* **2020**, *416*, 116998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Meairs, S.; Kern, R.; Alonso, A. Why and how do microbubbles enhance the effectiveness of diagnostic and therapeutic interventions in cerebrovascular disease? *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 2223–2235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



B-Mode Ultrasound, a Reliable Tool for Monitoring Experimental Intracerebral Hemorrhage

Mari Carmen Gómez-de Frutos^{1†}, Iván García-Suárez^{1,2†}, Fernando Laso-García¹, Luke Diekhorst¹, Laura Otero-Ortega¹, María Alonso de Leciñana¹, Blanca Fuentes¹, María Gutiérrez-Fernández^{1*}, Exuperio Díez-Tejedor^{1‡} and Gerardo Ruiz-Ares^{1**}

¹ Neurological Sciences and Cerebrovascular Research Laboratory, Department of Neurology and Stroke Center, Neuroscience Area of IdiPAZ Health Research Institute, La Paz University Hospital, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, ² Department of Emergency Service, San Agustín Hospital, University of San Agustín, Asturias, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Tatjana Rundek,
University of Miami, United States

Reviewed by:

Patricia Martínez Sánchez,
Torrecárdenas University
Hospital, Spain
Paulo Henrique Rosado-de-Castro,
D'Or Institute for Research and
Education (IDOR), Brazil

*Correspondence:

Gerardo Ruiz-Ares
adalbertog.ruiz@salud.madrid.org
María Gutiérrez-Fernández
mgutierrezfernandez@
salud.madrid.org

[†]These authors share first authorship

[‡]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Applied Neuroimaging,
a section of the journal
Frontiers in Neurology

Received: 06 September 2021

Accepted: 29 November 2021

Published: 23 December 2021

Citation:

Gómez-de Frutos MC,
García-Suárez I, Laso-García F,
Diekhorst L, Otero-Ortega L, Alonso
de Leciñana M, Fuentes B,
Gutiérrez-Fernández M,
Díez-Tejedor E and Ruiz-Ares G (2021)
B-Mode Ultrasound, a Reliable Tool
for Monitoring Experimental
Intracerebral Hemorrhage.
Front. Neurol. 12:771402.
doi: 10.3389/fneur.2021.771402

Background: Magnetic resonance imaging (MRI) is currently used for the study of intracerebral hemorrhage (ICH) in animal models. However, ultrasound is an inexpensive, non-invasive and rapid technique that could facilitate the diagnosis and follow-up of ICH. This study aimed to evaluate the feasibility and reliability of B-mode ultrasound as an alternative tool for *in vivo* monitoring of ICH volume and brain structure displacement in an animal model.

Methods: A total of 31 male and female Sprague-Dawley rats were subjected to an ICH model using collagenase-IV in the striatum following stereotaxic references. The animals were randomly allocated into 3 groups: healthy ($n = 10$), sham ($n = 10$) and ICH ($n = 11$). B-mode ultrasound studies with a 13-MHz probe were performed pre-ICH and at 5 h, 48 h, 4 d and 1 mo post-ICH for the assessment of ICH volume and displacement of brain structures, considering the distance between the subarachnoid cisterns and the dura mater. The same variables were studied by MRI at 48 h and 1 mo post-ICH.

Results: Both imaging techniques showed excellent correlation in measuring ICH volume at 48 h ($r = 0.905$) and good at 1 mo ($r = 0.656$). An excellent correlation was also observed in the measured distance between the subarachnoid cisterns and the dura mater at 1 mo between B-mode ultrasound and MRI, on both the ipsilateral ($r = 0.870$) and contralateral ($r = 0.906$) sides of the lesion.

Conclusion: B-mode ultrasound imaging appears to be a reliable tool for *in vivo* assessment of ICH volume and displacement of brain structures in animal models.

Keywords: B-mode ultrasound, experimental, intracerebral hemorrhage, magnetic resonance imaging, ultrasound, rat

INTRODUCTION

Intracerebral hemorrhage (ICH) accounts for 10–15% off all strokes (1, 2) and is the most lethal form of stroke, with high morbidity and mortality (3–5). One of the most important prognostic factors is the severity of bleeding and the volume of the hematoma (5).

Due to its high sensitivity and specificity, computed tomography (CT) is the gold-standard for diagnosing ICH in patients in the acute setting (1, 3), whereas magnetic resonance imaging

(MRI) is often used as a complementary method to determine the underlying causes and to add information on the evolutionary stage of the ICH (3, 6, 7). In animal models, MRI is the preferred imaging technique to study the brain *in vivo*, particularly in small animals, due to its sensitivity and high-resolution for small animal imaging (8–10). In rat models of ICH, MRI has only recently been employed (8). However, factors such as availability, tolerability, acquisition time, transport and clinical status can hinder the performance of this technique and should be taken into account (3, 11).

Conversely, ultrasound is a rapid, non-invasive, inexpensive, accessible and well-tolerated imaging technique that can be easier to perform (12, 13). Its versatility and ability to obtain dynamic and real-time images allow us to acquire structural and functional information with sufficient spatial and temporal resolution (14). These characteristics make this tool suitable to be used routinely in rodents. Until now, however, although ultrasound has been used to study hemodynamic changes after ICH in animal models, B-mode ultrasound has not been used to assess the brain parenchyma or the structural changes produced by the ICH (15–17).

The development of methods for rapid detection and accurate monitoring of spontaneous ICH in animals is one of the preclinical research priorities of the Hemorrhagic Stroke Academia Industry (HEADS) recommendations (18). Given the above-mentioned advantages, B-mode ultrasound images could be used to assess the structural changes resulting from ICH, helping reduce the use of MRI. Therefore, the aim of this study was to assess the usefulness of B-mode ultrasound imaging for monitoring ICH in an experimental animal model by comparing the data obtained by MRI and ultrasound.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Intracerebral Hemorrhage Induction

A total of 33 male and female Sprague Dawley rats (8–9 weeks old, weighing 225–275 g) were employed in this study. We induced general anesthesia with 8% sevoflurane in a 1-l/min oxygen flow and maintained it with 4% sevoflurane in a 1-l/min oxygen flow with a face mask. Meloxicam (2 mg/kg) was subcutaneously administered for analgesia induction. For ICH induction, the animals were placed in a stereotactic frame (Stoelting). We injected 0.5 U of collagenase type-IV (Sigma-Aldrich, USA) diluted in 1 μ L of saline by a craniotomy performed close to the bregma with the following stereotaxic coordinates: 0.04 mm posterior, 0.35 mm lateral and 0.6 mm ventral, as previously described (19). This model is simple and has high reproducibility of striatal ICH (20).

The animals were randomly distributed in 3 experimental groups: 1, healthy group ($n = 5$ males and 5 females); 2, sham group (subjected to surgery without hemorrhage, $n = 5$ males and 5 females); 3, ICH group (subjected to hemorrhage, $n = 6$ males and 5 females) (**Figure 1A**).

Functional Evaluation Scales

The animals were evaluated before ICH induction and at 48 h, 4 d and 1 mo post-ICH by a researcher blinded to the different experimental groups. The motor function of the animals was studied using the rotarod, beam walking, modified beam walking and modified Rogers tests. All the animals received pre-training 3 d before hemorrhage induction.

The beam walking test studies the capacity of animals to stay on a wooden beam (2.5 \times 2.5 \times 80 cm), assigning the following scores: 0, crosses the beam without foot slip; 1, crosses but holds on to the lateral side of the beam; 2, able to traverse the beam, but with difficulty, crawling; 3, requires >10 s to cross; 4, unable to cross; 5, unable to move the body or any limb on the beam; 6, unable to stay on the beam >10 s (21).

With the tapered walking beam test, we analyzed the hind limb functions, studying the ability of the rats to cross to another wooden beam. The left hind limb slip ratio was calculated as follows: (total slips + 0.5 \times half slips)/total steps \times 100% (22, 23).

In order to study the motor coordination of the animals, the rotarod test was performed. The animals were placed in a rotated cylinder that progressively increased in speed (4–40 rpm) for 2 min maximum (24).

A variant of the Rogers test was used to assign scores as follows: 0, no functional deficit; 1, lack of full extension of the forepaw; 2, decreased grip of forelimb while tail gently pulled; 3, spontaneous movement in all directions, contralateral circling if the tail is pulled; 4, circling; 5, movement only when stimulated; 6, unresponsive to stimulation with a decreased level of consciousness; 7, dead (25).

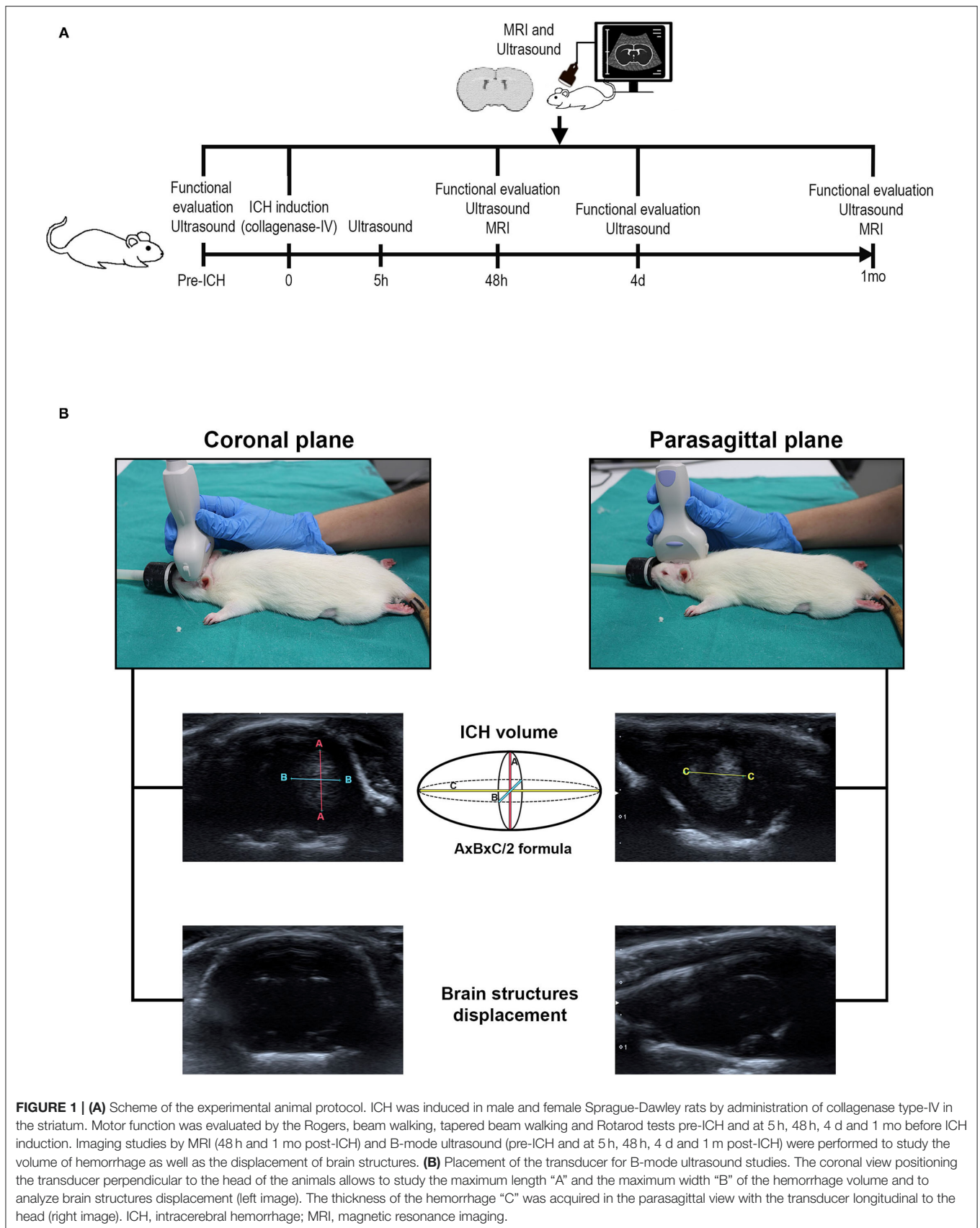
Imaging

To assess hemorrhage volume and brain structure displacement, both B-mode ultrasound imaging and MRI were performed.

Transcranial B-mode ultrasound (Xario 200G, TUS-X200, Canon) was performed using a 13-MHz lineal multi-frequency transducer (PLU-1204BT, Canon) with a mechanical index of 1.4 and optimization and constant adjustments in gain and depth throughout the experiments. Animals were anesthetized with 8% sevoflurane in a 1 l/min oxygen flow and maintained it with 4% sevoflurane in a 1 l/min oxygen flow with a face mask. Each scanning session had a maximum duration of 10 min.

B-mode ultrasound was performed within 5 h after surgery and at 48 h, 4 d and 1 mo post-ICH to analyze ICH volume. The displacement of brain structures was also measured before ICH induction (pre-ICH). To study the ICH volume, 2 ultrasound scans were performed for each animal, 1 in the coronal plane and 1 in the sagittal plane with the animals placed in a prone position. The transducer was positioned perpendicular to the head to obtain coronal images, and parasagittal images were obtained with the transducer longitudinal to the head (**Figure 1B**). ICH was identified with hyperechogenic appearance at 48 h and hypoechoic appearance at 1 mo. To study the displacement of the cerebral structures, the subarachnoid cisterns were used as a reference (26). For this purpose, the transducer was placed perpendicular and caudal to the head.

MRI was performed at 48 h and 1 mo post-ICH on a Bruker Pharmascan Biospect system (Bruker Medical GmbH, Ettlingen,



Germany), using T2-weighted (T2-W) spin-echo anatomical images acquired using a 7.0-T horizontal-bore superconducting magnet with a ^1H circular polarized volume coil with an inner diameter of 40 mm and a Bruker gradient insert 90 mm in diameter (maximum intensity 36 G/cm), equipped with a ^1H receive-only mouse brain surface coil, volume transmission coil and Bruker gradient insert 90 mm in diameter (maximum intensity 36 G/cm). Animals were anesthetized with a 2% sevoflurane-oxygen mixture in an induction chamber, and the flow of anesthetic gas was constantly regulated to maintain a breathing rate of 50 \pm 20 bpm. The physiological state of the rats was monitored using a monitoring system by SA Instruments (Stony Brook, NY) that controlled the respiratory rate and body temperature. T2 imaging lasted 20 min. Images were analyzed with the ImageJ 1.52 program (National Institutes of Health, USA), identifying the hyperintense lesion at 48 h and the heterogeneous lesion (hyper- and isointense) at 1 mo.

For both the B-mode ultrasound and MRI studies, the $A \times B \times C/2$ formula (27, 28) was employed for the ICH volume, and brain structure displacement was studied using as reference the distance between the subarachnoid cisterns and the dura mater previously identified (26). In order to identify the displacement and magnitude of this, the distance from the dura mater to the subarachnoid cisterns was measured, and the cistern displacement ratio (CDR), to normalize and refer to the contralateral side, was calculated with the following formula: cisterns to dura mater distance on the side ipsilateral to the lesion/cisterns to dura mater distance on the side contralateral to the lesion. After normalization of the distance between the subarachnoid cisterns and the dura mater, a value of 1 in the CDR indicates no displacement of brain structures, >1 an increase of the distance in the hemisphere ipsilateral to the lesion, and <1 an increase of the distance in the hemisphere contralateral to the lesion.

Statistics

The results are expressed as mean \pm standard deviation. At least 10 rats were estimated to be required for each group to obtain differences between groups for a significance level of 5% (alpha) and a power of 80% (1-beta). The rats that died before the end of the study were immediately replaced by new ones until a total of 10 rats per group was reached. The data were compared using an analysis of variance for each factor and corrected with Tukey's *post hoc* test when the data followed a normal distribution. If the data followed a non-normal distribution, they were compared with the Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney test. In the case of comparisons within the same experimental group, a *t*-test for related samples was performed in the case of normality, and the Wilcoxon signed-rank test in the case of non-normality. Pearson's (*r*) (parametric test) or Spearman's (ρ) (non-parametric test) correlation coefficient was used to measure the strength of the relationships between the variables (functional evaluation, hemorrhage volume and brain structure displacement). *P*-values < 0.05 were considered significant at a 95% confidence interval. Data were calculated using IBM SPSS 23 (Armonk, NY, USA), and the figures were obtained using GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA).

Ethics Statement

The experiments were conducted according to the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, RIGOR and HEADS recommendations (18, 29, 30) and the Animal Research: Reporting of *In vivo* Experiments guidelines (31) at our Neurological Sciences and Cerebrovascular Research Laboratory, La Paz University Hospital, Madrid, Spain. Animal care and experimental procedures were designed in accordance with our medical school's Ethical Committee for the Care and Use of Animals in Research (Ref. PROEX 296/16) according to the Spanish (RD 1201/2005 and RD53/2013) and European Union (EU) (86/609/CEE, 2003/65/CE, 2010/63/EU) rules.

RESULTS

Clinical Status and Mortality

The functional status as well as the study variables in the experimental groups are shown in **Table 1**.

A total of 2 rats died before the end of the study: 1 from the ICH group during the surgery and 1 from the healthy group during the MRI at 48 h.

Intracerebral Hemorrhage Volume With B-Mode Ultrasound and Magnetic Resonance Imaging

A decrease in the size of the ICH was observed throughout the study. By B-mode ultrasound, the ICH volume showed a significant decrease between 4 d and 1 mo ($p = 0.001$). Also by MRI, a significant decrease in ICH volume was observed between 48 h and 1 mo ($p = 0.001$) (**Table 1, Figure 2A**).

The measures obtained showed an excellent correlation between both techniques at 48 h (Pearson's correlation coefficient (r) 0.905, $p = 0.001$). At 1 mo after ICH, there was also a good correlation ($r = 0.656$, $p = 0.028$) (**Table 1, Figures 2A,B**).

In addition, it has been observed that the hyperechogenicity of the ICH at 5 h decreased over time until hypoechoic signals were observed at 1 mo (**Figure 2C**).

Brain Structure Displacement by Intracerebral Hemorrhage as Shown by B-Mode Ultrasound and Magnetic Resonance Imaging

By B-mode ultrasound, no differences were observed in the CDR between the healthy and sham groups pre-ICH ($p = 0.422$), at 5 h ($p = 0.295$), 48 h ($p = 0.933$), 4 d ($p = 0.213$) or 1 mo ($p = 0.870$) (**Table 1, Figures 3A,B**).

Pre-ICH, the CDR in the ICH group showed no significant differences compared with the healthy ($p = 0.352$) or sham groups ($p = 0.788$). Also, no differences were observed at 5 h between the ICH and the healthy ($p = 0.192$) and sham ($p = 1.00$) groups. However, there was an increase in the CDR in the ICH group at 48 h compared with the healthy ($p = 0.001$) and sham ($p = 0.004$) groups. At 4 d, an increase was found only between the ICH and healthy animals ($p = 0.026$); only a trend was found with the sham animals ($p = 0.062$). These significant differences were no longer present at 1 mo between the ICH group and

TABLE 1 | Functional evaluation, ICH volume and CDR of the animals analyzed in the study.

| | | Time | Healthy (n = 10) | Sham (n = 10) | ICH (n = 11) | P-value |
|--------------------------------------|---|---------|---------------------|------------------|-----------------|--------------|
| Functional evaluation | Rogers [points (mean ± SD)] | Pre-ICH | 0.00 ± 0.00 | 0.30 ± 0.95 | 0.00 ± 0.00 | 0.350 |
| | | 48 h | 0.60 ± 1.26 | 0.60 ± 1.26 | 3.54 ± 0.93 | 0.001 |
| | | 4 d | 0.30 ± 0.95 | 1.10 ± 1.45 | 3.64 ± 0.81 | 0.001 |
| | | 1 mo | 0.60 ± 1.26 | 0.80 ± 1.32 | 2.09 ± 1.81 | 0.065 |
| | Beam walking [points (mean ± SD)] | Pre-ICH | 0.00 ± 0.00 | 0.10 ± 0.32 | 0.18 ± 0.40 | 0.383 |
| | | 48 h | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 4.64 ± 1.12 | 0.001 |
| | | 4 d | 0.20 ± 0.63 | 0.00 ± 0.00 | 3.45 ± 1.51 | 0.001 |
| | | 1 mo | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 2.18 ± 1.83 | 0.001 |
| | Tapered beam walking [% (mean ± SD)] | Pre-ICH | 21.65 ± 6.68 | 20.16 ± 9.90 | 27.38 ± 13.88 | 0.376 |
| | | 48 h | 20.08 ± 6.91 | 23.70 ± 10.21 | 93.89 ± 15.57 | 0.001 |
| | | 4 d | 20.04 ± 9.42 | 16.01 ± 8.27 | 85.61 ± 21.70 | 0.001 |
| | | 1 mo | 16.60 ± 8.27 | 17.16 ± 7.31 | 68.53 ± 23.24 | 0.001 |
| | Rotarod [s (mean ± SD)] | Pre-ICH | 99.07 ± 33.86 | 97.73 ± 29.55 | 113.76 ± 9.79 | 0.613 |
| | | 48 h | 91.63 ± 46.73 | 107.00 ± 27.01 | 51.82 ± 27.79 | 0.004 |
| | | 4 d | 98.00 ± 40.74 | 107.57 ± 17.97 | 68.88 ± 31.37 | 0.010 |
| | | 1 mo | 91.47 ± 44.59 | 89.57 ± 36.93 | 69.82 ± 29.60 | 0.223 |
| ICH volume | US (mm ³ [mean ± SD]) | 5 h | – | – | 58.92 ± 24.70 | – |
| | | 48 h | – | – | 66.22 ± 23.19 | – |
| | | 4 d | – | – | 65.27 ± 27.62 | – |
| | | 1 mo | – | – | 17.36 ± 9.97 | – |
| MRI [mm ³ (mean ± SD)] | 48 h | – | – | 71.86 ± 24.75 | – | |
| | 1 mo | – | – | 21.49 ± 9.74 | – | |
| CDR | US (mean ± SD) | Pre-ICH | 0.99 ± 0.02 | 1.01 ± 0.05 | 1.00 ± 0.00 | 0.587 |
| | | 5 h | 0.99 ± 0.02 | 1.01 ± 0.05 | 0.99 ± 0.04 | 0.401 |
| | | 48 h | 0.99 ± 0.02 | 0.99 ± 0.04 | 1.06 ± 0.04 | 0.002 |
| | | 4 d | 0.99 ± 0.02 | 1.00 ± 0.01 | 1.06 ± 0.04 | 0.033 |
| | | 1 mo | 0.99 ± 0.02 | 0.99 ± 0.03 | 1.06 ± 0.06 | 0.201 |
| | MRI (mean ± SD) | 48 h | 0.98 ± 0.02 | 0.99 ± 0.03 | 1.06 ± 0.04 | 0.001 |
| | | 1 mo | 0.98 ± 0.01 | 1.00 ± 0.03 | 1.05 ± 0.07 | 0.096 |
| | | | | | | |
| Cisterns-dura mater distance | Contralateral side distance US [mm (mean ± SD)] | 48 h | – | – | 3.75 ± 0.30 | – |
| | | 1 mo | – | – | 3.44 ± 0.29 | – |
| | Contralateral side distance MRI [mm (mean ± SD)] | 48 h | – | – | 3.84 ± 0.23 | – |
| | | 1 mo | – | – | 3.49 ± 0.26 | – |
| | Ipsilateral side distance US [mm (mean ± SD)] | 48 h | – | – | 3.84 ± 0.41 | – |
| | | 1 mo | – | – | 3.64 ± 0.46 | – |
| | Ipsilateral side distance MRI [mm (mean ± SD)] | 48 h | – | – | 4.09 ± 0.30 | – |
| | | 1 mo | – | – | 3.67 ± 0.45 | – |

CDR, cistern displacement ratio; ICH, intracerebral hemorrhage; MRI, magnetic resonance imaging; US, B-mode ultrasound. Data were compared with Kruskal-Wallis test. Statistically significant values ($p < 0.05$) are in bold.

the healthy ($p = 0.118$) and sham ($p = 0.139$) groups (Table 1, Figures 3A,B).

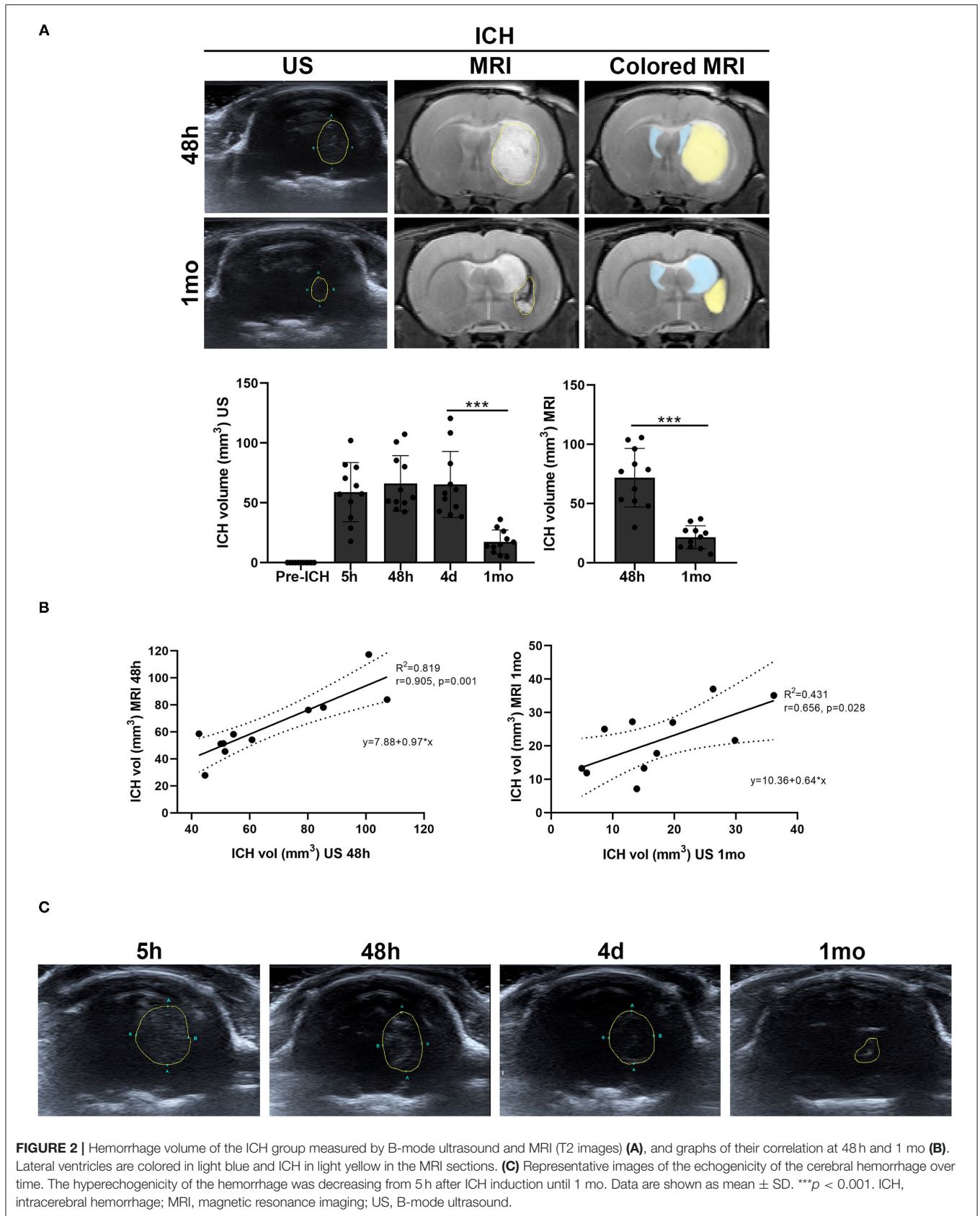
By MRI, the healthy and sham groups also showed no differences in the CDR at 48 h ($p = 0.480$) and 1 mo ($p = 0.316$). However, an increase in this CDR was found at 48 h in the ICH group compared with the healthy ($p = 0.002$) and sham ($p = 0.008$) groups. However, no differences were found between ICH and the healthy ($p = 0.078$) and sham ($p = 0.111$) groups at 1 mo (Table 1, Figures 3A,B).

After analyzing brain structure displacement, the correlation of this variable between the 2 imaging techniques was studied. At 48 h, a correlation of $r = 0.296$ ($p = 0.376$) was observed between B-mode ultrasound and MRI in the distance between

the cisterns and dura mater on the side contralateral to the hemorrhage. The correlation that was found in the distance between B-mode ultrasound and MRI on the ipsilateral side was $r = 0.529$ ($p = 0.094$). Conversely, at 1 mo, the distance measured by both imaging techniques showed a correlation of $r = 0.906$ ($p = 0.001$) on the contralateral side and of $r = 0.870$ ($p = 0.001$) on the ipsilateral side (Table 1, Figure 3C).

DISCUSSION

In this study, we demonstrated the feasibility and accuracy of B-mode ultrasound imaging in the assessment of ICH in



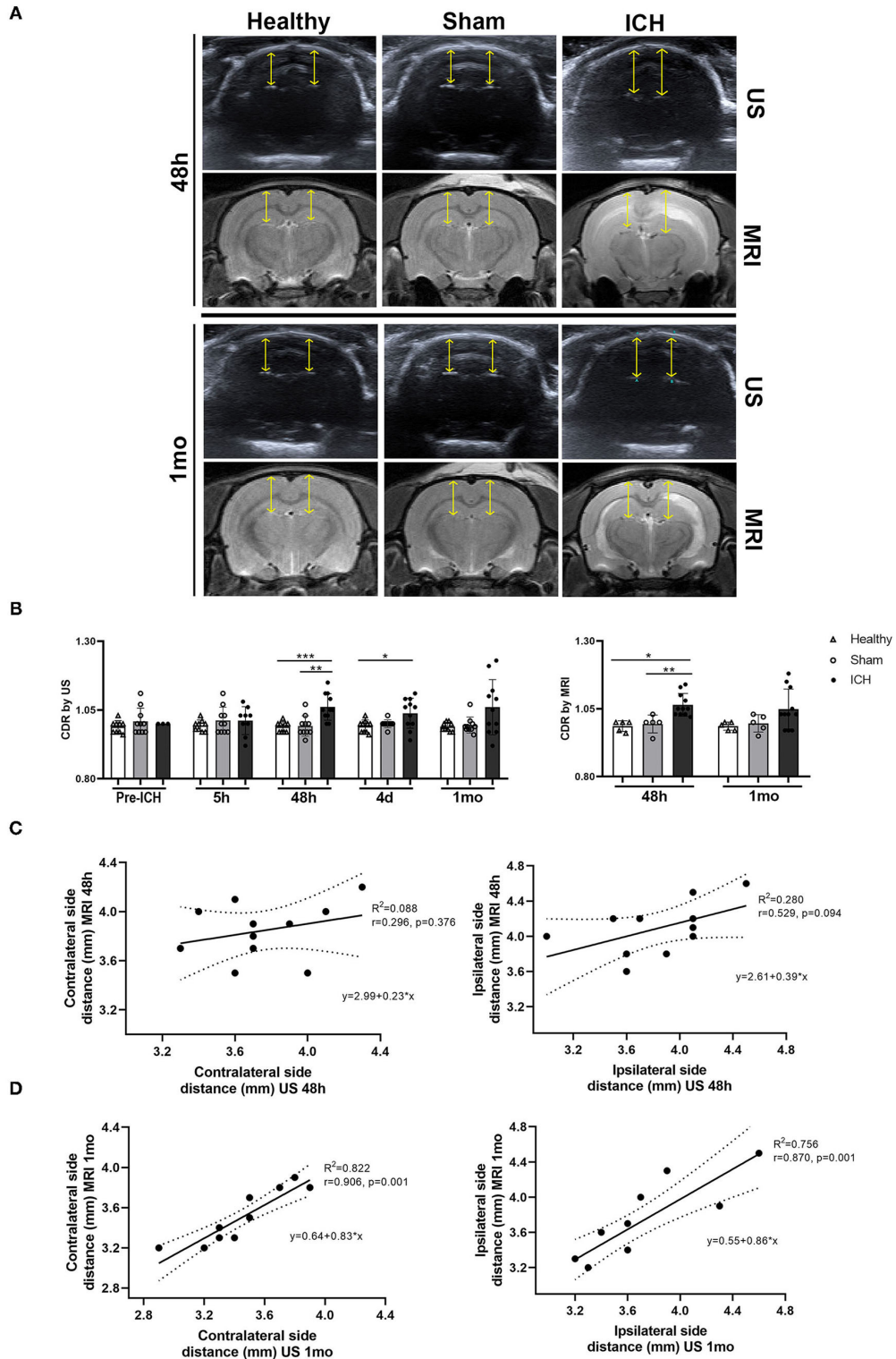


FIGURE 3 | (A) Representative images of the subarachnoid cisterns identified by B-mode ultrasound and MRI (T2) in the different experimental groups at 48 h and 1 mo after ICH induction. Yellow arrows indicate the measured distance. **(B)** Quantification of the subarachnoid cisterns to dura mater distance ratio (CDR) between the different experimental groups by B-mode ultrasound and MRI. **(C, D)** Representative graphs of the correlation between B-mode ultrasound and MRI in the subarachnoid cisterns to dura mater distance on both the contralateral (left) and ipsilateral (right) sides at 48 h and 1 mo after ICH induction. Data are shown as mean ± SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. ICH, intracerebral hemorrhage; MRI, magnetic resonance imaging; US, B-mode ultrasound.

an experimental animal rat model, showing results that are equivalent to MRI in measuring ICH volume and secondary displacement of brain structures.

Although CT is the preferred tool for ICH diagnosis in patients with acute stroke (3, 32–34), MRI is typically used to monitor ICH in animal models (8). The ICH volume measured by the ABC/2 formula in T2* MRI scans is closely associated with that measured in cryosections of mice (35). A good correlation between MRI and histopathological studies has also been demonstrated in an ICH model in rats (36). Concretely in rats, the signal of the hemorrhage by MRI (in T2) is hypointense, with isointense foci after a few hours (0–12 h) (36–39), corresponding to edematous areas (38). This hypointensity switches to hyperintensity after 24–72 h due to erythrocyte degeneration and cellular debris and is surrounded by a hypointense ring corresponding to neutrophils and macrophages (36–38). In agreement with these studies, we also observed the lesion as a hyperintense signal at 48 h, although the hypointense ring was not as clear in many of the images. This was probably due to the fact that the aggregation of neutrophils is maximal at 48 h; thereafter, the neutrophils disperse toward the center of the lesion to be replaced by macrophages, resulting in a less defined ring (38). The lesion remains hyper/isointense due to cellular debris and fluid-filled spaces with a hypointense ring of macrophages at 7 d (36–38). At 2–3 weeks and up to 28 d, the hematoma site consists of a fluid-filled cavity with an iso/hyperintense signal surrounded by a hypointense ring (macrophages) with dark areas corresponding to areas of necrosis and cavitations (36, 38, 40) equivalent to our images at 1 mo.

To our knowledge, the 1981 study performed by Enzmann DR et al. was the first study evaluating ICH with ultrasound in an animal model (41). By introducing a hematoma into the parietal lobe by craniotomy in dogs, they were able to identify a highly echogenic hemorrhagic lesion in acute ICH. This signal became hypoechoic with echogenic borders at 3–4 d due to the loss of erythrocyte integrity (41). Between days 9 and 13, the formation of a network of collagen and macrophages has been described in the animal model, which would give rise to a hypodense ring around the hematoma that later narrows due to the increase in the connective tissue capsule (42). This data highlights the lack of recent preclinical scientific articles on ultrasound in ICH. Previously, it had been shown that ultrasound does not induce additional damage when applied to the ICH. In particular, Stroick et al. had demonstrated that the effects of diagnostic ultrasound with microbubbles did not cause more brain damage in ICH rats (43). Also, Ke et al. used high-frequency transcranial Doppler ultrasound to study blood flow velocity after ICH in rats (17). Apart from these studies, to our knowledge, there are few studies that have examined ICH using ultrasound. Therefore, the present study would be one of the first to study ICH and monitor it by means of ultrasound in an animal model. Here, we were able to identify a hyperechogenic mass in the brain parenchyma of animals at 48 h that was less defined at 1 mo due to its transformation into a more hypoechoic signal, correlating with images obtained in patients (12, 42).

We have also demonstrated that B-mode ultrasound and MRI detect a very similar ICH volume in early states, with a significant correlation between both techniques. At late stages, we continued to observe a significant correlation in the measurement of ICH volume by both techniques but lower than that obtained at 48 h after ICH. The decrease over time of ICH volume (44, 45), attenuation and resolution of the hematoma as a fluid-filled or slit-like cavity (45, 46), the narrowing of the echodense seam shown at the last stage on ultrasound (42) and the heterogeneity in the MRI signal could hinder visualization and measurement, thus explaining this lower correlation at the late stage. The clinical application of ultrasound had already been demonstrated for the diagnosis of ICH in 1 or a maximum of 35 patients (42, 47–50). However, further studies are needed to establish the diagnostic value of ultrasound and its accuracy to guide therapeutic decisions in ICH (12). The small number of participants, short study times and the lack of preclinical experimentation highlight the need to continue studying this technique to be able to implement it with MRI or CT assisting in the monitoring of ICH.

In parallel with the study of ICH volume, we also analyzed the possible displacement of brain structures as a consequence of ICH. ICH causes displacement of adjacent structures due to mass effect in the acute phase (51). In later phases, brain atrophy occurs with atrophy of the caudate and enlargement of the ipsilateral ventricle (52, 53). In a previous study, we had demonstrated the ability of B-mode ultrasound imaging to identify fluid-filled cavities and to differentiate them from brain tissue in rats (26). We have also identified the subarachnoid cisterns as the main structures that can be observed. These cisterns are filled with cerebrospinal fluid and connect the ventricular system and the subarachnoid space (26, 54). In this study, we observed a displacement of these cisterns, specifically on the ipsilateral side, with relation to the dura mater that could be explained as a late consequence of mass effect. In addition, we observed a high correlation in the measurement of the subarachnoid cisterns distance between B-mode ultrasound and MRI, emphasizing again the similarity in measurements between the 2 techniques.

Although ultrasound allows us to observe the mass effect derived from ICH, it does not identify important components of the lesion, such as edema (18); it also has the disadvantage of being operator dependent and has limitations in image acquisition due to bone or gas-filled structures (14). However, its advantages and the results presented in this study demonstrate its ability to be successfully employed in rats.

In conclusion, we have shown an excellent correlation between the 2 imaging techniques that shows B-mode ultrasound to be a tool as accurate as MRI in the assessment of ICH lesion volume and displacement of brain structures. B-mode ultrasound's ability to measure the volume of hemorrhage and the displacement of brain structures provides a novel approach for the monitoring of ICH in animal models. Despite the need for further studies, these findings support the use of B-mode ultrasound for monitoring ICH in future preclinical and clinical studies.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Neurological Sciences and Cerebrovascular Research Laboratory, La Paz University Hospital, Madrid, Spain. Animal care and experimental procedures were designed in accordance with our medical school's Ethical Committee for the Care and Use of Animals in Research (Ref. PROEX 296/16) according to the Spanish (RD 1201/2005 and RD53/2013) and European Union (EU) (86/609/CEE, 2003/65/CE, 2010/63/EU) rules.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MG-dF, GR-A, and MG-F: manuscript writing. MG-dF, IG-S, and FL-G: methodology and investigation. MG-dF, IG-S, FL-G,

LD, LO-O, MADL, BF, MG-F, ED-T, and GR-A: manuscript revision, reading, and approval of the final manuscript. ED-T, GR-A, and MG-F: funding acquisition, supervision, and project administration. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work had grant support from the Spanish Ministry of Health—Carlos III Health Institute (ISCIII) and the European Regional Development Fund (FEDER Funding) with PI16/01052 project, the INVICTUS PLUS network grant (RD16/0019/0005), Miguel Servet (CP15/00069, CPII20/00002 to MG-F; CP20/00024 to LO-O), a predoctoral fellowship (FI17/00188 to MG-dF; FI18/00026 to FL-G).

ACKNOWLEDGMENTS

We appreciate the support for editing assistance of Morote Traducciones S.L.

REFERENCES

- WHO. Neurological Disorders: A Public Health Approach. *Neurol Disord Public Heal Challenges*. Genève: WHO (2014), 111–75.
- Zheng H, Chen C, Zhang J, Hu Z. Mechanism and therapy of brain edema after intracerebral hemorrhage. *Cerebrovasc Dis*. (2016) 42:155–69. doi: 10.1159/000445170
- Dastur CK, Yu W. Current management of spontaneous intracerebral haemorrhage. *Stroke Vasc Neurol*. (2017) 2:21–9. doi: 10.1136/svn-2016-000047
- Hostettler IC, Seiffge DJ, Werring DJ. Intracerebral hemorrhage: an update on diagnosis and treatment. *Expert Rev Neurother*. (2019) 19:679–94. doi: 10.1080/14737175.2019.1623671
- Ariesen MJ, Claus SP, Rinkel GJE, Algra A. Risk factors for intracerebral hemorrhage in the general population a systematic review. *Stroke*. (2003) 34:2060–5. doi: 10.1161/01.STR.0000080678.09344.8D
- Tatlisumak T, Cucchiara B, Kuroda S, Kasner SE, Putaala J. Nontraumatic intracerebral haemorrhage in young adults. *Nat Rev Neurol*. (2018) 14:237–50. doi: 10.1038/nrneuro.2018.17
- Aguilar MI, Brott TG. Update in intracerebral hemorrhage. *Neurohospitalist*. (2011) 1:148–59. doi: 10.1177/1941875211409050
- Denic A, Macura SI, Mishra P, Gamez JD, Rodriguez M, Pirkio I. MRI in rodent models of brain disorders. *Neurotherapeutics*. (2011) 8:3–18. doi: 10.1007/s13311-010-0002-4
- Welniak-Kaminska M, Fiedorowicz M, Orzel J, Bogorodzki P, Modlinska K, Stryjek R, et al. Volumes of brain structures in captive wild-type and laboratory rats: 7T magnetic resonance in vivo automatic atlas-based study. *PLoS ONE*. (2019) 14:1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0215348
- Weber R, Ramos-Cabrer P, Hoehn M. Present status of magnetic resonance imaging and spectroscopy in animal stroke models. *J Cereb Blood Flow Metab*. (2006) 26:591–604. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600241
- Hemphill JC 3rd, Greenberg SM, Anderson CS, Becker K, Bendok BR, Cushman M, et al. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association. *Stroke*. (2015) 46:2032–60. doi: 10.1161/STR.0000000000000069
- Meyer-Wiethe K, Sallustio F, Kern R. Diagnosis of intracerebral hemorrhage with transcranial ultrasound. *Cerebrovasc Dis*. (2009) 27:40–7. doi: 10.1159/000203125
- Greco A, Mancini M, Gargiulo S, Gramanzini M, Claudio PP, Brunetti A, et al. Ultrasound biomicroscopy in small animal research: Applications in molecular and preclinical imaging. *J Biomed Biotechnol*. (2012) 2012:519238. doi: 10.1155/2012/519238
- Coatney RW. Ultrasound imaging: principles and applications in rodent research. *ILAR J*. (2001) 42:233–47. doi: 10.1093/ilar.42.3.233
- Fan CH, Liu HL, Huang CY, Ma YJ, Yen TC, Yeh CK. Detection of intracerebral hemorrhage and transient blood-supply shortage in focused-ultrasound-induced blood-brain barrier disruption by ultrasound imaging. *Ultrasound Med Biol*. (2012) 38:1372–82. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2012.03.013
- O'Reilly MA, Huang Y, Hynynen K. Impact of standing wave effects on transcranial focused ultrasound disruption of the blood-brain barrier in a rat model meaghan. *Phys Med Biol*. (2010) 55:5251–67. doi: 10.1088/0031-9155/55/18/001
- Ke Z, Ying M, Li L, Zhang S, Tong KY, Ke Z, et al. Evaluation of transcranial doppler flow velocity changes in intracerebral hemorrhage rats using ultrasonography. *J Neurosci Methods*. (2012) 210:272–80. doi: 10.1016/j.jneumeth.2012.07.024
- Participants Hsai (HEADS) R. Basic and translational research in intracerebral hemorrhage: limitations, priorities, and recommendations. *Stroke*. (2018) 49:1308–14. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019539
- Otero L, Zurita M, Bonilla C, Aguayo C, Vela A, Rico MA, et al. Late transplantation of allogeneic bone marrow stromal cells improves neurologic deficits subsequent to intracerebral hemorrhage. *Cytotherapy*. (2011) 13:562–71. doi: 10.3109/14653249.2010.544720
- Bai Q, Sheng Z, Liu Y, Zhang R, Yong VW, Xue M. Intracerebral haemorrhage: from clinical settings to animal models. *Stroke Vasc Neurol*. (2020) 5:388–95. doi: 10.1136/svn-2020-000334
- Britton GL, Kim H, Kee PH, Aronowski J, Holland CK, McPherson DD, et al. *In Vivo* therapeutic gas delivery for neuroprotection with echogenic liposomes. *Circulation*. (2010) 122:1578–87. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.879338
- Boltze J, Lukomska B, Jolkkonen J, Irbi M. Mesenchymal stromal cells in stroke: improvement of motor recovery or functional compensation? *J Cereb Blood Flow Metab*. (2014) 34:1420–1. doi: 10.1038/jcbfm.2014.94
- Schallert T, Woodlee M, Fleming S. Disentangling multiple types of recovery from brain injury. *Pharmacol Cereb Ischemia*. (2002) 2002:201–16. Available Online at: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.320.2956&rep=rep1&type=pdf>.

24. Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, Vallejo-Cremades MT, Fuentes B, Cerdán S, et al. Effects of intravenous administration of allogenic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther.* (2013) 4:11. doi: 10.1186/scrt159
25. Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke.* (1997) 28:2060–6. doi: 10.1161/01.STR.28.10.2060
26. Gómez-de Frutos MC, García-Suárez I, Laso-García F, Diekhorst L, Otero-Ortega L, Alonso-López E, et al. Identification of brain structures and blood vessels by conventional ultrasound in rats. *J Neurosci Methods.* (2020) 346:108935. doi: 10.1016/j.jneumeth.2020.108935
27. Kothari RU, Brott T, Broderick JP, Barsan WG, Sauerbeck LR, Zuccarello M, et al. The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes. *Stroke.* (1996) 27:1304–5. doi: 10.1161/01.STR.27.8.1304
28. Zhang ZL, Song Y, Li F, Huang QB. Bimodal distribution of nuclear factor- κ B activation and expression of subunits in experimental models of intracerebral hemorrhage *In Vivo.* *J Stroke Cerebrovasc Dis.* (2019) 28:821–29. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.11.028
29. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke.* (2009) 40:2244–50. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.541128
30. Lapchak PA, Zhang JH, Noble-Haesslein LJ. Rigor guidelines: escalating stair and steps for effective translational research. *Transl Stroke Res.* (2013) 4:279–85. doi: 10.1007/s12975-012-0209-2
31. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG, National Centre for the Replacement R R of A in R. Animal research: reporting in vivo experiments—the arrive guidelines. *J Cereb Blood Flow Metab.* (2011) 31:991–3. doi: 10.1038/jcbfm.2010.220
32. Schellinger PD, Jansen O, Fiebich JB, Hacke W, Sartor K. A standardized MRI stroke protocol: comparison with CT in hyperacute intracerebral hemorrhage. *Stroke.* (1999) 30:765–8. doi: 10.1161/01.STR.30.4.765
33. Kidwell CS, Chalela JA, Saver JL, Starkman S, Hill MD, Demchuk AM, et al. Comparison of MRI and CT for detection of acute intracerebral hemorrhage. *JAMA.* (2004) 292:1823–30. doi: 10.1001/jama.292.15.1823
34. Siddiqui FM, Bekker S V., Qureshi AI. Neuroimaging of hemorrhage and vascular defects. *Neurotherapeutics.* (2011) 8:28–38. doi: 10.1007/s13311-010-0009-x
35. Illanes S, Zhou W, Heiland S, Markus Z, Veltkamp R. Kinetics of hematoma expansion in murine warfarin-associated intracerebral hemorrhage. *Brain Res.* (2010) 1320:135–42. doi: 10.1016/j.brainres.2010.01.015
36. Knight RA, Han Y, Nagaraja TN, Whitton P, Ding J, Chopp M, et al. Temporal MRI assessment of intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke.* (2014) 39:2596–602. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.506683
37. Belayev L, Obenaus A, Zhao W, Saul I, Busto R, Wu C, et al. Experimental intracerebral hematoma in the rat: characterization by sequential magnetic resonance imaging, behavior, and histopathology. Effect of albumin therapy. *Brain Res.* (2007) 1157:146–55. doi: 10.1016/j.brainres.2007.04.077
38. Del Bigio MR, Yan H-J, Buist R, Peeling J. Experimental intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke.* (1996) 27:2312–20. doi: 10.1161/01.STR.27.12.2312
39. Wang M, Hong X, Chang CF, Li Q, Ma B, Zhang H, et al. Simultaneous detection and separation of hyperacute intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia using amide proton transfer (APT) MRI. *Magn Reson Med.* (2015) 74:42–50. doi: 10.1002/mrm.25690
40. Liu Y, Yang S, Cai E, Lin L, Zeng P, Nie B, et al. Functions of lactate in the brain of rat with intracerebral hemorrhage evaluated with MRI/MRS and in vitro approaches. *CNS Neurosci Ther.* (2020) 26:1031–44. doi: 10.1111/cns.13399
41. Enzmann DR, Britt RH, Lyons BE, Buxton JL, Wilson DA. Natural history of experimental intracerebral hemorrhage: sonography, computed tomography and neuropathology. *AJNR Am J Neuroradiol.* (1981) 2:517–26.
42. Seidel G, Kaps M, Dorndorf W. Transcranial color-coded duplex sonography of intracerebral hematomas in adults. *Stroke.* (1993) 24:1519–27. doi: 10.1161/01.STR.24.10.1519
43. Stroick M, Alonso A, Fatar M, Griebel M, Kreisel S, Kern R, et al. Effects of simultaneous application of ultrasound and microbubbles on intracerebral hemorrhage in an animal model. *Ultrasound Med Biol.* (2006) 32:1377–82. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2006.05.027
44. Zhou Y, Wang Y, Wang J, Anne Stetler R, Yang QW. Inflammation in intracerebral hemorrhage: from mechanisms to clinical translation. *Prog Neurobiol.* (2014) 115:25–44. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.003
45. Keep RF, Hua Y, Xi G. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets. *Lancet Neurol.* (2012) 11:720–31. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70104-7
46. Smith EE, Rosand J, Greenberg SM. Hemorrhagic stroke. *Neuroimag Clin N Am.* (2005) 15:259–72. doi: 10.1016/j.nic.2005.05.003
47. Kern R, Kablau M, Sallustio F, Fatar M, Stroick M, Hennerici MG, et al. Improved detection of intracerebral hemorrhage with transcranial ultrasound perfusion imaging. *Cerebrovasc Dis.* (2008) 26:277–83. doi: 10.1159/000147456
48. Blanco P, Do Pico JL, Matteoda M. Intracranial hematoma and midline shift detected by transcranial color-coded duplex sonography. *Am J Emerg Med.* (2015) 33:1715.e5–1715.e7. doi: 10.1016/j.ajem.2015.03.040
49. Pérez ES, Delgado-Mederos R, Rubiera M, Delgado P, Ribó M, Maisterra O, et al. Transcranial duplex sonography for monitoring hyperacute intracerebral hemorrhage. *Stroke.* (2009) 40:987–90. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.524249
50. Camps-Renom P, Méndez J, Granell E, Casoni F, Prats-Sánchez L, Martínez-Domeño A, et al. Transcranial duplex sonography predicts outcome following an intracerebral hemorrhage. *AJNR Am J Neuroradiol.* (2017) 38:1543–9. doi: 10.3174/ajnr.A5248
51. Mittal MK, LacKamp A. Intracerebral hemorrhage: perihemorrhagic edema and secondary hematoma expansion: from bench work to ongoing controversies. *Front Neurol.* (2016) 7:1–12. doi: 10.3389/fneur.2016.00210
52. Felberg RA, Grotta JC, Shirzadi AL, Strong R, Narayana P, Hill-Felberg SJ, et al. Cell death in experimental intracerebral hemorrhage: the “black hole” model of hemorrhagic damage. *Ann Neurol.* (2002) 51:517–24. doi: 10.1002/ana.10160
53. Xi G, Strahle J, Hua Y, Keep RF. Progress in translational research on intracerebral hemorrhage: is there an end in sight? *Prog Neurobiol.* (2014) 115:45–63. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.09.007
54. Bedussi B, Van Der Wel NN, de Vos J, Van Veen H, Siebes M, VanBavel E, et al. Paravascular channels, cisterns, and the subarachnoid space in the rat brain: a single compartment with preferential pathways. *J Cereb Blood Flow Metab.* (2017) 37:1374–85. doi: 10.1177/0271678X16655550

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Gómez-de Frutos, García-Suárez, Laso-García, Diekhorst, Otero-Ortega, Alonso de Leciñana, Fuentes, Gutiérrez-Fernández, Díez-Tejedor and Ruiz-Ares. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.