



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

“Mielografía e imagen molecular de la médula espinal mediante tomografía computarizada utilizando nanopartículas de oro en rata con lesión medular”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

P R E S E N T A

M. en C. Pablo Cleomenes Zambrano Rodríguez

COMITÉ DE TUTORES

Dr. Horacio José Reyes Alva. Tutor académico

Dr. Gabriel Guízar Sahagún. Tutor adjunto

Dr. Roberto Montes de Oca Jiménez. Tutor adjunto



El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México. Febrero 2022

RESUMEN

MIELOGRAFÍA E IMAGEN MOLECULAR DE LA MÉDULA ESPINAL MEDIANTE TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ORO EN RATA CON LESIÓN MEDULAR.

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) puede tener consecuencias motoras, sensitivas y vegetativas, en muchas ocasiones graves e irreversibles. El espacio subaracnoideo espinal (ESAE) es de vital importancia para el funcionamiento neurológico y la posible recuperación después de una LTME. Se conocen varias alteraciones de este espacio después de una LTME, pero existen pocos estudios de imágenes de alta resolución, como son los mielogramas en microtomografía computarizada (micro-TC). Los objetivos fueron explorar la viabilidad de obtener mielogramas utilizando micro-TC de alta resolución mediante sustracción digital de energía doble (ED) y energía única (EU) en ratas intactas y posteriormente evaluar los cambios en el ESAE de ratas sometidas a LTME. Se implementaron protocolos de obtención de imágenes mielográficas con ED y EU utilizando micro-TC en ratas adultas vivas Long-Evans (16 animales). Para cada protocolo se ensayaron agentes de contraste positivo a compuestos yodados (Iomeron® 400 y Fenestra® VC) y nanopartículas de oro (NPO, AuroVist™ 15 nm). Para ED, las imágenes en baja y alta energía se adquirieron después de la inyección de contraste; para EU, una imagen se adquirió antes y la otra después de la inyección del medio de contraste. El posprocesamiento consistió en la selección de la región de interés, el registro de imágenes, la resta ponderada y la alineación longitudinal. En lo que respecta al estudio del ESAE en ratas lesionadas (33 asignadas al azar en cinco grupos experimentales), primeramente los animales fueron sometidos a una contusión de la médula espinal (ME) leve o severa en T9. Se llevaron a cabo

estudios de imágenes de las variaciones de ESAE en ratas lesionadas en las etapas aguda (día 1) y subaguda (día 15) después de la lesión, así como en ratas de control, utilizando mielografía de micro-TC de alta resolución con un protocolo de sustracción digital de EU y medio de contraste Iomeron® 400. Después de los análisis cualitativos y cuantitativos (relación contraste-ruido [CNR]), se encontró que el protocolo de adquisición EU con Iomeron® 400 proporciona las mejores imágenes. Las representaciones de contornos 3D permitieron la visualización del ESAE e identificación de algunas estructuras anatómicas dentro de éste. Los análisis cualitativos y cuantitativos mostraron que la LTME induce cambios en el ESAE que varían en función de la gravedad de la lesión y el tiempo transcurrido después de la lesión. El bloqueo del ESAE fue la principal alteración detectada. Además, el método utilizado aquí permitió observar detalles finos, como por ejemplo las variaciones en las vías preferenciales para el flujo del medio de contraste, visualización de la raíz nerviosa y salida de medio de contraste debido al desgarro del saco dural. Estos estudios *in vivo* muestran el potencial de la mielografía con contraste con EU para obtener imágenes del ESAE en ratas. Se obtuvieron imágenes del ESAE en 2D y 3D de alta resolución sin interferencia de estructuras anatómicas adyacentes. La mielografía en micro-TC proporciona imágenes de alta resolución de cambios en el ESAE después de LTME en ratas y es una herramienta útil e innovadora para estudios experimentales adicionales que involucran lesiones medulares en rata *in vivo*.

ABSTRACT

MYELOGRAPHY AND MOLECULAR IMAGE OF THE SPINAL CORD BY COMPUTED TOMOGRAPHY USING GOLD NANOPARTICLES IN RATS WITH SPINAL INJURY.

Traumatic spinal cord injury (SCI) can have motor, sensory and vegetative consequences, often serious and irreversible. The spinal subarachnoid space (SSAS) is of vital importance for neurological function and recovery after an SCI. Although that SCI can alter SSAS is established, few high-resolution imaging studies are available, such as myelograms, in computed microtomography. The objectives were to explore the feasibility of obtaining myelograms of rats using high resolution microtomography by digital subtraction of double energy (DE) and single energy (SE) in intact rats, and then, evaluate the changes in the SSAS of rats that had experienced SCI. DE and SE myelographic imaging protocols using microtomography were implemented in live adult Long-Evans rats (1 animals). Positive contrast agents to iodinated compounds (Iomeron® 400 and Fenestra® VC) and gold nanoparticles (AuNPs, AuroVist™ 15 nm) were tested for each protocol. For DE, low and high energy images were obtained after contrast injection; for SE, one image was obtained before and the other after injection of the contrast medium. Post-processing comprised selecting the region of interest, image registration, weighted subtraction, and longitudinal alignment. Regarding the SSAS study in injured rats (33 randomized into five experimental groups), the animals were first exposed to a mild or severe spinal cord contusion at T9. Imaging studies of SSAAS variations were conducted in injured rats in the acute (day 1) and subacute (day 15) stages after injury, as well as in control rats, using high-resolution microtomography myelography with an SE digital subtraction protocol and Iomeron® 400

contrast medium. After qualitative and quantitative analyzes (contrast-noise ratio), the EU acquisition protocol with Iomeron® 400 provided the best images. The 3D contour representations allowed the visualization of the SSAS and identification of some anatomical structures within it. Qualitative and quantitative analyzes showed that SCI induces changes in SSAS that vary depending on the severity of the injury and the time elapsed after the injury. SSAS blockage was the main alteration detected. In addition, the method used here allowed the observation of fine details, such as variations in the preferential pathways for contrast medium flow, visualization of the nerve root, and contrast medium leakage because of the dural sac tear. These *in vivo* studies show the potential myelography with SE contrast to image SSAS in rats. High resolution 2D and 3D SSAS images were obtained without interference from adjacent anatomical structures. Microtomography myelography provides high-resolution images of SSAS changes after SCI in rats and is a useful and innovative tool for further experimental studies involving rat spinal cord injuries *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis se desarrolló dentro del proyecto de Investigación UAEM con número de registro 3650/2014E, bajo responsabilidad del Dr. José Horacio Reyes Alva y El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), bajo la responsabilidad del Dr. Gabriel Guízar Sahagún.

Gracias a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

A la Universidad Técnica de Manabí, y su rector Ing. Vicente Véliz Briones.

A Camina A.C., INCAN, Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la UAEM y al personal que labora por todo el apoyo brindado en la realización de este proyecto.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología CONACYT por permitirme cursar un posgrado y otorgarme una beca.

Gracias a mi tutor académico, el **Dr. Horacio Jose Reyes Alva** por todas sus enseñanzas académicas y de vida. Gracias por haber confiado en su servidor y por compartir sus conocimientos y la paciencia brindada durante los estudios de doctorado.

Al **Dr. Gabriel Guízar Sahagún** por el tiempo dedicado a mi trabajo y sus valiosas aportaciones.

Al **Dr. Roberto Montes de Oca Jiménez** por su gran ayuda y apoyo.

Al **Dr. Luis Alberto Medina**, por haberme permitido colaborar en INCAN.

A Angie Martínez, Sirio Bolaños, Robi de Los Santos, Nadia Peña, Luis Gonzáles, Jorge Varela.

DEDICATORIA

A mis padres Susana y Augusto. A mi hijo Pablo. A Pilar.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	MARCO TEÓRICO.....	7
2.1.	Médula espinal.....	7
2.1.1.	Segmentos medulares.....	8
2.1.2.	Divisiones longitudinales.....	8
2.2.	Meninges espinales.....	8
2.2.1.	Duramadre.....	9
2.2.2.	Aracnoides.....	10
2.2.3.	Piamadre.....	11
2.3.	Espacios entre las meninges.....	11
2.4.	Raíces y nervios espinales.....	12
2.4.1.	Dirección de las raíces.....	14
2.4.2.	Raíces ventrales.....	15
2.4.3.	Ganglios de la raíz dorsal.....	15
2.5.	Líquido cefalorraquídeo.....	16
2.5.1.	Secreción de líquido cefalorraquídeo.....	17
2.5.2.	Composición del líquido cefalorraquídeo.....	18
2.5.3.	Circulación del líquido cefalorraquídeo.....	18
2.5.4.	Absorción de líquido cefalorraquídeo.....	19
2.5.5.	Absorción extraaracnoidea.....	20
2.6.	Fisiopatología de la lesión medular.....	22
2.6.1.	Trastornos circulatorios.....	23

2.6.2. Edema	24
2.6.3. Inflamación	25
2.7. Lesión medular experimental	25
2.8. Métodos de imagen.....	26
2.8.1. Mielografía	27
2.9. Protocolos de sustracción digital	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo general	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. HIPÓTESIS	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
5.1. Diseño experimental	33
5.2. Preparación de animales	34
5.2.1. Anestesia.....	34
5.2.2. Lesión y cuidados	34
5.2.3. Canulación	35
5.2.4. Administración de agentes de contraste	35
5.3. Adquisición y reconstrucción de imágenes	36
5.3.1. Posprocesamiento de imágenes	37
5.3.2. Evaluación de la imagen y análisis estadístico para el primer experimento (obtención de técnica mielográfica).	39
5.3.3. Evaluación de la imagen y análisis estadístico para el segundo experimento (estudio del espacio subaracnoideo espinal en ratas lesionadas)	40

6.	RESULTADOS	43
6.1.	Desarrollo de técnica mielográfica	43
6.2.	Estudio de alteraciones del espacio subaracnoideo espinal en ratas lesionadas	48
6.2.1.	Permeabilidad del espacio subaracnoideo espinal	48
6.2.2.	Rutas preferenciales para el flujo del medio de contraste	53
6.2.3.	Presencia de medio de contraste alrededor de las raíces nerviosas	59
7.	DISCUSIÓN.....	62
7.1.	Desarrollo de técnica mielográfica y prueba en ratas íntegras	62
7.2.	Caracterización de cambios en el espacio subaracnoideo espinal en ratas con lesión medular.....	66
8.	CONCLUSIONES.....	73
9.	BIBLIOGRAFÍA	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista dorsal de médula espinal y nervios espinales.	7
Figura 2. Vista anterior y corte transversal de médula espinal.....	9
Figura 3. Fotografía de una disección de la médula espinal y raíces espinales.....	14
Figura 4. Relación entre la columna vertebral y los nervios espinales.	15
Figura 5. Esquema de las raíces dorsales de la médula espinal.....	16
Figura 6. Representación esquemática de las granulaciones aracnoideas craneales.	19
Figura 7. Esquema de circulación del líquido cefalorraquídeo en humanos.	21
Figura 8. Imágenes transversales representativas del espacio subaracnoideo espinal.	40
Figura 9. Regiones medulares de estudio cualitativo.	42
Figura 10. Imágenes de cortes longitudinales de mielograma en micro-TC en 2D con Iomeron® 400.....	44
Figura 11. Imágenes transversales del espacio subaracnoideo espinal en 2D después de haber realizado la resta digital de un segmento en la región torácica media con los dos métodos de resta digital y los tres medios de contraste.	45
Figura 12. Representación tridimensional del espacio subaracnoideo espinal a partir del resultado de la sustracción de una adquisición con el protocolo energía única e Iomeron® 400.	46
Figura 13. Resultados del análisis cuantitativo de la relación contraste-ruido mediante diagrama de caja y bigotes.....	47
Figura 14. Imágenes longitudinales representativas del espacio subaracnoideo espinal permeable al flujo de medio de contraste de una rata con lesión subaguda severa.	49

Figura 15. Imágenes longitudinales representativas de una rata con lesión subaguda severa.	50
Figura 16. Efectos de la gravedad y el tiempo transcurrido después de la lesión en la permeabilidad del espacio subaracnoideo espinal.	51
Figura 17. Efectos de la intensidad y el tiempo transcurrido después de la lesión en la distribución del medio de contraste a lo largo del espacio subaracnoideo.	52
Figura 18. Diagrama de la distribución transversal del medio de contraste en el espacio subaracnoideo espinal en ratas del grupo control.	54
Figura 19. Diagrama de la distribución transversal del medio de contraste en el espacio subaracnoideo espinal en ratas con lesión traumática de médula espinal aguda leve.	55
Figura 20. Diagrama de la distribución transversal del medio de contraste en el espacio subaracnoideo en ratas del grupo con lesión traumática de médula espinal subaguda leve.	56
Figura 21. Diagrama de la distribución transversal del medio de contraste en el espacio subaracnoideo espinal en ratas del grupo con lesión traumática de médula espinal aguda severa.	57
Figura 22. Diagrama de la distribución transversal del medio de contraste en el espacio subaracnoideo en ratas del grupo con lesión traumática subaguda severa.	58
Figura 23. Imágenes longitudinales representativas del cambio en la vía preferencial del flujo del medio de contraste más hacia craneal del sitio de la lesión, de una rata con lesión traumática de médula espinal subaguda leve.	59
Figura 24. Imágenes representativas de la presencia del medio de contraste en el manguito de las raíces nerviosas.	60
Figura 25. Imágenes de la fuga del medio de contraste en el sitio de la laminectomía.	61

Figura 26. Estudio histopatológico del sitio de lesión en fase aguda que muestra patologías de la médula espinal y espacio subaracnoideo espinal. 67

Figura 27. Estudio histopatológico del sitio de lesión en fase crónica que muestra patologías de la médula espinal y espacio subaracnoideo espinal. 69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Grupos experimentales	33
--	----

ABREVIATURAS

ATP. Adenosin trifosfato

CNR. Relación contraste-ruido

EA. Energía alta

EB. Energía baja

ED. Energía doble

ESAE. Espacio subaracnoideo espinal

EU. Energía única

LCR. Líquido cefalorraquídeo

LTME. Lesión traumática de médula espinal

ME. Médula espinal

Micro-TC. Microtomografía computarizada

NPO. Nanopartículas de oro

SNC. Sistema nervioso central

TC. Tomografía computarizada

TNF- α . Factor de necrosis tumoral alfa

1. INTRODUCCIÓN

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) puede originar daños devastadores, permanentes e irreversibles, que provocan daños sensitivos, motores y autónomos, desde el sitio de la lesión hacia caudal. Constituye uno de los eventos médicos más graves en el hombre y en animales, especialmente cuando ocurre en individuos sanos y jóvenes.

La LTME tiene una alta tasa de prevalencia en el segmento de jóvenes dentro de la población humana, aunque los casos en personas mayores han aumentado progresivamente (Algahtany *et al.*, 2021); esta patología ocasiona muchas cargas físicas, emocionales y económicas para el individuo, la familia y la sociedad; considerando que este evento ocurre en la etapa del individuo laboralmente más productiva. Existen aproximadamente 10,000 nuevos casos de parálisis aguda como consecuencia de LTME por año en los Estados Unidos y los costos del gobierno utilizados en los cuidados, tratamientos, terapias de rehabilitación, asistencia psicológica, se estiman en 10 mil millones de dólares por año aproximadamente (Carlson y Gorden, 2002; Eli *et al.*, 2021).

La fisiopatología de la LTME es altamente compleja y aunque el estudio de sus características y particularidades ha progresado recientemente, se desconocen algunos de los eventos desencadenados en el mismo, así como detalles de su cronología y fenómenos extramedulares, entre otros. Es muy importante el estudio y descubrimiento de nuevos eventos relacionados a esta lesión, para poder desarrollar, mejorar y monitorear terapias potenciales que prevengan daños subsecuentes, que conlleven a mejorar el pronóstico neurológico.

El diagnóstico adecuado por medio de técnicas de imagen como mielografías y tomografía axial computarizada con medios de contraste positivo es importante para evaluar la LTME,

establecer el sitio de la lesión, además de su gravedad y extensión. El estudio de nuevos eventos con estas herramientas diagnósticas permitirá proponer terapias adecuadas y conocer un pronóstico más acertado. La tomografía axial computarizada ha sido descrita y utilizada en perros y gatos, pero no en 3D, ni tampoco con una alta resolución, como ocurre con la micro-TC en animales de laboratorio, especialmente en ratas.

La rata representa un modelo biológico idóneo para estudiar enfermedades, traumatismos y la terapéutica de la columna vertebral de humanos y de animales, y es una especie ampliamente utilizada en estudios sobre fisiopatología y terapéutica (Kjell y Olson, 2016; Meyer *et al.*, 2021). En este biomodelo se pueden reproducir diversos tipos o modalidades de lesiones e introducir variables, a diferencia de otras especies como perros, gatos, primates no humanos y cerdos que son especies más afectivas, su alojamiento es más costoso, y también poseen consideraciones éticas estrictas (Matsuura *et al.*, 2021). Cuando se dispone de instrumentos, equipos e instalaciones necesarios para producir LTME, se cuenta con conocimientos de neuroanatomía para efectuar microcirugías y con facilidades logísticas para vaciar manualmente la vejiga e intestinos dos veces al día, la especie murina es la más adecuada (Lee y Lee, 2013).

La regeneración de la ME lesionada es una de las tareas médicas más difíciles que enfrenta la neurociencia. Hasta hace poco tiempo este objetivo se consideraba una tarea imposible, sin embargo, muchas investigaciones realizadas en las últimas dos décadas han proporcionado una mejor visión y comprensión de los fundamentos y mecanismos de la lesión medular, inclusive hasta nivel molecular, por todo ello se cree que la neuroregeneración es una posibilidad alcanzable. Es muy probable que los tratamientos

futuros manejen un enfoque multimodal, aprovechando nuevos conocimientos de la fisiopatología de la lesión para mejorar el resultado en pacientes después de una LTME.

Existen dos mecanismos de lesión de la ME: Lesión primaria y lesión secundaria. Los mecanismos de lesión primaria se desarrollan inmediatamente al producirse la lesión, es imposible prevenirla y no tiene ventana terapéutica. Los mecanismos de lesión secundaria ocurren después, y van desarrollándose de manera sucesiva en reacciones de cascada (Yao *et al.*, 2021). Se han identificado al menos 26 mecanismos fisiopatológicos de lesión secundaria, establecidos dentro del parénquima medular, y probablemente existan más mecanismos aún no identificados. Es importante la comprensión y conocimiento de los mecanismos que la originan y sus complejidades para establecer alguna estrategia terapéutica en la búsqueda persistente de la cura de la lesión medular.

La mayoría de estos mecanismos patológicos han sido estudiados ampliamente dentro del parénquima medular, por ejemplo: la determinación de la proporción de apoptosis, la necrosis de tejidos, la determinación de mieloperoxidasa como indicador de la actividad de neutrófilos, la medición de la concentración de malondialdehído como biomarcador de peroxidación lipídica, la medición de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la medición de mediadores inflamatorios como iNOS para determinar el rol de óxido nítrico (Paterniti *et al.*, 2009), la formación de cavitación, la presencia de hemorragias, la inflamación y la formación de edema después de una LTME, (Reyes-Alva *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 1997); sin embargo, no existen suficientes estudios extramedulares.

El espacio subaracnoideo espinal (ESAE) se encuentra entre las meninges aracnoides y piamadre, es relevante para el desarrollo, función y reparación de la ME y raíces nerviosas espinales, contiene vasos sanguíneos y está ocupado por el líquido cefalorraquídeo (LCR)

(Brodbelt y Stoodley, 2007; Yoshizawa, 2002; Zappaterra y Lehtinen, 2012). Los traumatismos, tumores o infecciones en la columna vertebral pueden afectar la estructura y la función del ESAE, pudiendo resultar en una disminución del flujo del LCR, esto ocurre en varias patologías como podría ser en la aracnoiditis, la siringomielia o radiculopatías, entre otras (Brodbelt *et al.*, 2003; Grossman y Krabak, 1999; MaxMauer *et al.*, 2011; Reyes-Alva *et al.*, 2013). Estas alteraciones de ESAE pueden también interferir con los mecanismos de autoreparación (Bothwell *et al.*, 2021) o con la llegada de agentes terapéuticos administrados por vía intratecal (Mason *et al.*, 1998).

Se han realizado algunas investigaciones sobre alteraciones en espacios extramedulares después de LTME, en donde se reportó la obstrucción del ESAE y variaciones de la presión, (Kwon *et al.*, 2009). Se ha estudiado la permeabilidad del ESAE mediante la realización un método de evaluación de la permeabilidad basado en la recuperación y cuantificación de partículas superparamagnéticas, mielografías y estudios histopatológicos. Estas alteraciones podrían considerarse como un nuevo mecanismo secundario de lesión secundaria (Franco-Bourland *et al.*, 2013; Franco-Bourland *et al.*, 2015; Reyes-Alva *et al.*, 2014) ,

Reyes-Alva *et al.* (2013) encontraron que la contusión medular se asociaba con alteraciones extramedulares que pueden afectar, obstaculizar y/o suprimir la circulación del LCR durante las fases tempranas de la lesión. Estas observaciones fueron obtenidas principalmente de estudios histopatológicos y las variaciones cualitativas del ESAE fueron apreciadas sin LCR en ratas *ex vivo*. Entre las alteraciones más notables después de una LTME se encuentra el bloqueo temprano del ESAE y una forma de fibrosis tardía conocida como aracnoiditis postraumática. Sin embargo, para identificar, caracterizar y monitorear de una manera más amplia las condiciones patológicas que involucran al ESAE en ratas, se necesitaban técnicas

de imagen avanzadas, de manera que en nuestra investigación fue posible observar algunos eventos patológicos *in vivo* utilizando imágenes adquiridas con micro-TC en ratas lesionadas. Se necesitan más estudios avanzados de imagen del ESAE, adicionales a los estudios histopatológicos ya efectuados, en las etapas aguda y subaguda después de la lesión, ya que este es el período de tiempo en el que tienen lugar los mecanismos de lesión secundaria y los intentos de reparación endógenos.

Antes de la presente investigación, no existían métodos para obtener mielogramas de alta resolución en roedores. La mielografía convencional estaba basada en técnicas radiográficas bidimensionales, se limitaba principalmente a la identificación de procesos obstructivos y no proporcionaba información espacial detallada sobre la anatomía fina del ESAE. A pesar de que se han utilizado métodos de imagen más sofisticados, como la resonancia magnética, y la imagen de radionúclidos para la imagen clínica del ESAE, ninguno de estos métodos había sido reportado para la evaluación ESAE en roedores en estudios preclínicos.

Por otra parte, en los mielogramas de micro-TC convencionales, las densidades radiográficas de las estructuras óseas (vértebras, costillas y esternón) y del medio de contraste radiográfico positivo inyectado al ESAE, son muy similares y pueden superponerse, dificultando la evaluación adecuada del ESAE de ratas sanas o lesionadas. En nuestra investigación fue necesario diseñar un protocolo de sustracción digital micro-TC con medio de contraste, que permitió eliminar la superposición de ambas densidades, dando como resultado imágenes selectivas del ESAE contrastado. Se utilizaron dos protocolos de sustracción con medios de contraste positivo. El primer protocolo fue sustracción de energía doble (ED), que aprovecha las diferencias en el grado en que los tejidos y los agentes de contraste atenúan las radiografías de baja y alta energía (Castillo *et al.*, 2016; Kuhlman *et al.*, 2006; Lewin *et al.*,

2003; Li *et al.*, 2008). El otro protocolo, fue llamado sustracción de energía única (EU), se basó en la sustracción de una imagen sin medio de contraste de una imagen con medio de contraste, ambas adquiridas al mismo kilovoltaje; es decir, con el mismo espectro de energía de rayos X (Berumen *et al.*, 2016; Cruz-Bastida *et al.*, 2012).

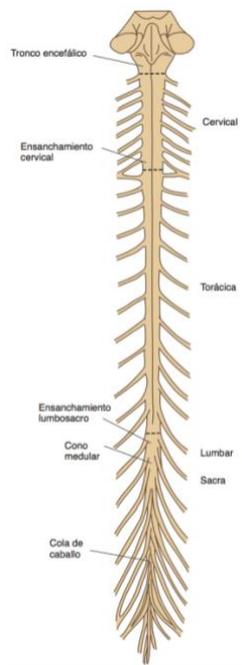
En el presente trabajo se analizaron las alteraciones del ESAE y de la ME mediante mielografía utilizando micro-TC *in vivo* en ratas sanas y con LTME, utilizando medios de contrastes no conjugados (compuestos yodados y nanopartículas de oro [NPO]). Una de las novedades del presente estudio radica en el uso de protocolos de sustracción de imágenes digitales para obtener imágenes en 2D y 3D selectivas de alta resolución de ESAE en ratas intactas y lesionadas. Los resultados obtenidos permitirán una mejor comprensión sobre las alteraciones en los espacios extramedulares y en los mecanismos fisiopatológicos de la LTME, así como para planificar futuras terapias.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Médula espinal

Ocupa dos tercios superiores dentro del canal vertebral en el hombre. El límite superior de la ME es el bulbo raquídeo y el límite inferior se llama cono medular, que termina a nivel de la vértebra lumbar 1 o 2 (L1 o L2). El filum terminal empieza desde la punta del cono y consiste en piamadre, fibras gliales y muchas veces contiene una vena. La ME posee dos ensanchamientos o intumescencias: la cervical (C6 a T2) de donde se originan los nervios del miembro torácico, y la lumbosacra (L4 a S3) de donde se originan los nervios del miembro pélvico (figura 1) (Waxman, 2011).

Figura 1. Vista dorsal de médula espinal y nervios espinales.



Nota. Esquema donde se observan las intumescencias cervical y lumbosacra (Waxman, 2011).

2.1.1. Segmentos medulares

La ME está dividida en 30 segmentos medulares y no existen límites definidos entre ellos: 8 segmentos cervicales (C), 12 segmentos torácicos (T), 5 segmentos lumbares (L), 5 segmentos sacros (S) y unos pocos segmentos pequeños coccígeos (Co), que corresponden a las uniones de grupos de raíces nerviosas. La ME es más corta que la columna vertebral, por esta razón cada segmento medular a niveles inferiores se localiza por encima del cuerpo vertebral con un número similar (Waxman, 2011).

2.1.2. Divisiones longitudinales

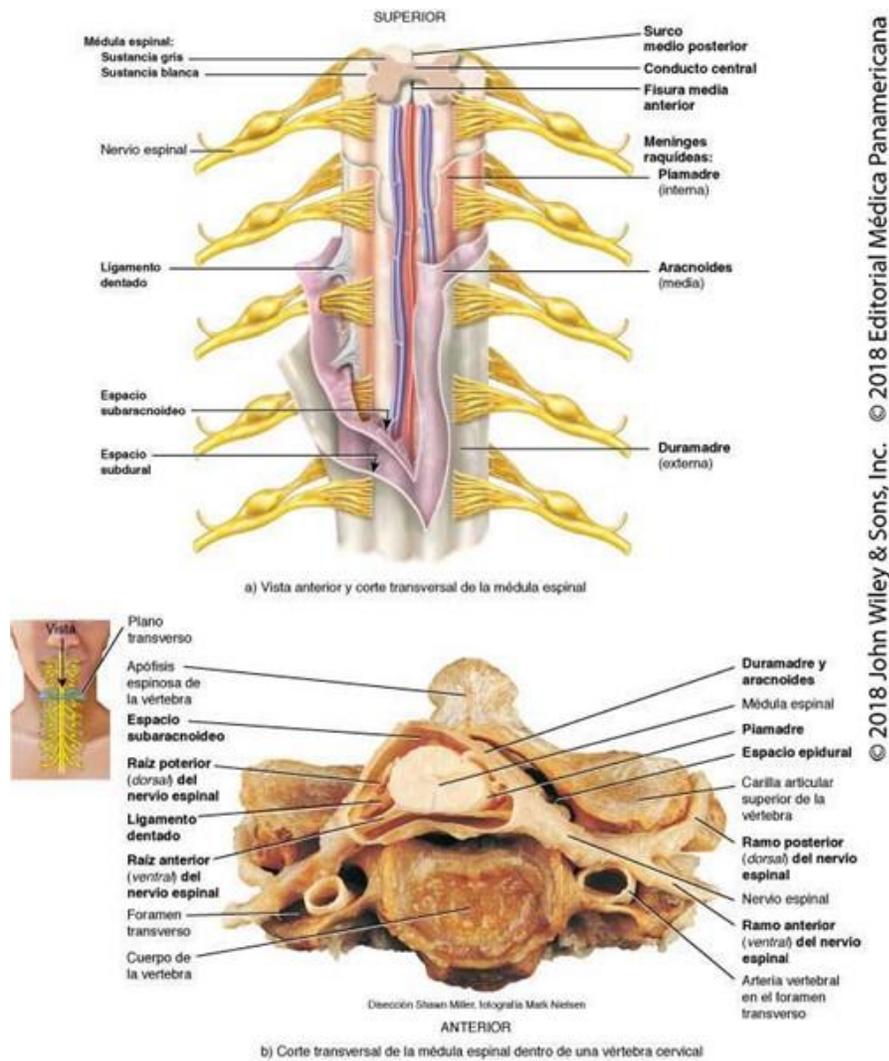
Un corte transversal de la ME muestra una profunda cisura mediana anterior y un surco mediano o posterior superficial, que dividen a la médula en mitades derecha e izquierda simétricas, unidas en la porción media central. La cisura mediana anterior contiene un pliegue de piamadre y vasos sanguíneos, y su piso es la comisura blanca anterior ventral. Las raíces nerviosas dorsales están unidas a la ME siguiendo la hendidura vertical superficial, el surco posterolateral, el cual descansa a poca distancia anterior al surco mediano posterior. Las raíces nerviosas ventrales salen por el surco anterolateral (Watson y Kayalioglu, 2008).

2.2. Meninges espinales

La ME está cubierta por 3 membranas de tejido conectivo llamadas meninges, la capa externa se denomina duramadre, la intermedia aracnoides y la interna piamadre (figura 2). La duramadre y la aracnoides son consideradas en ocasiones como una única membrana, la leptomeninge (saco dural o tecal). También se ha descrito una capa leptomeníngea fenestrada intermedia que se une a la cara interna de la aracnoides (Kayalioglu, 2009b; Nicholas y

Weller, 1988; Reina *et al.*, 2010). Estas membranas, y el LCR que se ubica en el ESAE, protegen y nutren la ME y las raíces nerviosas espinales.

Figura 2. Vista anterior y corte transversal de médula espinal.



Nota. Visualización de meninges y espacios entre meninges.

2.2.1. Duramadre

La duramadre es una membrana que envuelve la ME, se une a la duramadre craneal en el foramen magno, y forma caudalmente el ligamento coccígeo que se fusiona a las vértebras

coccígeas. Lateralmente, la duramadre se extiende sobre las raíces nerviosas. En esta región, las arterias espinales, las venas y los vasos linfáticos perforan la duramadre a medida que se dirigen hacia la ME a través del espacio subaracnoideo (Newell, 1999). La duramadre está separada de la columna vertebral por el espacio epidural (extradural). Existe una estructura de tejido blando ubicada entre la duramadre y la columna vertebral llamada membrana peridural que existe en cualquier punto donde no hay periostio, y es un equivalente del periostio (Liem y Vogt, 2012; Wiltse, 2000).

2.2.2. Aracnoides

Es llamada así por su aspecto de tela de araña, es una membrana fina y transparente que rodea la ME como un saco holgado. Se prolonga con la aracnoides cerebral al pasar a través del foramen magno y por el otro extremo desciende caudalmente al nivel vertebral S2. Se encuentra unida íntimamente a la superficie interna de la duramadre y está separada de la piamadre por el espacio subaracnoideo que contiene el LCR. La aracnoides está compuesta de colágeno y fibras elásticas. Su superficie exterior (dural) es más suave que la interior (pial), y de esta última salen las trabéculas aracnoideas que forman un puente sobre el espacio subaracnoideo hasta llegar a la piamadre (Nicholas y Weller, 1988). La capa externa de la aracnoides está compuesta de células planas que son impermeables al LCR debido a las estrechas uniones intercelulares (Haines, 1991; Reina *et al.*, 2010; Vandenabeele *et al.*, 1996; Weller, 2005).

Las vellosidades aracnoideas y granulaciones son proyecciones similares a las del cráneo en los sitios de raíces nerviosas espinales emergentes en perros, ovejas (Gomez *et al.*, 1974) y humanos (Kido *et al.*, 1976), y desempeñan un papel importante en el drenaje del LCR.

2.2.3. Piamadre

Es la capa meníngea más interna, y se adhiere firmemente a la superficie externa de la ME. Contiene células piales superpuestas planas, con un núcleo de forma ovalada y un pequeño nucleolo; estas células constituyen una capa continua unida por desmosomas y uniones huecas, lo que hace que esta capa sea impermeable al LCR (Alcolado *et al.*, 1988).

Todas las meninges se prolongan junto con las raíces nerviosas espinales cuando salen de la ME por los agujeros intervertebrales, donde se unen con el perineuro de los nervios espinales. Entre las uniones de las raíces dorsales y ventrales, la piamadre da origen una serie de extensiones laterales intermitentes conocidas como ligamentos denticulados. Estos forman 21 procesos similares a dientes en cada lado que unen la ME a la duramadre a través de la membrana aracnoidea (Tubbs *et al.*, 2001).

2.3. Espacios entre las meninges

Existe tres espacios situados entre la cara interna del canal raquídeo y la ME: epidural (extradural), subdural y subaracnoideo (Kayalioglu, 2009b).

El espacio epidural se encuentra ubicado entre la pared del canal vertebral y la duramadre, contiene tejido conectivo laxo, grasa epidural, vasos linfáticos, raíces nerviosas espinales y el plexo venoso vertebral interno. Está limitado por el ligamento longitudinal posterior, el ligamento flavo y el periostio de la lámina ósea posterior, los pedículos de las vértebras y los agujeros intervertebrales con sus contenidos lateralmente. El espacio epidural se limita cranealmente en el agujero magno donde la dura espinal se une a la dura endostial del cráneo y caudalmente en el hiato sacro por el ligamento sacrococcígeo. El espacio epidural lumbar es segmentado y discontinuo porque la duramadre se adhiere en muchas áreas directamente a la pared de la columna vertebral (Ellis, 2009; Harrison, 1999).

El espacio subdural es un espacio virtual situado entre las meninges duramadre y la aracnoides, ambas se encuentran contiguas debido a la presión del LCR; este espacio es real cuando una colección sanguínea o purulenta separa la duramadre de la aracnoides. Se ha propuesto que el espacio subdural no es un espacio anatómico normal, sino que es el efecto del daño tisular donde las membranas celulares de la capa celular del borde dural se dañan o las uniones celulares se separan (Haines, 1991; Vandenabeele *et al.*, 1996).

El ESAE es un espacio situado entre la aracnoides y la piamadre, y contiene el LCR. Posee colágeno extracelular y fibroblastos que forman trabéculas aracnoideas, que se extienden desde la aracnoides hasta la piamadre (Haines, 1991). El espacio subaracnoideo se extiende caudalmente hasta el nivel de la segunda vértebra sacra. Hay un drenaje sustancial del LCR del espacio subaracnoideo a nivel de la columna vertebral (Bozanovic-Sosic *et al.*, 2001). El ESAE es empleado como vía de administración de agentes terapéuticos en varias patologías del sistema nervioso central (SNC) (Yang *et al.*, 2021).

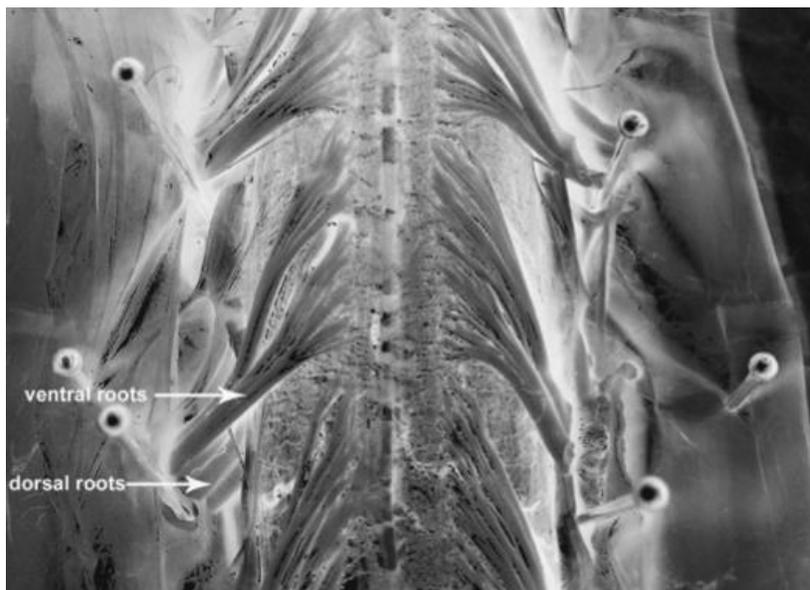
2.4. Raíces y nervios espinales

Los nervios espinales (aferentes) envían información sensorial desde los órganos efectores hasta el SNC, y reciben estímulos motores (por vías eferentes) procedentes del cerebro y ME hacia los músculos y glándulas efectoras. Los nervios espinales salen de la ME en toda su extensión a través de los forámenes intervertebrales. Cada segmento de la ME se asocia con cuatro raíces: ventral y dorsal izquierdas y un par similar a la derecha. En humanos existen 31 pares de nervios espinales: 8 cervicales (C1-C8), 12 torácicos (T1-T12), 5 lumbares (L1-L5), 5 sacros (S1-S5) y 1 coccígeo (Co1); mientras que en la rata existen 34 pares: 8 cervicales, 13 torácicos, 6 lumbares, 4 sacros y 3 coccígeos (Darby, 2014; Kayalioglu, 2009a).

En humanos, los primeros siete nervios espinales cervicales surgen del foramen intervertebral superior a sus vértebras respectivas, los restantes nervios salen por el foramen intervertebral inferior a sus respectivas vértebras. El primer segmento medular cervical carece de raíces dorsales. El nervio que emerge entre C7 y T1 se denomina octavo nervio cervical (C8). Cada nervio espinal se une a la ME por medio de una raíz anterior y posterior. Cada raíz se compone de seis a ocho raicillas que se extienden a lo largo de toda la longitud del segmento correspondiente de la ME. Las raicillas anteriores están constituidas por axones de neuronas motoras inferiores y las raicillas posteriores están formadas por axones de neuronas sensoriales. Las raíces del nervio lumbosacro constituyen la llamada cola de caballo o cauda equina, que inician debajo de la terminación de la ME, llamado cono medular (Kayalioglu, 2009a).

La piamadre y la aracnoides recubren las raíces dorsales y ventrales hasta el punto donde penetran la duramadre, convirtiéndose en una envoltura dural que continúa con el epineuro del nervio espinal (figura 3). En el sitio de unión de cada raicilla a la ME, hay una zona de transición entre el SNC y el sistema nervioso periférico, las vainas están formadas por oligodendrocitos y por células de Schwann respectivamente (Fraher, 1999).

Figura 3. Fotografía de una disección de la médula espinal y raíces espinales.

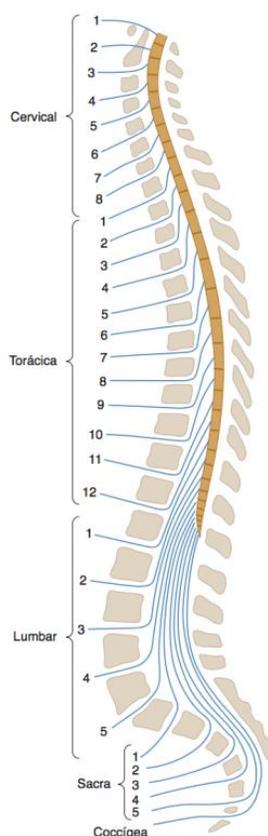


Nota. Se observa la superficie ventral de la ME y las raicillas ventrales y dorsales. La duramadre y la aracnoides han sido removidas (Kayalioglu, 2009a).

2.4.1. Dirección de las raíces

Hasta el tercer mes de vida fetal en humanos, la ME es tan larga como el canal vertebral, después de ese momento, la columna vertebral se extiende con más rapidez que la ME de modo que al nacer, se extiende aproximadamente al nivel de la tercera vértebra lumbar. En adultos, el extremo de la ME suele hallarse al nivel de la primera o segunda vértebra lumbar en humanos. Debido a las diferentes tasas de crecimiento de la ME y columna vertebral, los segmentos medulares se desplazan hacia arriba con respecto a sus vértebras correspondientes, con la mayor discrepancia en los segmentos inferiores (figura 4). En la región lumbosacra, las raíces nerviosas descienden casi verticalmente por debajo de la ME para formar la cauda equina (Bakkum, 2014; Darby, 2014; Tortora y Derrickson, 2018).

Figura 4. Relación entre la columna vertebral y los nervios espinales.



Nota. Existe desigualdad entre la ubicación de los segmentos medulares y el nivel donde salen las raíces espinales desde la columna vertebral (Waxman, 2011).

2.4.2. Raíces ventrales

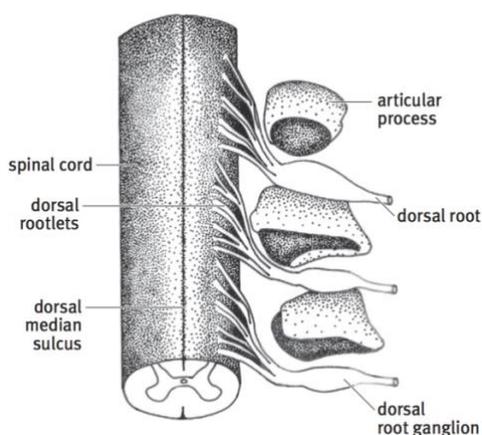
Emergen de la ME por una serie de raicillas a través del surco ventrolateral, y consisten predominantemente en fibras motoras somáticas eferentes (Mawe *et al.*, 1984).

2.4.3. Ganglios de la raíz dorsal

Cada raíz espinal dorsal tiene un engrosamiento ovoide llamado ganglio de la raíz dorsal, se encuentra cerca de la unión de las raíces dorsales y ventrales, están formadas por neuronas pseudounipolares sensoriales primarias (Takahashi y Ninomiya, 1987). Los ganglios de la

raíz dorsal están encapsulados en un tejido conectivo condensado que es continuo con la vaina de los nervios periféricos (figura 5) (Kayalioglu, 2009a). Las raíces dorsales son principalmente sensoriales y transmiten información de estímulos nocivos (dolor) y térmicos (Moore, 2013)

Figura 5. Esquema de las raíces dorsales de la médula espinal.



Nota. Se observan tres ganglios de la raíz dorsal cercanos a una sección de la ME. Varias raicillas dorsales desembocan en cada ganglio de la raíz dorsal (Kayalioglu, 2009a).

2.5. Líquido cefalorraquídeo

Su función principal es otorgar una protección hidromecánica al SNC; participa manteniendo la homeostasis en el líquido intersticial del parénquima cerebral y en el funcionamiento neuronal, mediante la regulación del equilibrio electrolítico, el transporte de moléculas activas y la eliminación de catabolitos. Transporta los productos de secreción desde el plexo coroideo a sitios específicos de acción y gracias a este modo de distribución, modula la actividad de ciertas regiones del cerebro por impregnación, mientras que la transmisión sináptica produce cambios más rápidos de actividades (Veening y Barendregt, 2010). Los desechos del metabolismo cerebral, los productos de peroxidación y las proteínas glicosiladas

se acumulan con la disminución de la renovación del LCR relacionada con la edad (Matsumae *et al.*, 2016; Sakka *et al.*, 2011).

El volumen del LCR estimado en un hombre adulto es de aproximadamente 150 ml, distribuidos de la siguiente forma: 125 ml en los espacios subaracnoideos craneales y espinales y 25 ml en los ventrículos, aunque existen marcadas variaciones individuales (Sakka *et al.*, 2011).

2.5.1. Secreción de líquido cefalorraquídeo

El volumen secretado en humanos adultos varía entre 400 y 600 ml por día. El 60 al 65 % se produce en los plexos coroideos del piso de los ventrículos laterales y la tela coroidea del tercer y cuarto ventrículos. Los plexos coroideos son protuberancias meníngeas granulares en la luz ventricular, cuya superficie epitelial se continúa con el epéndimo (Vigh *et al.*, 2004). Puede haber una secreción extracoroidea que se origina del líquido extracelular y los capilares cerebrales a través de la barrera hematoencefálica. Esta vía desempeña un papel mínimo en condiciones fisiológicas (Sakka *et al.*, 2011). En humanos el LCR es renovado continuamente (de cuatro a cinco veces por día). En ancianos de 77 años de edad puede haber un aumento relativo del compartimento del LCR con respecto al parénquima cerebral ocasionados por cierta atrofia cerebral y una reducción de la renovación del LCR de hasta tres veces al día (Johanson *et al.*, 2008).

En humanos la presión del LCR es variable, pudiendo fluctuar entre 10 y 15 mm Hg en adultos y 3 y 4 mm Hg en lactantes, donde los valores más altos de cada rango pueden ser indicativos de hipertensión intracraneal. La presión del LCR puede variar por la onda del pulso sistólico, el ciclo respiratorio, la presión abdominal, la presión venosa yugular, el

estado de excitación, la actividad física y la postura corporal (Bothwell *et al.*, 2021; Sakka *et al.*, 2011).

2.5.2. Composición del líquido cefalorraquídeo

Las concentraciones de sodio, cloro y magnesio son más altas que las del plasma sanguíneo, mientras que las concentraciones de potasio y calcio son más bajas. El recuento de células en el LCR no supera las cinco células por mililitro. Existen variaciones de la composición en un mismo día, es así como las concentraciones máximas de sodio ocurren a las 8:00 horas y a las 18:00 horas, mientras que las concentraciones de potasio y la osmolaridad no sufren modificaciones (Artru, 2017; Harrington *et al.*, 2010).

2.5.3. Circulación del líquido cefalorraquídeo

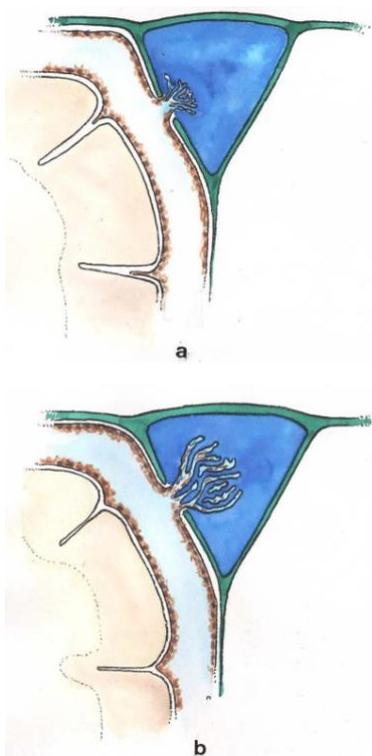
El LCR se mueve desde los sitios de secreción hacia los sitios de absorción con un flujo unidireccional rostro caudal en las cavidades ventriculares y un flujo multidireccional en los espacios subaracnoideos (figura 7). El flujo es pulsátil y es generado por la onda del pulso sistólico en las arterias coroideas y las ondas respiratorias rápidas. Es producido en los ventrículos laterales y se dirige a través de agujeros interventriculares al tercer ventrículo y luego al cuarto ventrículo a través del acueducto cerebral y finalmente a los espacios subaracnoideos a través de la abertura media (agujero de Magendie). En el espacio subaracnoideo craneal el LCR circula rostralmente hacia las granulaciones aracnoideas o caudalmente hacia el ESAE. El LCR, es drenado parcialmente por las vellosidades aracnoideas espinales y circula rostralmente hacia el espacio subaracnoideo craneal (Sakka *et al.*, 2011). El movimiento de los cilios de células del revestimiento endimario de los ventrículos cerebrales ayuda en el flujo del LCR; y las ciliopatías (falta de movimiento,

acortamiento o ausencia de cilios) podrían estar implicadas en la existencia de ventriculomegalia e hidrocefalia (Kumar *et al.*, 2021).

2.5.4. Absorción de líquido cefalorraquídeo

Se absorbe básicamente en el sistema yugular interno por medio de las granulaciones aracnoideas craneales (Welch y Friedman, 1960) (figura 6). El gradiente de presión entre los espacios subaracnoideos y el seno venoso necesario para asegurar el drenaje del LCR es de entre 3 y 5 mm Hg (Pollay, 2010).

Figura 6. Representación esquemática de las granulaciones aracnoideas craneales.



Nota. Estas protuberancias meníngeas tienen forma de dedo revestidas de endotelio en los senos venosos craneales a través de la duramadre (a). Funcionan como una válvula, cuando aumenta la presión del LCR, se desarrollan las vellosidades aracnoideas, lo que aumenta su superficie de intercambio y absorción del mismo (b) (Welch y Friedman, 1960).

Las vellosidades aracnoideas espinales en contacto con el plexo venoso epidural constituyen una vía de absorción del LCR, especialmente durante el esfuerzo. Existen diferentes formas de vellosidades aracnoideas que están presentes en las vainas meníngeas de las raíces nerviosas espinales, algunas vellosidades atraviesan parcialmente la epidural y otras la atraviesan totalmente (Sakka *et al.*, 2011).

2.5.5. Absorción extraaracnoidea

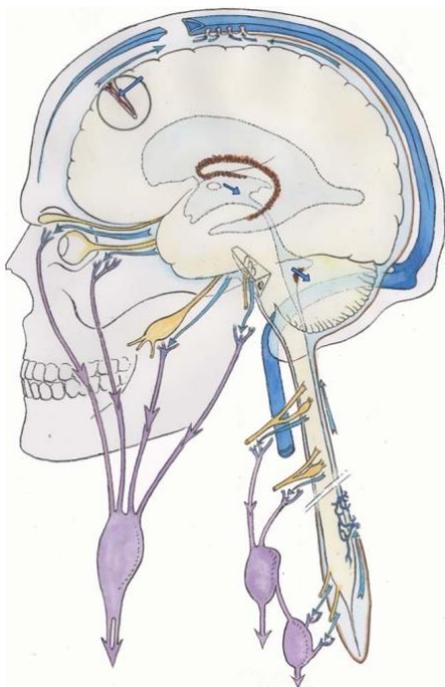
El LCR puede ser drenado también por las vainas de los nervios craneales y espinales, el epéndimo y el líquido extracelular de acuerdo con los gradientes de presión. La absorción hacia el compartimento intersticial se realiza a través de espacios perivascuales de Virchow-Robin. Se han observado también superficies de absorción de LCR en vainas meníngeas, particularmente en los recesos meníngeos de las raíces nerviosas espinales y craneales, especialmente del nervio trigémino, nervio coclear y nervio óptico; esta absorción del LCR ocurriría cuando la capacidad de la circulación-absorción habitual ha sido rebasada (figura 7) (Sakka *et al.*, 2011).

La placa cribiforme del hueso etmoidal constituye una vía de absorción del LCR, y a través de ella se eliminan proteínas y glóbulos rojos, especialmente en gatos y conejos (Courtice y Simmonds, 1951; Hsu *et al.*, 2021; Simmonds, 1953; Zakharov *et al.*, 2003). En ovejas, la oclusión de la placa cribiforme del hueso etmoidal aumenta la presión intracraneal, y la absorción linfática del LCR se incrementa con el aumento de la presión, desde el 10% original hasta un 80% (Mollanji *et al.*, 2002). Existen evidencias de que existe una absorción linfática nasal significativa de LCR en primates no humanos (Johnston *et al.*, 2005; Proulx, 2021). Se han redescubierto vasos linfáticos meníngeos, así como una red de células linfáticas endoteliales en el cerebro de peces cebras y ratones, pero se desconoce los mecanismos

exactos de contribución al drenaje de líquidos (Alcolado *et al.*, 1988; Suárez y Schulte-Merker, 2021).

Estos sitios de absorción son vías ocasionales cuando se sobrepasan las capacidades de las vellosidades aracnoideas craneales. Son activos principalmente en neonatos, ya que las vellosidades aracnoideas inmaduras se vuelven completamente activas después de los 18 meses edad; también se activan en ancianos debido a variaciones fibrosas de las granulaciones aracnoideas (Sakka *et al.*, 2011; Zakharov *et al.*, 2003).

Figura 7. Esquema de circulación del líquido cefalorraquídeo en humanos.



Nota. El líquido cefalorraquídeo es secretado principalmente por el plexo coroideo y en menor cantidad por el compartimento intersticial. Circula rostro caudalmente dentro de los ventrículos y drena hacia la cisterna magna. El LCR circula en espacios subaracnoideos craneales y espinales. En el espacio subaracnoideo craneal, el LCR fluye hacia las vellosidades aracnoideas en la pared de los senos venosos de los que se absorbe. Parte del

LCR es absorbido por la mucosa olfatoria y las vainas de los nervios craneales (óptico, trigémino, facial y vestíbulo coclear) y es drenada por el sistema linfático. En el ESAE, la parte del LCR es absorbido por el plexo venoso epidural y las vainas del nervio espinal, ingresando al sistema linfático, mientras que el LCR restante circula rostralmente hacia el espacio subaracnoideo craneal. El LCR se comunica con el líquido intersticial a través de espacios perivasculares de Virchow-Robin (Sakka *et al.*, 2011).

2.6. Fisiopatología de la lesión medular

La fisiopatología de la LTME es causada por dos mecanismos interrelacionados y que ocurren secuencialmente, primarios y secundarios. Los primarios se desencadenan inmediatamente, causados por un trauma mecánico (lesión primaria), son prácticamente inevitables e implica ruptura de vasos sanguíneos, hemorragias del parénquima medular y daño tisular, entre otros, que son generados por fuerzas mecánicas de aceleración y desaceleración (Anjum *et al.*, 2020; Yao *et al.*, 2021).

Los mecanismos de lesión secundaria se desarrollan posteriormente a los primarios, constituyen una cascada de aproximadamente 26 posibles eventos celulares y moleculares que exacerban el daño inicial (lesión secundaria), y pueden permitir una ventana terapéutica dependiendo de la severidad de la lesión (Hachem y Fehlings, 2021; Hodgetts *et al.*, 2009).

La comprensión y análisis de la fisiopatología de la lesión secundaria, podrían permitir instaurar alguna terapia para prevenir daños en ciertos casos de poca severidad (Fehlings y Nguyen, 2010; Oyinbo, 2011; Sharma, 2005). Los principales mecanismos de lesión secundaria son: apoptosis, inicio de la cicatriz glial, aumento exagerado de calcio intracelular, cavitación central, cromatólisis central, compresión e inestabilidad de la columna vertebral, bloqueo de conducción y choque espinal debido a la salida rápida de potasio al líquido

extracelular, expresión deficiente de los genes asociados a la mielina después de la lesión, desmielinización de los axones residuales y del borde subpial de los axones sobrevivientes, alteraciones en la homeostasis iónica, fallo energético y disminución de la producción de adenosin trifosfato (ATP), secreción excesiva de noradrenalina, edema en el sitio de la lesión, excitotoxicidad glutamatérgica, hemorragia, invasión de células inmunitarias y liberación de citocinas, inflamación por isquemia y reperfusión inducido por daño endotelial, peroxidación lipídica y estrés oxidativo, factores inhibidores del crecimiento de neuritas, choque neurogénico, exceso de óxido nítrico, oligodendrocitos secundarios a muertes apoptóticas, aumento de permeabilidad de la membrana plasmática, hipotensión sistémica por pérdida simpática, producción de TNF- α en el sitio del trauma medular, formación de cicatrices y falta de mecanismos de reparación en el SNC, entre otros (Baroncini *et al.*, 2021; Carlson y Gorden, 2002; Oyinbo, 2011)

2.6.1. Trastornos circulatorios

La lesión vascular constituye un evento crucial en los mecanismos de lesión primaria y secundaria, y causa daños importantes a la ME que ha tenido algún traumatismo agudo. Los mecanismos vasculares más importantes son: isquemia-reperfusión, alteración de la autorregulación, hipotensión sistémica (choque neurogénico), hemorragia y trastornos microcirculatorios (Tator y Koyanagi, 1997).

En la LTME se observan hemorragias graves principalmente en la materia gris, que pueden progresar hasta llegar a necrosis hemorrágica y posterior mielomalacia central en el sitio de la lesión (Sekhon y Fehlings, 2001). En estudios clínicos en humanos y en estudios experimentales en animales se ha observado que las arterias grandes permanecen funcionales, sin embargo, existe una reducción importante en el flujo sanguíneo de capilares y vénulas en

el sitio de la lesión, esta isquemia aumenta progresivamente durante las primeras horas (Fehlings *et al.*, 1989; Yao *et al.*, 2021). Se ha comprobado que la isquemia y la reperfusión provocan daño endotelial en los vasos del segmento espinal dañado, y este fenómeno contribuye a acelerar la cascada que ya está en actividad. Durante la isquemia se producen radicales libres derivados de oxígeno, que favorecen el estrés oxidativo, aumentando considerablemente en el inicio de la reperfusión, y constituyen un fenómeno patológico que contribuye a la lesión secundaria en la LTME (Sekhon y Fehlings, 2001).

2.6.2. Edema

Se forma entre los dos a cinco minutos post lesión, pudiendo estar presente hasta 15 días (Nolan, 1969). La formación de edema es más evidente en la materia gris; esto se corroboró al usar una columna de gradiente de gravedad específica, donde se observó un aumento de aproximadamente el 127 % en el edema y la inflamación del volumen cerca del sitio de impacto en la materia gris en comparación con solo un aumento del 24 % en la materia blanca después de una hora de haberse producido una lesión medular (Sharma, 2005; Sharma y Olsson, 1990). Sin embargo aparentemente en la sustancia blanca, es donde la acumulación de líquido ocurre primero; de acuerdo a lo observado mediante RM, la presencia de microhemorragias locales y la necrosis tisular en el sitio de la lesión, contribuyen al aumento del contenido de agua en los tejidos (Tang y Yang, 2016). Un mayor contenido de agua en el tejido del segmento contiguo no traumatizado, consiguientemente, representa el origen verdadero del edema (Reulen, 1976).

El edema vasogénico es la secuela de una mayor filtración de los capilares que encierran el área lesionada en la ME debido a variaciones en la expresión de los canales de agua constituidos principalmente por las acuaporinas. Aquaporin 4 (AQP4), es una proteína más

abundante de los canales de agua en el SNC, que se expresa principalmente en los astrocitos en el borde con la red capilar, la glia limitante y en el epéndima del canal principal y participa en la formación y eliminación del edema (Hsu *et al.*, 2015; Masterman y Ahmed, 2021; Tang y Yang, 2016).

2.6.3. Inflamación

La inflamación es un evento clave de las respuestas de defensa del organismo a las agresiones y trauma medular; es fundamental para la eliminación de restos celulares después de la LTME. La expresión de mediadores inflamatorios que incluyen el sistema de complemento, moléculas de adhesión, enzimas de ciclooxigenasa y citosinas como interleucina-1 (IL-1) aumentan en accidentes craneoencefálicos y de la ME. En los campos experimental y clínico, se sugiere que varios de estos factores contribuyen directamente a la lesión neuronal. La inflamación puede tener acciones beneficiosas y perjudiciales en el SNC, particularmente en la reparación y recuperación. (Allan y Rothwell, 2003).

Los leucocitos y células de microglia reclutados en la zona de lesión durante la inflamación, pueden exacerbar el daño inicial al secretar especies reactivas de oxígeno, metaloproteinasas de matriz y citocinas proinflamatorias. La inmunoglobulina G (IgG) ha sido utilizada clínicamente para atenuar las actividades de los leucocitos y la microglia. (Fehlings y Nguyen, 2010).

2.7. Lesión medular experimental

Los modelos de rata son los más utilizados para estudiar LTME debido a que son relativamente económicos, de sencilla manipulación, fácil cuidado, se pueden estudiar varios individuos al mismo tiempo, tienen una anatomía bien conocida y pocas infecciones quirúrgicas (Nakae *et al.*, 2011).

Existen varios modelos experimentales de lesión medular en ratas (contusión o hemicontusión, transección o hemisección, compresión e isquemia con clippers, desplazamiento de la ME, estenosis del canal lumbar, lesiones con microelectrodos de tungsteno del tracto espinotalámico, etc.) (Aldskogius y Kozlova, 2021; Nakae *et al.*, 2011). La contusión espinal es el modelo de lesión medular más utilizado y antiguo. Provoca una disfunción sensorial y/o motora en grados variables, que incluye dolor neuropático, alodinia táctil e hiperalgesia térmica. El modelo de contusión de la ME torácica es el modelo de investigación más común, por poseer mucha similitud con la mayoría de las lesiones en humanos. El método para realizar este tipo de lesiones pertenece a la Universidad de Nueva York, que se realiza con un impactador que posee un balón de 10 g, el cual se deja caer desde una altura variable sobre la ME y meninges íntegras expuestas después de haber realizado una laminectomía total (All y Al-Nashash, 2021; Nakae *et al.*, 2011).

2.8. Métodos de imagen

La tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) actualmente se usan de manera rutinaria en la investigación de diagnóstico de enfermedades de la columna vertebral y ME (da Costa y Samii, 2010; Harrison, 1999).

Durante la última década, el número de publicaciones que utilizan imágenes de TC en estudios preclínicos *in vivo* ha aumentado exponencialmente. Una mayor resolución espacial y temporal son los avances técnicos claves que han permitido a los investigadores capturar imágenes anatómicas cada vez más detalladas de pequeños animales y monitorear la progresión de la enfermedad en biomodelos (Schambach *et al.*, 2010).

La TC es una modalidad valiosa para la obtención de imágenes *in vivo*, es rápida, de alta resolución, tridimensional, económica y no invasiva. Se emplea en la clínica para establecer

un diagnóstico y una planificación del tratamiento médico o quirúrgico. También es muy útil en la investigación preclínica como micro-TC. Aunque la TC es inherentemente efectiva para la imagenología de pulmón y hueso, la imagen de tejido blando requiere el uso de agentes de contraste (Ashton *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014).

Entre las desventajas de la micro-TC con respecto a la RM en ratas, se encuentra la existencia de imágenes de bajo contraste entre tejidos blandos y tejidos duros circundantes; otra desventaja podría ser el uso de radiaciones continuas y muchas veces altas. Una de las ventajas de la TC en la investigación clínica y preclínica, constituye su versatilidad para fusionarse con otros métodos de medicina nuclear como por ejemplo como SPECT (tomografía computarizada de emisión monofotónica) y PET (Tomografía por emisión de positrones) de interés experimental (Bag *et al.*, 2010).

2.8.1. Mielografía

La mielografía se implementó como una técnica de imagen para evaluar la integridad del saco tecal, la ME y las raíces nerviosas en diversas condiciones patológicas. Antes del desarrollo de la mielografía, el único medio definitivo para evaluar estas estructuras era la laminectomía y la inspección visual directa. Por lo tanto, la mielografía y el uso de nuevos medios de contrastes positivos, representó un gran avance médico y lleva ya un siglo de aplicación clínica. La naturaleza invasiva de la mielografía conlleva el riesgo de sangrado, infección, fuga de LCR y dolor de cabeza, así como una posible reacción adversa al agente de contraste o anestésico local (Price y Ortiz, 2017).

2.8.2. Compuestos yodados

Debido a la falta de contraste inherente para las imágenes de tejidos blandos, la mayoría de las tomografías computarizadas utilizan agentes de contraste de alto peso atómico, y dentro de estos agentes, el yodo es el elemento más utilizado. Los agentes de contraste de yodo están hechos de compuestos yodados aromáticos solubles en agua y estos compuestos proporcionan un contraste efectivo debido a su alto número atómico, que produce un fuerte efecto fotoeléctrico. Los agentes de contraste de TC clínico son generalmente seguros, pero a veces producen reacciones adversas graves, como reacciones alérgicas y nefropatía inducida por contraste, que afortunadamente en la actualidad son cada vez menos frecuentes debido a la utilización de medios de contraste de baja toxicidad, alta eficacia y bajo costo (Ashton *et al.*, 2015).

Muchos de los primeros agentes de contraste tenían toxicidades significativas. Se intentó la mielografía de gases, pero el contraste entre el gas y los tejidos blandos es deficiente. Pantopaque, un medio yodado a base de aceite se usó con éxito durante décadas, pero no fue compatible con la exploración por TC porque era viscoso, insoluble y causaba un artefacto rayado. El desarrollo de agentes solubles en agua permitió una distribución uniforme en el espacio subaracnoideo y una excelente representación de la anatomía espinal en la TC posmielográfica (Price y Ortiz, 2017).

El primer medio de contraste no iónico disponible comercialmente fue la metrizamida, y se introdujo en la década de 1970. Posteriormente, una gama de compuestos no iónicos triyodados solubles y estables han entrado en el mercado: iopamidol, iohexol, iopromuro, ioversol y iopentol, y uno de los más utilizados actualmente es el Iomeprol 400. Iomeprol está disponible en concentraciones de hasta 400 mg de yodo por ml (mg/ml), que es más alto

que las concentraciones de otros medios de contraste no iónicos triyodados disponibles actualmente. Iomeprol 400 mg tiene una densidad relativa de 1.445, osmolalidad de 0.73 Osmol/Kg de agua a 37 °C, la combinación de la osmolalidad más baja. La viscosidad más baja, la alta solubilidad y la ausencia de EDTA colocan este medio de contraste en una posición única y garantiza efectos secundarios mínimos (Gallotti *et al.*, 1994).

Después de la administración intratecal, el iomeprol se elimina por completo del LCR, se elimina rápidamente del plasma y se excreta sin cambios a través de los riñones. Cuando se administró por vía intratecal, iomeprol no alteró significativamente las funciones conductuales ni las actividades fisiológicas del cerebro (La Noce *et al.*, 1994).

2.8.3. Nanopartículas

La farmacocinética y la versatilidad de los sistemas nanométricos constituyen particularmente ventajas para abordar las necesidades versátiles de investigación biomédica (Chakraborty *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2014). Las nanopartículas se han usado con muchas finalidades clínicas y preclínicas, entre ellas, la unión con fármacos que vayan desde la sangre hasta el SNC, es decir que tengan la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Gao *et al.*, 2021). Para micro-TC de animales pequeños, se usan agentes de contraste de nanopartículas para evitar un aclaramiento renal rápido. Se han utilizado una amplia variedad de nanopartículas para la obtención de imágenes de micro-TC, y la mayoría de las investigaciones se han centrado en el uso de nanopartículas que contienen yodo y NPO (Akai *et al.*, 2021; Ashton *et al.*, 2015).

La utilización de un agente de contraste opaco de rayos X biocompatible como lo son las nanopartículas, pueden mostrar la delineación de los vasos sanguíneos y los órganos internos,

e incluso la detección de metástasis tumorales tan pequeñas como de 300 μm . Estos agentes de contraste para micro-TC deben ser sistemas de nanopartículas sigilosos, es decir, prevenir su eliminación renal rápida. La composición química, las propiedades fisicoquímicas, la farmacocinética, la bioconjugación y la versatilidad de los sistemas nanométricos proporcionan muchas ventajas para abordar las necesidades versátiles de investigación biomédica (Li *et al.*, 2014).

2.9. Protocolos de sustracción digital

Existen varios protocolos de sustracción digital, y en nuestros experimentos se utilizaron dos protocolos de sustracción con medios de contraste positivo. El primer protocolo fue sustracción de energía doble (ED), que aprovecha las diferencias en el grado en que los tejidos y los agentes de contraste atenúan las radiografías de baja y alta energía (Castillo *et al.*, 2016; Kuhlman *et al.*, 2006; Lewin *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008). El otro protocolo, fue llamado sustracción de energía única (EU), y se basó en la sustracción de una imagen sin medio de contraste de una imagen con medio de contraste, ambas adquiridas al mismo kilovoltaje; es decir, con el mismo espectro de energía de rayos X (Berumen *et al.*, 2016; Cruz-Bastida *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Caracterizar el espacio subaracnoideo espinal mediante mielografía obtenida con micro-TC *in vivo*, en ratas íntegras y con lesión medular, utilizando medios de contraste positivos (compuestos yodados y nanopartículas de oro).

3.2. Objetivos específicos

- Diseñar y probar una técnica para obtener mielogramas de alta resolución, comparando dos medios yodados y nanopartículas de oro y energía doble versus energía única, en ratas íntegras.
- Caracterizar los cambios espaciales y temporales del espacio subaracnoideo espinal y la médula espinal, utilizando los parámetros que dieron mejor resultado en el diseño de la técnica de imagen en micro-TC (medio yodado y resta digital de energía única) en ratas con lesión traumática de médula espinal en 2D y 3D.

4. HIPÓTESIS

El uso optimizado de micro-TC permitirá obtener mielografías de alta resolución en ratas, proporcionando una herramienta útil para identificar el espacio subaracnoideo espinal y caracterizar los cambios que ocurren en este espacio después de una lesión traumática de médula espinal.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño experimental

El trabajo incluido en esta tesis consta de dos estudios consecutivos: 1) Desarrollo de técnica mielográfica con prueba en ratas íntegras; 2) caracterización de cambios en el ESAE de ratas con lesión medular, usando los parámetros que dieron mejor resultado en el primer estudio.

Para la obtención de la técnica mielográfica se utilizaron 16 ratas Long-Evans macho sin lesión medular, de 10 a 12 semanas de edad. El experimento total consistió en la adquisición, reconstrucción y posprocesamiento de mielogramas mediante dos protocolos de resta de imágenes digitales: ED y EU. En ambos protocolos, se utilizaron tres agentes de contraste positivo de rayos X comerciales: Iomeron® 400 (Iomeron, Bracco UK Limited) y Fenestra® VC (Fenestra, MediLumine Inc.), que son compuestos yodados y AuroVist™ 15nm (AuroVist, Nanoprobe), que tiene como componente principal NPO. Se asignaron al azar tres animales a cada grupo experimental, con excepción del grupo ED/Aurovist (1) debido a que no se obtuvo imágenes (cuadro 1).

Cuadro 1. Grupos experimentales

Medios de contraste	Protocolos de resta digital	
	Energía única	Energía doble
Fenestra	3	3
Iomeron	3	3
AuroVist	3	1

Nota. Número de ratas por cada grupo experimental.

En el segundo experimento realizado para estudiar las modificaciones del ESAE en ratas lesionadas, se utilizaron 33 hembras Long-Evans de 10 a 12 semanas de edad, y con peso corporal de 250 ± 10 g. Los animales fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los siguientes grupos experimentales: Grupo 1 control (lesión simulada, n = 6); grupo 2 LTME aguda leve (1 día después de la lesión, 12,5 mm de altura de barra, n = 5); grupo 3 LTME subaguda leve (15 días después de la lesión, 12,5 mm de altura de barra, n = 8); grupo 4 LTME aguda severa (1 día después de la lesión, 12,5 mm de altura de barra, n = 6) y grupo 5 LTME subaguda severa (15 días después de la lesión, 50 mm de altura de barra, n = 8). Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal del Instituto Mexicano del Seguro Social (expediente número R-2014-785-099). Se siguieron todas las normas internacionales, nacionales y/o institucionales aplicables para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Se realizaron todos los procedimientos necesarios para minimizar el sufrimiento y el número de animales utilizados.

5.2. Preparación de animales

5.2.1. Anestesia

Se utilizó una mezcla de ketamina (80 mg^{-1}) y xilazina (8 mg^{-1}) por vía intramuscular para realizar la laminectomía y canulación intratecal, en los experimentos de ambos estudios; y lesión medular para el segundo experimento. Se utilizaron pruebas del reflejo corneal y de retiro de la pata trasera ante un estímulo doloroso para verificar que la anestesia fuera adecuada.

5.2.2. Lesión y cuidados

Para producir la LTME se realizó una laminectomía de manera aséptica en T9 utilizando un microscopio quirúrgico. La LTME consistió en una contusión usando el dispositivo de caída

de peso (Universidad de Nueva York, NYU) dejando caer una barra de 10 g sobre la duramadre expuesta desde una altura de 12.5 mm o 50 mm (para lesiones de intensidad leve y severa, respectivamente) (Austin *et al.*, 2012) . Los animales del grupo control solo fueron sometidos a cirugía simulada. La atención posquirúrgica consistió en alojamiento en jaulas individuales bajo temperatura y humedad controladas, alimentación con dieta comercial estándar, administración de agua a voluntad, manejo de vejiga neurogénica por expresión manual dos veces al día, inyección de tramadol IM (5 mg kg^{-1} transquirúrgico), y posteriormente acetaminofén oral (30 mg kg^{-1} cada 12 h, durante 1 semana) para prevenir el dolor y la automutilación; como profiláctico para las infecciones, se administró una dosis oral de 10 mg kg^{-1} de enrofloxacin cada 24 horas durante 7 días.

5.2.3. Canulación

Se realizó una laminectomía en L1, luego se perforó dorsalmente el saco dural con una aguja 27G. La penetración en el ESAE se confirmó mediante la visualización de fuga de LCR. Luego se introdujo la punta de un segmento de 5 mm de una cánula de longitud de 10 cm de polietileno PE10 (IntramedicTM) a través de la abertura en el saco dural y se dirigió rostralmente; el tubo se llenó previamente con solución salina para evitar que el aire ingresara en el ESAE. Finalmente, se aplicó cianoacrilato con la finalidad de sellar el punto de inserción del tubo y evitar fugas de LCR.

5.2.4. Administración de agentes de contraste

Para la adquisición de imágenes, cada uno de los animales lesionados y no lesionados se colocaron en decúbito lateral izquierdo y se anestesiaron por inhalación de 2% de isoflurano en 80% de oxígeno. El extremo libre de la cánula se conectó a una jeringa de 1 cc y se inyectaron lentamente $120 \mu\text{L}$ de medio de contraste sin diluir (en dos minutos). En el primer

experimento de obtención de la técnica mielográfica se utilizaron los medios de contraste Iomeron, Fenestra y Aurovist, mientras que en el estudio de ratas lesionadas se utilizó solamente Iomeron. La eutanasia se realizó utilizando una sobredosis de pentobarbital por vía intraperitoneal inmediatamente después de haber adquirido las imágenes; este procedimiento también se realizó con aquellas ratas lesionadas antes de la toma de imágenes cuando existieron complicaciones potencialmente mortales como neumonía, urosepsis grave y autofagia extensa (con evisceración abdominal o exposición muscular y hueso en las extremidades posteriores), que afectaban irreversiblemente la calidad de vida y podrían interferir con la adquisición de buenas imágenes.

5.3. Adquisición y reconstrucción de imágenes

Las imágenes se adquirieron en un sistema de imágenes de microPET/SPECT/CT de animales de laboratorio de Albira (Bruker). Las características de los componentes de la unidad micro-TC son las siguientes: un tubo de rayos X de micro-enfoque (Apogee 5500, Oxford Instruments), con ajustes de voltaje de 30-45kV y corrientes entre 0.2-0.9 mA, y un detector de panel plano (Hamamatsu C7942CA-22) con 2400x2400 pixeles de tamaño de 50 μm , dispuestos en una geometría de haz cónico.

En el protocolo de resta digital con ED utilizado en el primer experimento, se adquirieron dos series de imágenes simultáneas después de la administración del medio de contraste, una serie a baja energía (EB, 30 kV) y la otra a alta energía (EA, 45 kV), con una corriente de 0,8 mA y 600 proyecciones en 360 °. Para la adquisición de EA, se utilizó un filtro de molibdeno de 25 μm de espesor (5,8 g, 99,9% de pureza; Aldrich) en la ventana de salida del tubo de rayos X con el propósito de aumentar la energía efectiva del haz.

En el protocolo EU utilizado en ambos experimentos, se adquirieron dos series de imágenes consecutivas, una antes y otra inmediatamente después de la inyección del medio de contraste, con una energía de 45 kV y 0.7 mA, y 600 proyecciones en 360°. Se procuró no mover absolutamente la rata en su camilla, en el momento de la administración del contraste y entre ambas adquisiciones, con el objeto de garantizar que la resta digital no distorsione la imagen anatómica.

La imagen fue reconstruida utilizando una implementación interna del algoritmo interactivo SIRT 3D fundamentado en la caja de herramientas ASTRA de código abierto (van Aarle *et al.*, 2016; van Aarle *et al.*, 2015), este procedimiento fue ejecutado en una CPU Intel Xeon E3 y una GPU NVIDIA Quadro M2000. Los parámetros de haz cónico de la calibración geométrica del sistema micro-TC se utilizaron para definir la geometría de reconstrucción (Noo *et al.*, 2000). Las imágenes se reconstruyeron en una matriz de $780 \times 780 \times 650$ de vóxel con un tamaño de 100 μm , y el tiempo de reconstrucción promedio fue de 5 horas para 250 interacciones.

5.3.1. Posprocesamiento de imágenes

Las imágenes fueron reconstruidas posteriormente utilizando un software interno que se ejecuta en GNU/Linux. El orden de este procedimiento consistió en los siguientes pasos:

1. Selección de la región de interés (ROI). Los marcadores se colocaron manualmente en la imagen a intervalos cortos a lo largo del canal espinal, luego se unieron con líneas rectas y se cubrieron con esferas de radio de 4 mm. El ROI obtenido de esta manera sigue la columna vertebral suavemente y cubre el ESAE. Este procedimiento se realizó solo para la imagen de referencia, utilizando el software de código abierto `xgrid3d` (<https://github.com/seirios/xgrid3d>).

2. Inscripción. El registro de imágenes se realizó con el software de código abierto NiftyReg (<https://sourceforge.net/projects/niftyreg>) que implementa el algoritmo de Aladin para el registro rígido/afín (Ourselin *et al.*, 2000). La imagen de referencia se eligió la que lleva más información sobre los medios de contraste (EA en el protocolo ED, y después de la inyección de contraste en el protocolo EU) para evitar la pérdida de información. La imagen flotante (EB en el protocolo ED, antes de la inyección de contraste en el protocolo EU) se registró de forma afín utilizando el ROI como máscara (ya que solo se necesita que haya coincidencia dentro del área) y se interpoló en la imagen de referencia.

3. Resta ponderada. Para el protocolo ED, se necesitó un factor de peso (λ) para la eliminación adecuada del hueso después de la sustracción. Para determinar λ , se calculó el valor promedio de vóxel (μ) dentro del ROI para la imagen de referencia y la imagen flotante, y se formó el cociente $\lambda = \mu_{EA}/\mu_{EB}$. Para el protocolo EU, $\lambda = 1$ ya que ambas imágenes se adquieren con la misma configuración.

La sustracción de imágenes se realizó como:

Resultado de la resta = Imagen de referencia - λ * Imagen flotante, con valores negativos establecidos en 0.

4. Alineación. Para la obtención de imágenes longitudinales del ESAE adecuadas, se alinearon automáticamente ajustando a un plano a los marcadores definidos en el paso 1, calculando la rotación que hace de este plano el plano longitudinal de la imagen y aplicando la transformación con interpolación lineal.

5.3.2. Evaluación de la imagen y análisis estadístico para el primer experimento (obtención de técnica mielográfica).

La evaluación cualitativa se basó en la facilidad para visualizar el ESAE contrastado, en términos de definición espacial subjetiva (desenfoque/nitidez) y perfil de intensidad (fuerza/debilidad de contraste).

El rendimiento cuantitativo de los grupos experimentales se evaluó mediante la relación contraste-ruido, definida como

$$\text{CNR} = |\mu_{\text{FG}} - \mu_{\text{BG}}| / \sigma_{\text{BG}}$$

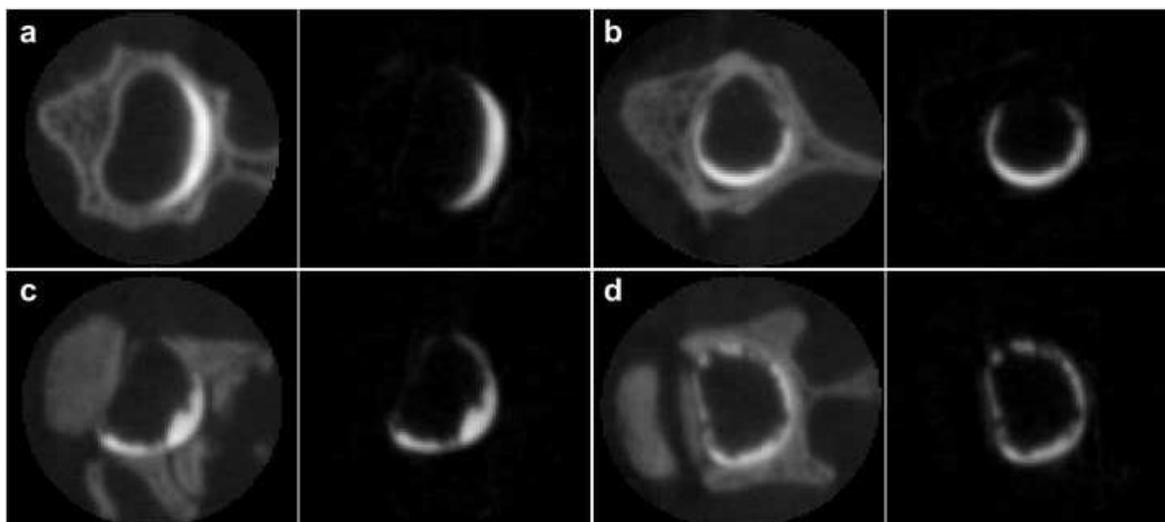
donde μ constituye el valor promedio y σ la desviación estándar en cada región. Para cada estudio, se seleccionó un corte transversal del resultado de la resta en función de los criterios cualitativos y se calculó el CNR. En cada sección, la región de primer plano (FG) se tomó como un anillo 2D seleccionado a mano que cubre el medio de contraste y la región de fondo (BG) como la disyunción exclusiva de FG y la máscara definida por el ROI. De esta manera, FG cubre los ESAE contrastados y BG los tejidos circundantes, todo dentro del ROI (Mahesh, 2013). También se obtuvieron imágenes en 3D utilizando las imágenes resultantes de la resta digital utilizando el software ParaView (Ahrens *et al.*, 2005)

Los datos cuantitativos se analizaron con ANOVA de una vía y luego la prueba de Tukey. El análisis se realizó utilizando R v3.5.1 y las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

5.3.3. Evaluación de la imagen y análisis estadístico para el segundo experimento (estudio del espacio subaracnoideo espinal en ratas lesionadas)

Para la evaluación cualitativa, la observación de imágenes 2D y 3D en cada segmento vertebral permitió la determinación de la distribución espacial del medio de contraste en el ESAE. Las imágenes longitudinales sirvieron para definir la extensión caudo-craneal del medio de contraste. Para establecer la distribución transversal, las imágenes de cada segmento vertebral se dividieron en cuatro áreas: dorsal, lateral izquierda, lateral derecha y ventral (figura 8), y se obtuvo un diagrama para cada animal y cada grupo (figuras 18, 19, 20, 21, y 22). Esta información se usó para inferir las vías preferenciales para el flujo del medio de contraste en cada grupo.

Figura 8. Imágenes transversales representativas del espacio subaracnoideo espinal.



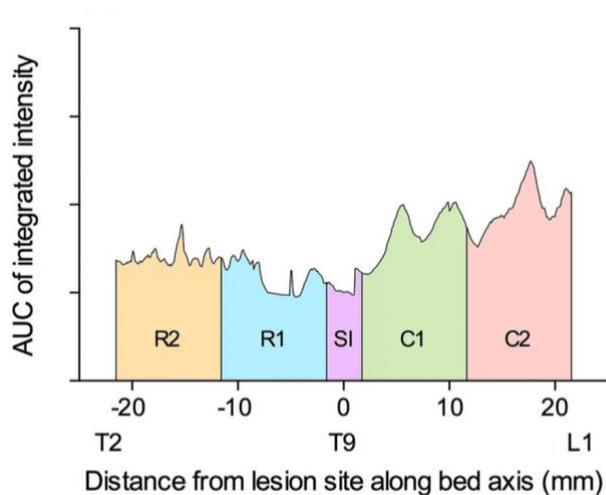
Nota. Se observa la distribución circunferencial del medio de contraste a) medio de contraste en el área dorsal; b) medio de contraste en las regiones dorsal, ventral y lateral izquierda; c) medio de contraste en regiones dorsales y bilaterales; d) medio de contraste en todas las regiones, formando un anillo completo. Para cada panel, la izquierda muestra la mielografía

y el esqueleto, mientras que la derecha muestra solo el medio de contraste después de la resta digital.

Según la extensión caudo-craneal del medio de contraste, la permeabilidad del ESAE se clasificó cualitativamente como: bloqueada, cuando la columna del medio de contraste se detuvo en el sitio de la lesión o antes (T8-T9); o permeable, cuando el contraste se extendió por delante de T8 en dirección cefálica.

Para evaluar cualitativamente la permeabilidad del ESAE se analizaron los valores de intensidad en escala de grises de diferentes segmentos de la ME de todas las ratas (es decir los valores de píxeles), y esta escala o valores se relacionan con el grado de atenuación de los rayos X por los tejidos y la cantidad del medio de contraste presente en un segmento medular. El valor de intensidad integrada de la imagen, definido como la suma de todos los valores de píxeles en un corte de la imagen sustraída, mayor que un valor de corte empírico de 0.015 (para evitar la inclusión de posibles artefactos generados por el procedimiento de resta), se utilizó para obtener una función que permite la cuantificación del medio de contraste a lo largo del ESAE de cada animal y comparaciones entre grupos. Las mediciones del valor de intensidad integrado se evaluaron en 4 regiones de 10 mm de longitud cada una, dos craneales al lugar de la lesión (SI; 3 mm de longitud): R2 y R1, y dos regiones caudales al lugar de lesión: C1 y C2 (figura 9).

Figura 9. Regiones medulares de estudio cualitativo.



Nota. Se observan las medidas de las regiones estudiadas y el valor representativo de intensidad integrada para cada región.

Para el análisis cualitativo de la permeabilidad del ESAE, se realizó una tabla de contingencia basada en el paso del medio de contraste (bloqueado o permeable) utilizando la frecuencia de cada clase por grupo y se aplicó una prueba de chi-cuadrado.

Para realizar un análisis cuantitativo del medio de contraste a lo largo del ESAE se efectuó la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn, comparando el área bajo la curva de intensidad integrada (un indicador de la cantidad total de medio de contraste) para cada región. El análisis estadístico se realizó utilizando Prism v6.0h para MacOS X (GraphPad Software, Inc.). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

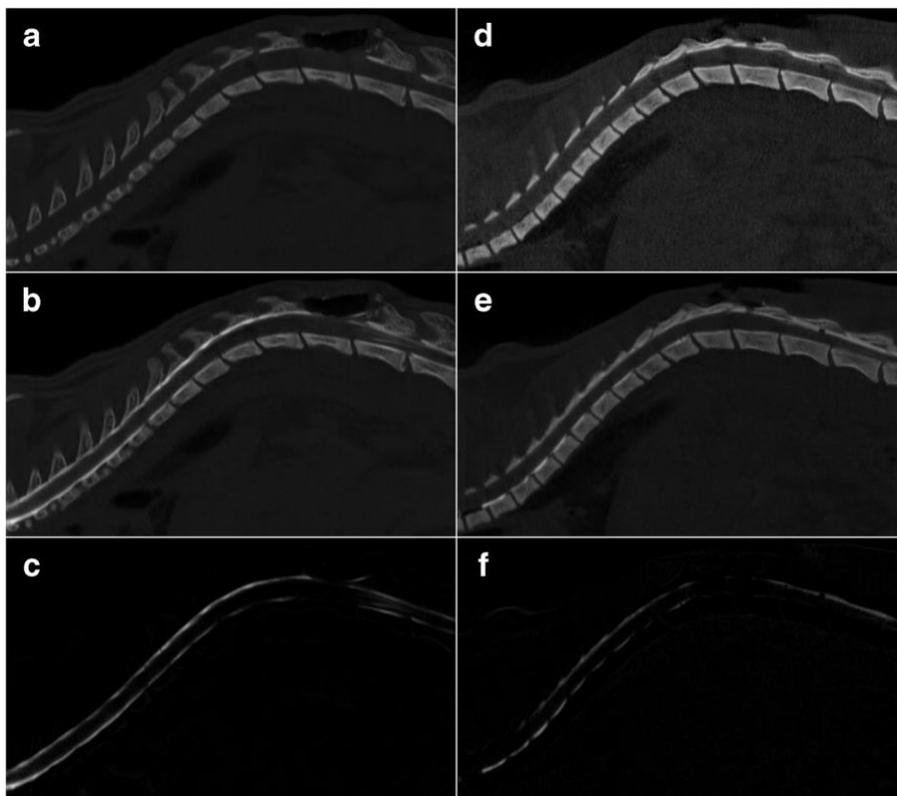
6. RESULTADOS

6.1. Desarrollo de técnica mielográfica

El primer experimento tuvo como objetivo la obtención de una técnica mielográfica en ratas *in vivo*, para la cual se probaron dos técnicas de sustracción digital (ED y EU) combinando cada una de ellas con tres medios de contraste (Iomerón, Fenestra y Aurovist) y determinar cual combinación fue la más apropiada para visualizar principalmente el ESAE (Zambrano-Rodríguez *et al.*, 2019).

Se obtuvieron diferencias visuales notables de acuerdo con el protocolo de adquisición de imágenes y el medio de contraste empleado, tanto en 2D como en 3D. Se observó la eficacia de ambos métodos de sustracción digital para visualizar el ESAE; sin embargo, el método de EU tuvo ventajas con respecto al método de ED, tanto en los cortes longitudinales, como en cortes transversales. En las imágenes longitudinales previas sin resta digital se observan las vértebras con una muy buena definición (figura 10a, b, d, e); sin embargo, se puede ver una superposición de hueso y medio de contraste (figura 10b, d, e). Después de la sustracción digital, las imágenes del hueso y el tejido blando se eliminan por completo y solamente se observa la imagen del ESAE (figura 10c, f).

Figura 10. Imágenes de cortes longitudinales de mielograma en micro-TC en 2D con Iomerón® 400.

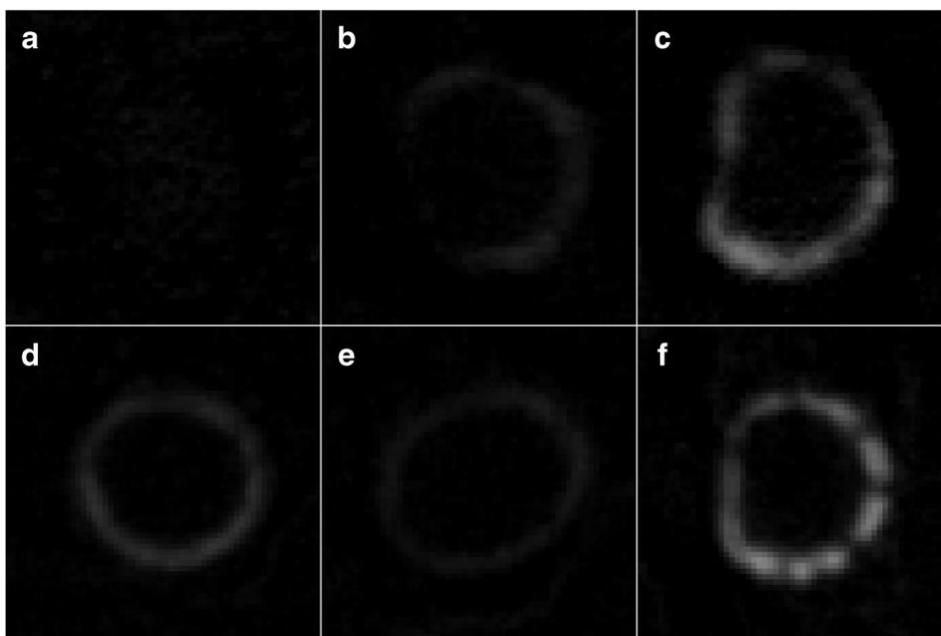


Nota. Columna izquierda: imágenes adquiridas con el protocolo EU. Adquisiciones antes de (a) y después (b) administración de contraste, y el resultado de la resta: $b - a$ (c). Columna derecha: imágenes adquiridas con el protocolo ED, con energía baja (d) y alta (e), y el resultado de la resta ponderada: $e - \lambda d$ (f). Los valores de gris se igualaron en todas las imágenes para mostrar el contraste en una escala común.

En todas las ratas de los diferentes grupos, en los cortes transversales se observó la disposición diferente del medio de contraste en el ESAE originado principalmente por el asentamiento gravitacional. De acuerdo con el análisis cualitativo las mejores imágenes se encontraron en EU/Iomerón (figura 11f), seguido de EU/AuroVist (figura 11d). Por el

contrario, el menor contraste visual se observó con fenestra tanto con EU como con ED (figura 11b, e). Es necesario indicar que en el protocolo ED/Aurovist (figura 11a), en el resultado de la sustracción digital no se visualiza nada. Los perfiles del ESAE se observaron discontinuos en la mayoría de las ratas, y esto se debe posiblemente a la presencia de vasos sanguíneos y raíces nerviosas que originaron defectos de llenado del medio de contraste.

Figura 11. Imágenes transversales del espacio subaracnoideo espinal en 2D después de haber realizado la resta digital de un segmento en la región torácica media con los dos métodos de resta digital y los tres medios de contraste.



Nota. (a) ED/AuroVist, (b) ED/Fenestra®, (c) ED/Iomeron® (d) EU/AuroVist, (e) EU/Fenestra®, (f) EU/Iomeron®. Las imágenes en la fila superior se adquirieron con el protocolo ED y las imágenes en la fila inferior con el protocolo EU. El medio de contraste empleado fue AuroVist™ 15 nm (a, d), Fenestra® VC (b, e) e Iomeron® 400 (c, f). Los valores de gris se normalizaron en todas las imágenes para mostrar el contraste en una escala común.

Se obtuvieron excelentes imágenes en 3D del ESAE, y en estas se observaron las huellas originadas por los vasos sanguíneos, las raíces nerviosas y los discos intervertebrales (figura 12).

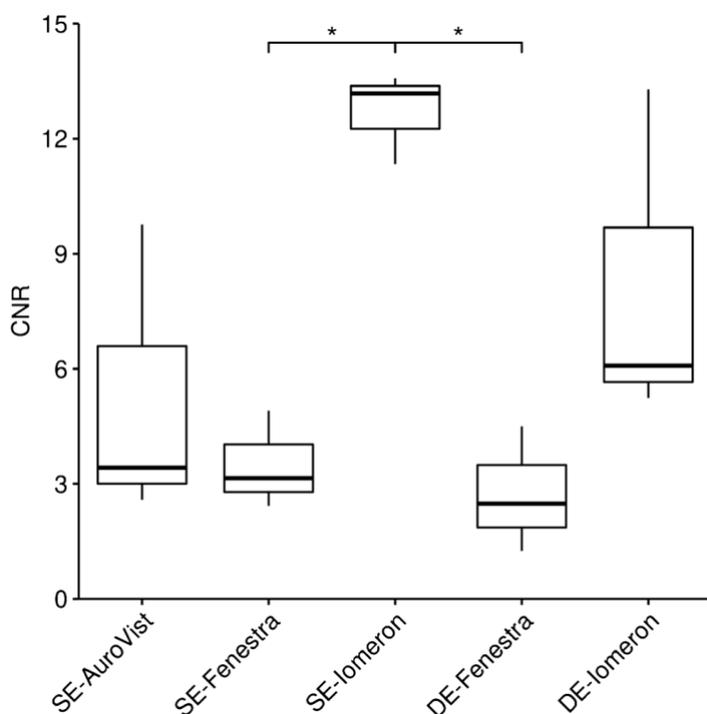
Figura 12. Representación tridimensional del espacio subaracnoideo espinal a partir del resultado de la sustracción de una adquisición con el protocolo energía única e Iomeron® 400.



Nota. Se observan las huellas de vasos sanguíneos del surco posterior (flechas negras), raíces nerviosas (flechas rojas) y discos intervertebrales (asteriscos), así como la cánula utilizada para la inyección del medio contraste (punta de flecha). Se muestran vista dorsal (a), lateral derecho (b), lateral izquierdo (c) y ventral (d). Imágenes generadas con el programa ParaView a partir de las imágenes resultantes de la resta digital.

En el análisis cuantitativo (figura 13) se observó que los mejores resultados se obtuvieron con el protocolo UE/Iomeron (valor mediano de 13.2 (12.3–13.4) (1er y 3er cuartil)), mientras que los resultados más deficientes se obtuvieron con ED/Fenestra y EU/Fenestra (valores medianos de 2.48 (1.87–3.49) y 3.15 (2.78–4.03), respectivamente). Los grupos ED/Iomeron y EU/AuroVist mostraron un desempeño intermedio (valores medianos de 6.08 (5.66–9.68) y 3.42 (3.00–6.59), respectivamente). Se encontraron diferencias significativas entre SE/Iomeron y EU/Fenestra y ED/Fenestra ($p < 0.05$).

Figura 13. Resultados del análisis cuantitativo de la relación contraste-ruido mediante diagrama de caja y bigotes.



Nota. Las cajas se extienden desde el 1er hasta el 3er cuartil; las líneas gruesas dentro de las cajas representan la mediana; los bigotes van de los valores más pequeños a los más grandes en cada grupo y no hay valores atípicos. El análisis estadístico consistió en un ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. El nivel de significancia es (*) $p < 0.05$.

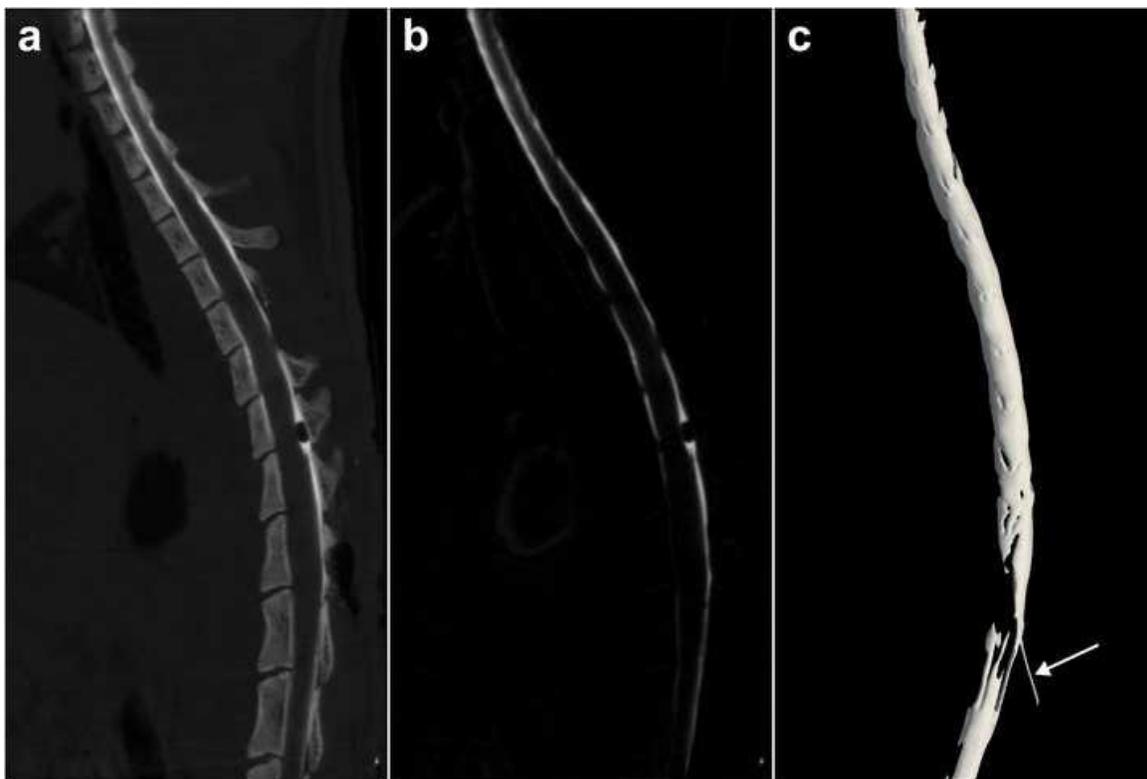
6.2. Estudio de alteraciones del espacio subaracnoideo espinal en ratas lesionadas

Después de haber obtenido una técnica mielográfica adecuada, y con el resultado de que la mejor modalidad fue la de resta digital con una energía y el medio de contraste Iomeron, se procedió luego a aplicarla en un experimento en ratas con diferentes tiempos e intensidades de LTME (Zambrano-Rodríguez *et al.*, 2021).

6.2.1. Permeabilidad del espacio subaracnoideo espinal

Uno de los parámetros más evidentes que se pudieron observar tanto en imágenes longitudinales 2D como en 3D fue el estado de la permeabilidad caudo-craneal del ESAE para contrastar y visualizar el flujo del medio de contraste. Se observó el paso de Iomeron hacia craneal en todas las ratas del grupo 1 o control, en todas las ratas del grupo 2 con LTME aguda leve, en todas las ratas del grupo 3 con LTME subaguda leve, y en algunas ratas de los grupos 4 (LTME aguda severa) y 5 (LTME subaguda severa) (figura 14).

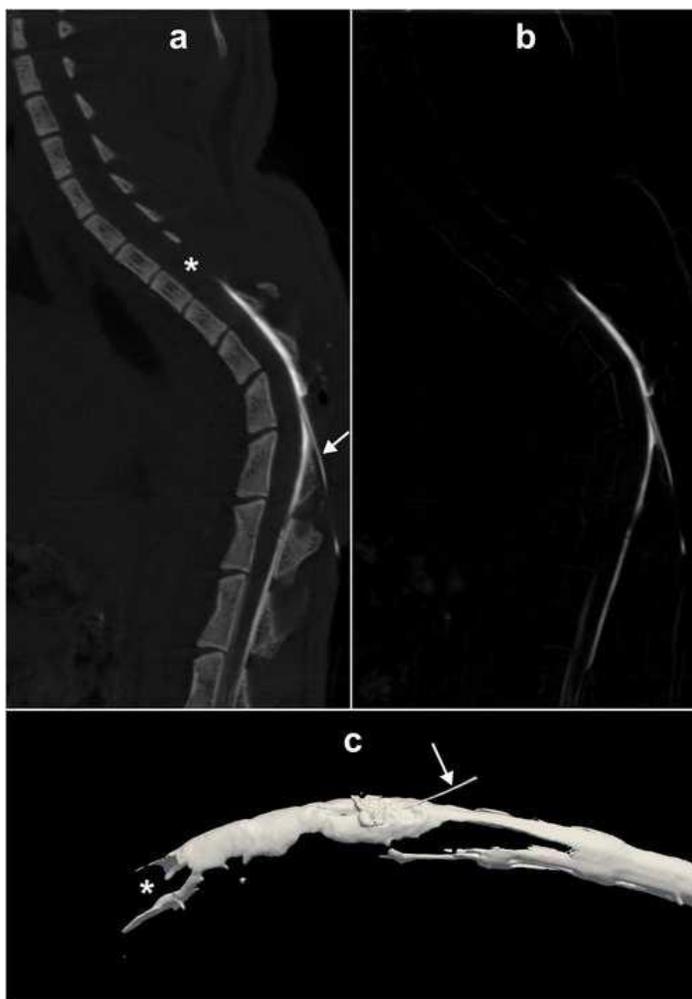
Figura 14. Imágenes longitudinales representativas del espacio subaracnoideo espinal permeable al flujo de medio de contraste de una rata con lesión subaguda severa.



Nota. a) Corte sagital 2D de una mielografía que muestra vértebras y medio de contraste; b) corte sagital 2D que muestra solo medio de contraste después de la sustracción de la imagen digital; c) reconstrucción 3D. La flecha indica la cánula intratecal.

En algunas ratas de los grupos 4 y 5 se observó la ausencia del medio de contraste por delante del sitio de lesión (figura 15).

Figura 15. Imágenes longitudinales representativas de una rata con lesión subaguda severa.

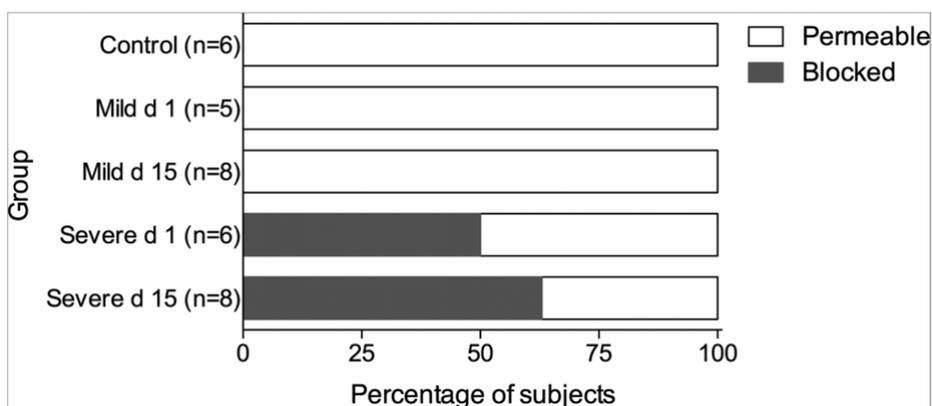


Nota. Se observa la representación del espacio subarabnoideo espinal bloqueado al flujo del medio de contraste hacia craneal, a) Corte sagital 2D de una mielografía que muestra vértebras y medio de contraste; b) corte sagital 2D, que muestra solo medio de contraste después de la sustracción de imagen digital; c) reconstrucción 3D. El asterisco (*) indica el sitio de LTME. Las flechas indican la cánula intratecal.

El análisis cualitativo del paso caudo-craneal del medio de contraste reveló que ninguno de los animales en el grupo de control y en ambos grupos de LTME leve, mostraron impedimento para el paso del medio de contraste hacia craneal del sitio de la lesión o lesión

simulada (T8-T9). En cambio, las ratas con LTME severa exhibieron oclusión de la luz del ESAE en el sitio de la lesión en las etapas aguda y subaguda (1 día y 15 días después de la lesión), para el 50% y 63% de los sujetos estudiados, respectivamente (figura 16).

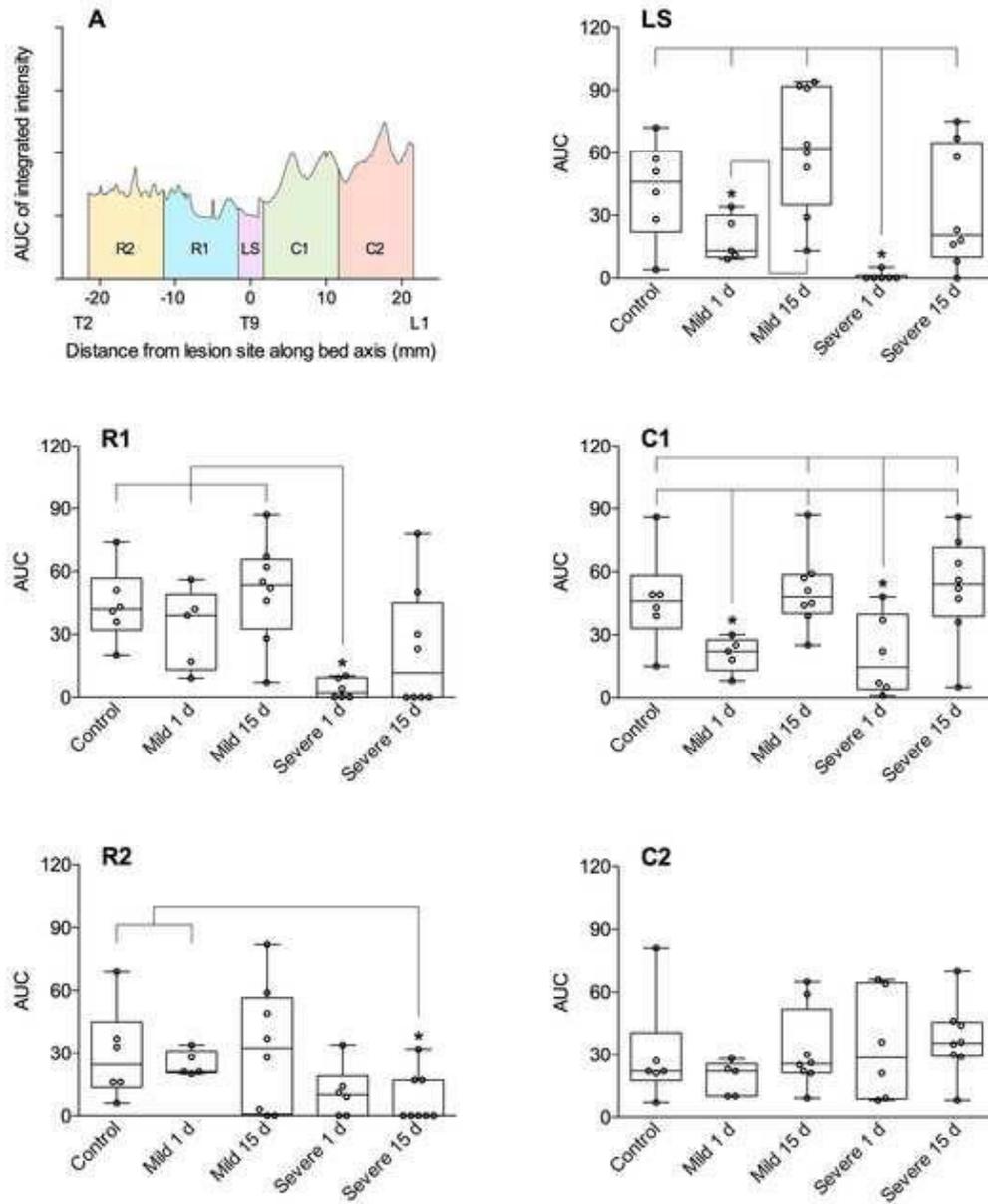
Figura 16. Efectos de la gravedad y el tiempo transcurrido después de la lesión en la permeabilidad del espacio subaracnoideo espinal.



Nota. Se muestra el número de sujetos por grupo y el porcentaje de permeabilidad (a) y bloqueo (b). Grupos de ratas: lesiones simuladas (control), 1 día y 15 días después de una LTME leve (aguda y subaguda) y 1 día y 15 días después de una LTME severa (aguda y subaguda).

El análisis cuantitativo revela que los cambios primordiales en la distribución del medio de contraste a lo largo del ESAE están presentes en la fase aguda de las lesiones severas, y que precisamente en el área de la lesión es donde este fenómeno es más evidente. En el caso de lesiones leves agudas, también aparecen algunos cambios, aunque de menor magnitud. En particular, existe una tendencia a la normalización de la distribución del medio de contraste a los 15 días después de la lesión tanto leve como severa, de una manera similar con el grupo control (figura 17).

Figura 17. Efectos de la intensidad y el tiempo transcurrido después de la lesión en la distribución del medio de contraste a lo largo del espacio subaracnoideo.



Nota. El primer panel (A) muestra un esquema de la ubicación y extensión a lo largo del eje de las regiones analizadas: R2, región más craneal (10 mm de longitud); R1, región craneal próxima al sitio de la lesión (10 mm de longitud); LS, sitio de la lesión (3 mm de longitud);

C1, región caudal al lado del sitio de la lesión (10 mm de longitud); C2, región más caudal (10 mm de longitud). En todos los demás paneles, las gráficas muestran el valor de intensidad integrado de la imagen en cada región de interés. Los datos se expresan como gráficos de caja y bigotes (n de 5 a 8). Las cajas se extienden del percentil 25 al 75; la línea dentro de la caja es la mediana; los bigotes van desde los valores más pequeños a los más grandes en ese grupo. Cada punto de datos se muestra como un pequeño círculo. AUC = área bajo la curva de intensidad integrada; d = día después de la lesión. Análisis estadístico: prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Dunn. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos.

6.2.2. Rutas preferenciales para el flujo del medio de contraste

El análisis cualitativo de la distribución espacial sagital del medio de contraste muestra que, en la etapa subaguda, independientemente de la gravedad del LTME, existe una alteración en las vías para el flujo del medio de contraste más allá del sitio de la lesión (figuras 18, 19, 20, 21 y 22). En ratas de los grupos subagudos que muestran el paso del medio de contraste más craneal del sitio de la lesión, la vía preferencial cambió desde las regiones dorsales a laterales y ventrales en ratas 6/8 (75%) y 2/3 (67%) con leves y LTME severa, respectivamente (figura 23).

Figura 18. Diagrama de la distribución transversal del medio de contraste en el espacio subaracnoideo espinal en ratas del grupo control.

A - CONTROL group

RAT ID	SPINAL AREA	SPINAL LEVEL														
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	L1	L2
R6	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R9	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R22	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R27	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R35	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R38	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															

Nota. Se observa el paso del medio de contraste hacia craneal de T9 de manera uniforme.

Figura 19. Diagrama de la distribución transversal del medio de contraste en el espacio subaracnoideo espinal en ratas con lesión traumática de médula espinal aguda leve.

B - MILD, Day 1 group

RAT ID	SPINAL AREA	SPINAL LEVEL														
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	L1	L2
R13	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R19	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R20	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R26	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R28	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															

Nota. Se observa el paso del medio de contraste hacia craneal del sitio de lesión.

Figura 20. Diagrama de la distribución transversal del medio de contraste en el espacio subaracnoideo en ratas del grupo con lesión traumática de médula espinal subaguda leve.

C - MILD, Day 15 group

RAT ID	SPINAL AREA	SPINAL LEVEL														
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	L1	L2
R1	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R4	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R11	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R12	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R17	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R21	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R24	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R33	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															

Nota. En la mayoría de ratas se observa el cambio del medio de contraste de dorsal a lateral y ventral hacia craneal del sitio de lesión.

Figura 21. Diagrama de la distribución transversal del medio de contraste en el espacio subaracnoideo espinal en ratas del grupo con lesión traumática de médula espinal aguda severa.

D - SEVERE, Day 1 group

RAT ID	SPINAL AREA	SPINAL LEVEL														
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	L1	L2
R3	DORSAL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	VENTRAL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	LEFT LATERAL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	RIGHT LATERAL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
R7	DORSAL											■	■	■	■	■
	VENTRAL											■	■	■	■	■
	LEFT LATERAL											■	■	■	■	■
	RIGHT LATERAL											■	■	■	■	■
R14	DORSAL											■	■	■	■	■
	VENTRAL											■	■	■	■	■
	LEFT LATERAL											■	■	■	■	■
	RIGHT LATERAL											■	■	■	■	■
R25	DORSAL											■	■	■	■	■
	VENTRAL											■	■	■	■	■
	LEFT LATERAL											■	■	■	■	■
	RIGHT LATERAL											■	■	■	■	■
R31	DORSAL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	VENTRAL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	LEFT LATERAL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	RIGHT LATERAL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
R39	DORSAL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	VENTRAL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	LEFT LATERAL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	RIGHT LATERAL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Nota. Se observa que la vía de preferencia de circulación del medio de contraste es uniforme dentro de las ratas bloqueadas, así como no bloqueadas.

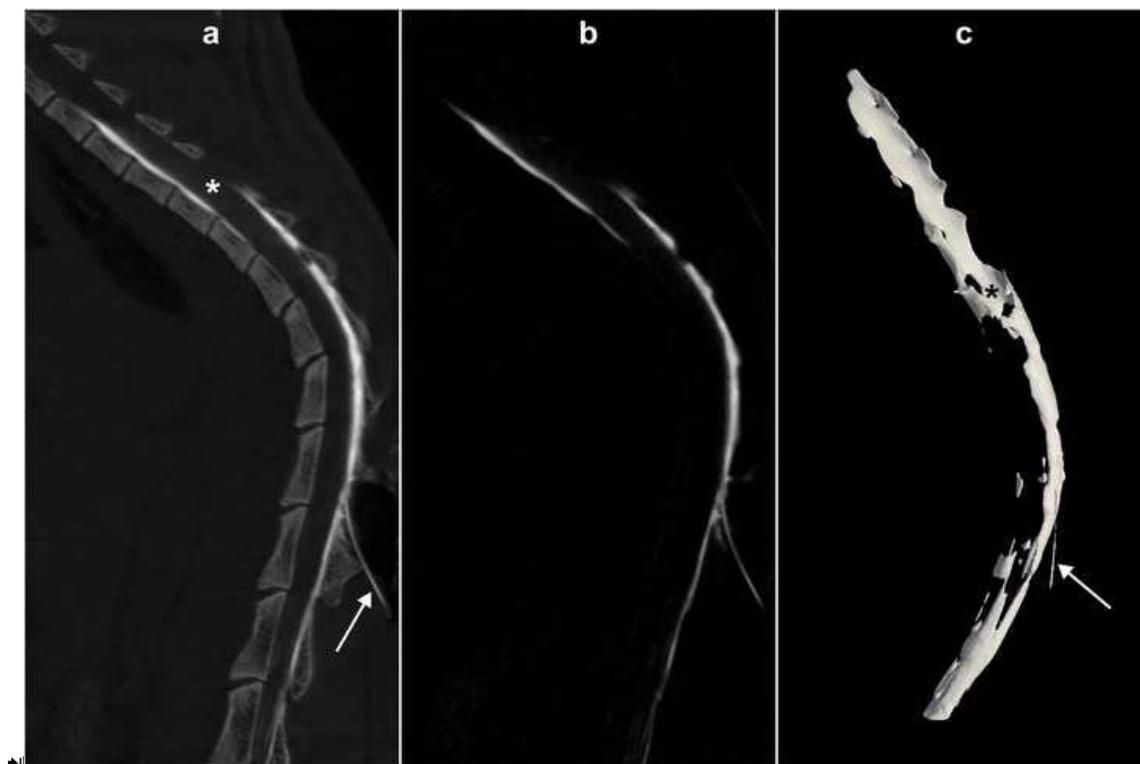
Figura 22. Diagrama de la distribución transversal del medio de contraste en el espacio subaracnoideo en ratas del grupo con lesión traumática subaguda severa.

E - SEVERE, Day 15 group

RAT ID	SPINAL AREA	SPINAL LEVEL														
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	L1	L2
R2	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R5	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R10	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R15	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R16	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R18	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R30	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															
R37	DORSAL															
	VENTRAL															
	LEFT LATERAL															
	RIGHT LATERAL															

Nota. En la mayoría de ratas no bloqueadas, se observa el cambio del medio de contraste de dorsal a lateral y ventral hacia craneal del sitio de lesión.

Figura 23. Imágenes longitudinales representativas del cambio en la vía preferencial del flujo del medio de contraste más hacia craneal del sitio de la lesión, de una rata con lesión traumática de médula espinal subaguda leve.

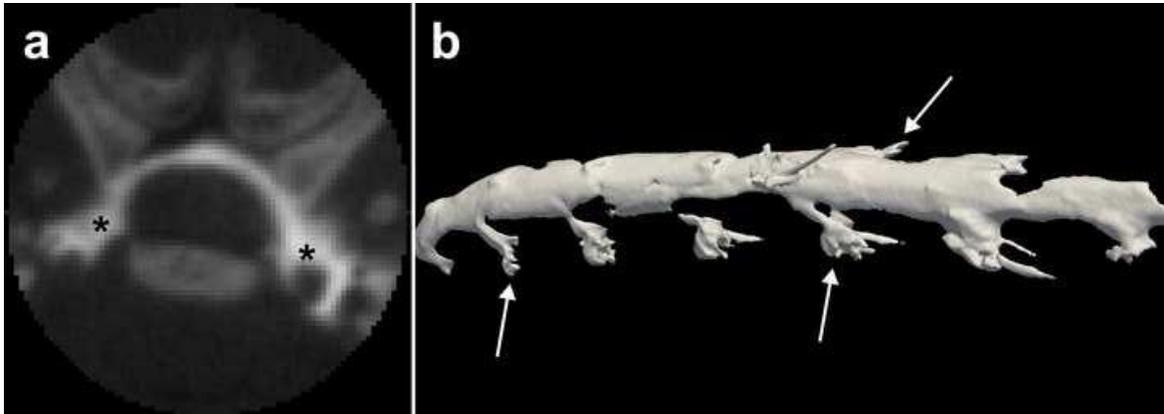


Nota. Se observa el cambio del flujo dorsal a lateral y ventral en el sitio de lesión (asteriscos); a) sección sagital 2D de una mielografía que muestra vértebras y medio de contraste; b) sección sagital 2D, que muestra solo medio de contraste después de la sustracción digital; c) reconstrucción 3D. Las flechas indican la ubicación de la cánula intratecal.

6.2.3. Presencia de medio de contraste alrededor de las raíces nerviosas

El medio de contraste también se observó a lo largo del trayecto de las raíces nerviosas y no solamente en el ESAE (figura 24). Aparentemente este fenómeno no está asociado con la presencia o ausencia de lesiones, y se desconoce la causa.

Figura 24. Imágenes representativas de la presencia del medio de contraste en el manguito de las raíces nerviosas.

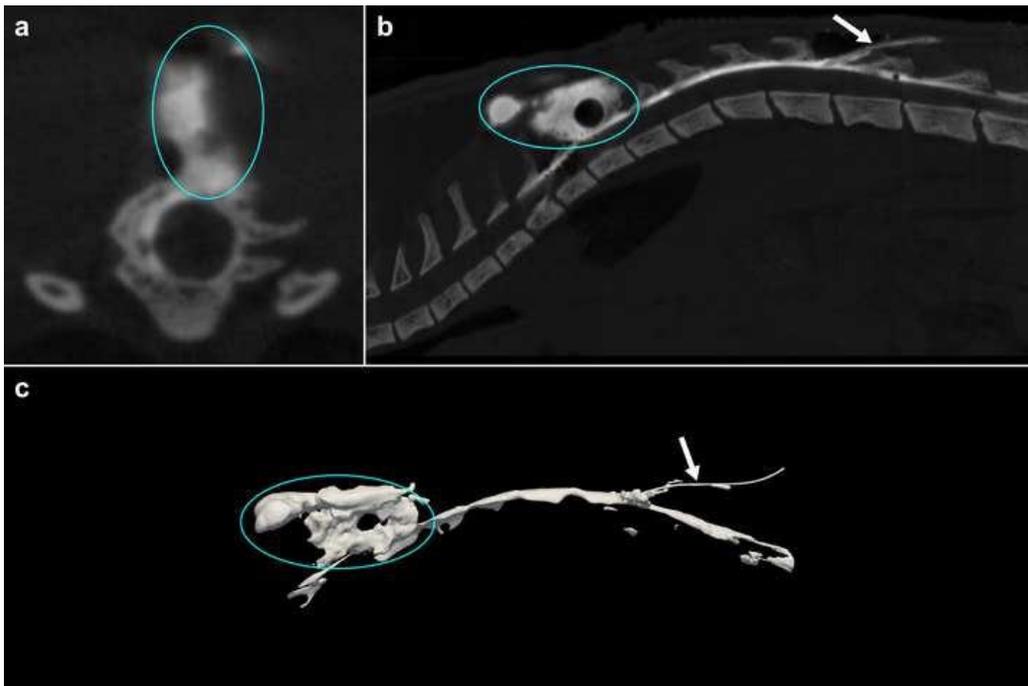


Nota. a) Corte transversal en 2D que muestra el medio de contraste en la entrada de ambas raíces dorsales (asteriscos); b) Imagen longitudinal en 3D que muestra la presencia del medio de contraste a lo largo de varias raíces nerviosas (flechas).

6.2.4. Fuga de medio de contraste debido a ruptura del saco dural

Ocurrieron eventos inesperados, como por ejemplo la salida de medio de contraste desde el ESAE debido el desgarro del saco dural en el momento de la cirugía de la columna vertebral (laminectomía o LTME), que pasaron desapercibidos para el cirujano, pero fueron detectados fácilmente por la técnica de microtomografía con medio de contraste; esto ocurrió en dos ratas que fueron excluidas de los análisis de grupos (figura 25).

Figura 25. Imágenes de la fuga del medio de contraste en el sitio de la laminectomía.



Nota. a) Corte transversal 2D; b) corte longitudinal de una mielografía que muestra vértebras y medio de contraste; c) reconstrucción longitudinal 3D. El óvalo verde encierra la imagen del medio de contraste que escapa por la abertura del saco dural. Las flechas indican la ubicación de la cánula intratecal.

7. DISCUSIÓN

7.1. Desarrollo de técnica mielográfica y prueba en ratas íntegras

En el primer experimento se obtuvieron protocolos de estudios mielográficos en micro-TC en ratas utilizando medios de contraste yodados y de oro, además de sustracción de imágenes digitales, que permitieron obtener mielogramas de alta resolución sin interferencia de tejidos adyacentes.

La mielografía clínica clásica obtenida por radiografía simple, solo permite visualizar parcialmente el estado de permeabilidad de ESAE, así como alguna fuga de LCR (Franco-Bourland *et al.*, 2013; Iannotti *et al.*, 2006), pero no proporciona información espacial o detallada sobre la anatomía fina del ESAE. En cambio, los protocolos obtenidos en nuestras investigaciones permitieron visualizar el ESAE sin interferencias de imágenes de huesos y tejidos blancos adyacentes, y además se obtuvieron imágenes en 3D.

En humanos y perros se ha utilizado regularmente resonancia magnética y radionúclidos para obtener imágenes de alta resolución e información dinámica del ESAE (Baron *et al.*, 2020; Driver *et al.*, 2019; Mason *et al.*, 1998). Sin embargo, estas metodologías no son factibles en roedores debido a diferencias notables de tamaño, falta de equipos de alto costo en nuestros centros de investigación, entre otras razones. Para superar estos inconvenientes, se recurrió a la micro-TC, que proporciona imágenes con una resolución espacial más alta que la tomografía clínica, y además es una técnica muy útil en una amplia variedad de campos biomédicos en roedores (Doost y Arnolda, 2021; Han *et al.*, 2021; Zenzes y Zaslansky, 2021), aunque no se había aplicado a la obtención de imágenes del ESAE. El sistema de micro-TC utilizado en este experimento tuvo un límite de resolución de alrededor de 100 μm , suficiente para mostrar algunos detalles anatómicos del ESAE en ratas.

Los medios de contraste que se usan con mayor frecuencia son positivos, específicamente basados en yodo. Una de las nuevas propuestas de medio de contraste fue utilizar un compuesto de oro, elemento químico que al poseer mayor absorción que el yodo, otorgaría un mejor contraste de imagen al utilizarse en con una dosis más baja de rayos X (Hainfeld *et al.*, 2006). En este primer experimento, se compararon tres medios de contraste que han sido utilizados en estudios clínicos y preclínicos. Iomeron y Fenestra son compuestos yodados. Iomeron es hidrosoluble y su componente principal es iomeprol, un agente no iónico triyodado, equivalente a 400 mg de yodo/ml. Fenestra está elaborada con una emulsión de lípidos de aceite en agua, con un tamaño de partícula de 150 nm, que contiene un triglicérido yodado equivalente a 50 mg de yodo/ml. Con respecto a la eficiencia de atenuación, la diferencia de 8:1 en la concentración de yodo entre estos dos agentes dio como resultado una mayor atenuación de rayos X para Iomeron con el mismo volumen inyectado (120 μ L), en los protocolos EU y ED (figura 11). La forma en que ambos agentes de contraste se difunden y se alojan en el ESAE también puede afectar la calidad de la imagen visualizada. Fenestra fue elaborado para aumentar la duración del contraste en la sangre y extender la ventana de tiempo durante la cual se pueden realizar imágenes (Hubbell y Seltzer, 2004). En nuestro experimento se utilizó esperando una distribución homogénea y que se adhiriera a las paredes del ESAE; sin embargo, no se lograron mejores imágenes mielográficas, ya que la baja concentración de yodo originó imágenes con contraste muy bajo. Otra limitación para el uso de Fenestra fue el costo elevado en comparación con Iomeron.

AuroVist es un medio de contraste positivo que consiste principalmente en NPO de 15 nm de diámetro (núcleo), estabilizadas con una cubierta orgánica soluble en agua, estas características ocasionan de que sea muy bien tolerado en altas concentraciones (hasta 200

mg de Au/mL). Una ventaja significativa es que puede lograr un mayor contraste que los agentes yodados, ya que el oro atenúa casi 3:1 en comparación con el yodo a 20 y 100 keV. Al evaluar el protocolo de adquisición de imágenes ED, se utilizaron configuraciones de 45 y 30 kV para energías altas y bajas, respectivamente, las cuales están por debajo del borde K dorado. Si tomamos el cociente del coeficiente de atenuación total a 30 y 45 kV, obtenemos 2.72 para el oro y 2.44 para el hueso (Hubbell y Seltzer, 2004). Es decir que los valores de oro y hueso cambian en casi la misma proporción de imágenes EA a EB, lo que hace que la sustracción ponderada los elimine a ambos por igual, dando como resultado una imagen en blanco. Por el contrario, para el yodo, el cociente anterior es 0.497 (debido al cruce de su borde K), lo que permite la eliminación selectiva de la imagen del hueso.

Las imágenes de sustracción digital mejoradas con contraste, se refieren a técnicas basadas en el uso de agentes para aumentar el contraste entre las áreas de interés y la anatomía del fondo. La sustracción se realiza digitalmente utilizando los valores de píxeles de las imágenes adquiridas con diferentes energías y/o después de la administración de contraste. Estos métodos permiten la visualización y evaluación de estructuras de densidad radiológica similar a través de las mejoras de contraste y resolución (Berumen *et al.*, 2016; Castillo *et al.*, 2016; Kuhlman *et al.*, 2006).

Debido a que el protocolo ED no funcionó para AuroVist, se decidió experimentar mucho más en el protocolo EU para obtener imágenes con contraste mejorado y realizar la sustracción de imágenes. Al ver resultados positivos, se extendieron las pruebas del protocolo EU con medios basados en yodo. Los resultados finales no solo fueron influenciados por el protocolo de adquisición de imágenes, sino también por el medio de contraste. Es así como después de los análisis tanto cualitativos como cuantitativos, la combinación del protocolo

de adquisición de EU con Iomeron proporcionó los mejores resultados de imagen, mientras que con Fenestra y con cualquiera de los dos protocolos de adquisición se obtuvieron las imágenes con menor contraste (figuras 11 y 13).

Durante la adquisición de imágenes, los movimientos respiratorios podrían originar desenfoque de la imagen, desajuste de la geometría de adquisición y afectar el proceso de sustracción digital con contraste. Este riesgo de artefactos por movimiento fue muy alto, ya que el tiempo de adquisición fue de 10 minutos para cada una de las dos imágenes consecutivas. Para reducirlo, se implementaron dos estrategias que funcionaron adecuadamente: primero, colocar a las ratas en decúbito lateral y de esta manera evitar el movimiento de la columna vertebral ocasionado por la respiración; y segundo, mantener la anestesia en un plano muy profundo. Sin embargo, la posición lateral favoreció la sedimentación gravitacional del medio de contraste, visible especialmente en los cortes transversales. Dado que los artefactos de movimiento no se pueden evitar por completo, el flujo de trabajo de procesamiento posterior incluyó un paso de registro antes de la sustracción de imágenes, para obtener una mejor correspondencia geométrica y minimizar los bordes que surgen de la eliminación incorrecta de los tejidos circundantes.

Los resultados de este experimento son preliminares, por lo que se requieren más estudios para mejorar esta técnica y aumentar su aplicabilidad. Entre las limitaciones tenemos que el tamaño de la muestra fue pequeño, lo que solo permitió tener conclusiones preliminares. Por otra parte, si bien el equipo de micro-TC permite una resolución que proporciona detalles aceptables, otros sistemas con mayor resolución como resonancia magnética podrían permitir una mejor visualización del ESAE.

Se debe señalar que las investigaciones con nuevos agentes de contraste y la tecnología desarrollada para la micro-TC preclínica también tienen el potencial de traducirse en mejoras significativas en las imágenes clínicas (Ashton *et al.*, 2015).

7.2. Caracterización de cambios en el espacio subaracnoideo espinal en ratas con lesión medular

En lo que respecta al segundo experimento, este fue diseñado para estudiar los cambios en el ESAE de ratas lesionadas mediante mielografías con sustracción digital en micro-TC, en función de la severidad y el tiempo transcurrido después de la lesión; y este sería el primer reporte de imágenes mielográficas de alta resolución en ratas con LTME.

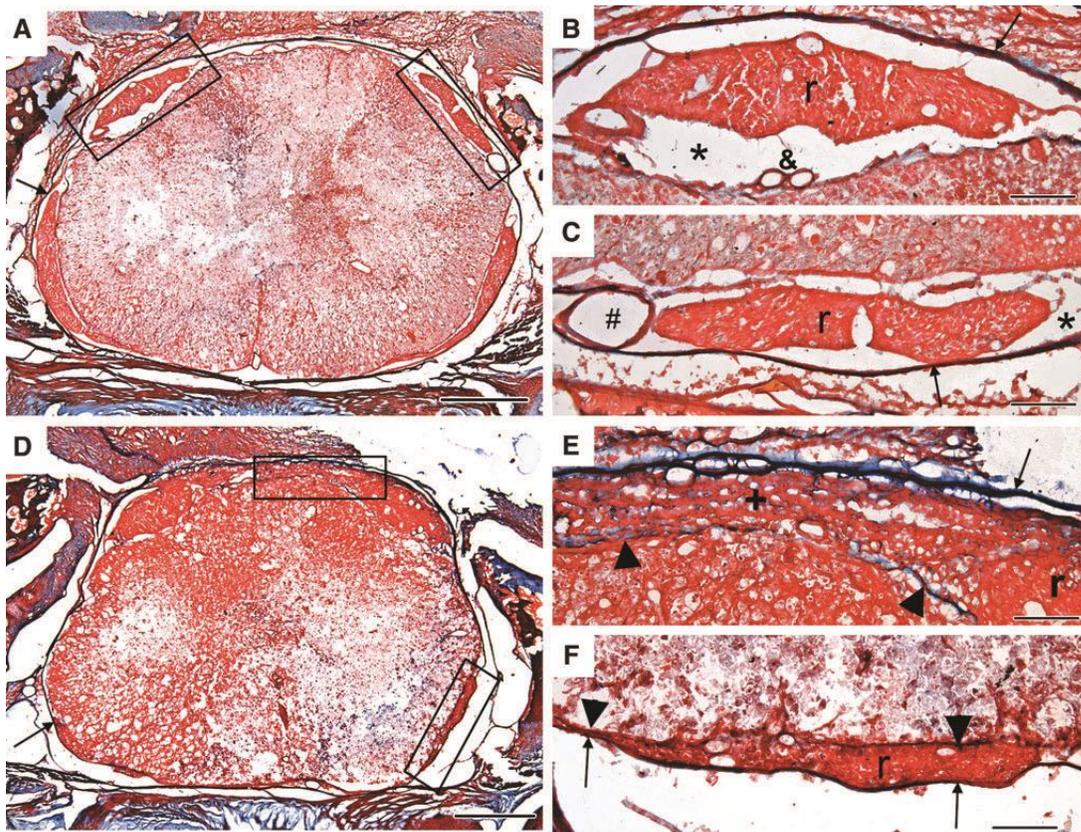
Las alteraciones en la permeabilidad del ESAE fueron los hallazgos más destacados de este estudio, y estas alteraciones dependieron principalmente de la severidad de la lesión, ya que el bloqueo del medio de contraste hacia craneal fue mayor en las ratas con lesión severa, de acuerdo con los análisis cualitativos y cuantitativos.

Además de la intensidad de la lesión, el tiempo transcurrido después de la lesión también juega un papel importante en los trastornos de permeabilidad del ESAE. Los cambios en la distribución del medio de contraste a lo largo del ESAE son los principales eventos cuantitativos en la etapa aguda, mostrando más tarde en la etapa subaguda una tendencia hacia la recuperación (figura 17). Aunque estos cambios son más pronunciados en la etapa aguda, la magnitud y la extensión caudo-craneal varía de acuerdo con la gravedad de la lesión.

Los cambios observados en la etapa aguda se pueden atribuir principalmente a la hinchazón de la ME y al sangrado subaracnoideo, mientras que los observados en la etapa subaguda,

cuando la hinchazón ha remitido y la hemorragia se ha resuelto, podrían resultar de la atrofia de la ME y el estrechamiento del saco dural. Estos hallazgos de las variaciones, de permeabilidad del ESAE en función de la intensidad de la lesión y del tiempo de la LTME, son similares a lo reportado anteriormente tanto en estudios histológicos (figura 26) (Reyes-Alva *et al.*, 2013) como por cuantificación del paso de partículas superparamagnéticas (Franco-Bourland *et al.*, 2013).

Figura 26. Estudio histopatológico del sitio de lesión en fase aguda que muestra patologías de la médula espinal y espacio subaracnoideo espinal.

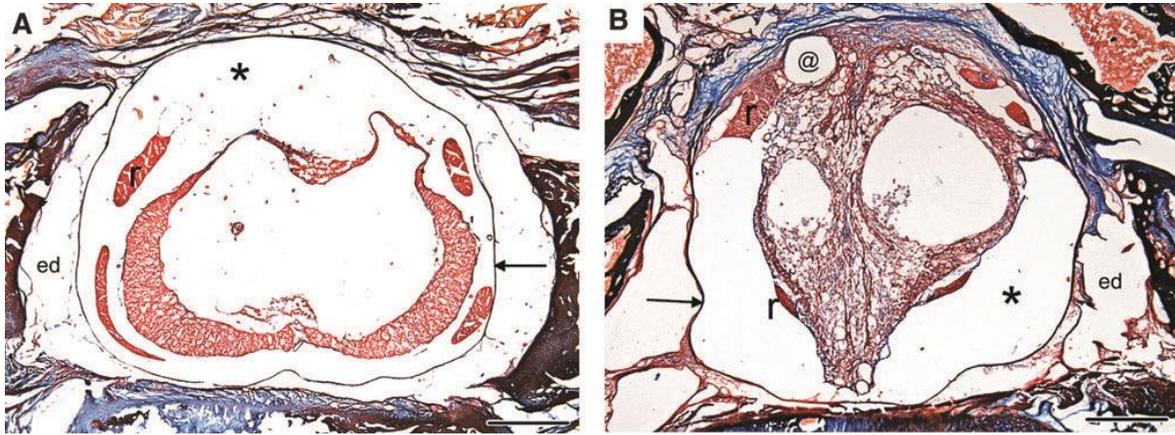


Nota. (A – C) Imágenes de una lesión leve que muestra la luz del espacio subaracnoideo (*) libre de hematomas, raíces nerviosas descomprimidas (r), así como plexo pial permeable (&) y vasos sanguíneos radiculares (#); La ME muestra necrosis y hemorragia. (D – F)

Imágenes de una lesión severa que muestra una oclusión casi completa del espacio subaracnoideo, raíces comprimidas (r), así como vasos radicales y piales no permeables. (E) El hematoma (+), entre el saco dural (flecha) y la piamadre (puntas de flecha) muestra signos tempranos de fibrosis (color azul). (F) Raíz nerviosa comprimida (r) entre el saco dural (flechas) y la piamadre (puntas de flecha). La ME muestra abundante tejido desvitalizado. Tinción de Masson. Barras de escala: (A y D) 0,5 mm; (B, C, E y F) 100 μ m (Reyes-Alva *et al.*, 2013).

Los resultados del análisis cualitativo indican que el porcentaje de animales que mostraron bloqueo de ESAE fue mayor en la etapa subaguda en comparación con la etapa aguda (figura 16). Este resultado difiere de los resultados cuantitativos basados en el análisis de la distribución del medio de contraste en la etapa subaguda. Para explicar esta aparente discrepancia, se debe considerar que la recuperación de la permeabilidad del ESAE en la etapa subaguda se ha asociado principalmente a la atrofia de la ME. Sin embargo, el estado tardío de la permeabilidad del ESAE está determinado no solo por la atrofia de la ME, sino también por la constricción fibrosa del saco dural (Reyes-Alva *et al.*, 2013). Por lo tanto, posiblemente el estado tardío de la permeabilidad del ESAE dependerá del predominio de uno de estos dos fenómenos. Estos hallazgos, concuerdan con los reportados para las alteraciones de la permeabilidad del ESAE en función de la intensidad de la LTME y evaluados con estudios histológicos (Reyes-Alva *et al.*, 2013) y mediante la cuantificación del paso de perlas superparamagnéticas (Franco-Bourland *et al.*, 2013).

Figura 27. Estudio histopatológico del sitio de lesión en fase crónica que muestra patologías de la médula espinal y espacio subaracnoideo espinal.



Nota. (A) Lesión leve a los 3 meses de la lesión que muestra atrofia medular y recuperación de la luz del espacio subaracnoideo (*). Las raíces nerviosas (r) están libres en el espacio y parecen de tamaño normal. No hay adherencia de la ME. (B) Lesión severa a los 3 meses después de la lesión; la constricción del saco dural (flecha) y la atrofia severa de la ME dan como resultado un aumento de la luz del espacio subaracnoideo (*); la ME está adherida a nivel dorsal, las raíces nerviosas muestran (r) atrofia y atrapamiento; es evidente un quiste subaracnoideo (@) en el área de anclaje. Espacio epidural (ed). Tinción de Masson. Barras de escala: 0,5 mm (Reyes-Alva *et al.*, 2013).

Aunque no se lo investigó directamente, los resultados son indicativos de un flujo de LCR impedido o suprimido, que podría representar dificultades para la llegada de nutrientes a la ME, la eliminación de productos de desecho, los ajustes del microambiente (por ejemplo, PH y osmolalidad), soporte trófico, regulación de la respuesta inmune y otros mecanismos de autoreparación relacionados con la función del LCR (Bothwell *et al.*, 2021). También es posible que las alteraciones en la permeabilidad de ESAE descritas aquí puedan estar

relacionadas con un mal resultado después de la lesión, debido a que se liberan endógena y exógenamente las sustancias administradas y las células transportadas en el LCR para la reparación del tejido neural no podrán alcanzar eficazmente el sitio de la lesión. De manera, que se deberían tener en consideración estas alteraciones al planificar las terapias intratecales para la LTME.

Como se ha indicado, ya se han realizado estudios sobre las alteraciones de la permeabilidad de ESAE después de una LTME. Uno de los aportes de nuestra metodología de imagen micro-TC, es la capacidad de evaluar cualitativa y cuantitativamente la permeabilidad de ESAE *in vivo*. De hecho, la heterogeneidad observada en los resultados tanto cualitativos como cuantitativos entre los sujetos dentro de cada grupo fue sorprendente (figuras 18, 19, 20, 21 y 22). Por ejemplo, en el grupo de control, aunque el ESAE es permeable al medio de contraste en todas las ratas, el patrón de distribución es desigual. La distribución no homogénea del medio de contraste a lo largo del ESAE, ilustrada en los diagramas de la figura 18, probablemente esté relacionada con varios factores, incluida la distribución gravitacional del medio de contraste, la estrechez del ESAE, la mayor viscosidad del medio de contraste en comparación con el LCR y la interferencia de estructuras neurovasculares en el ESAE.

Estas variaciones de la permeabilidad del ESAE también fue observada en los cuatro grupos experimentales, a pesar de que la lesión fue causada de manera controlada. Por ejemplo, en el grupo 3 (día 1, lesión severa), el 50% de las ratas mostraron obstrucción, mientras que las otras tenían permeabilidad (gráfico 21). Según estudios previos, entre las posibles causas de esta variabilidad se encuentran los cambios en el tamaño medular (por tumefacción o atrofia), presencia de hematomas subaracnoideos y alteraciones de la elasticidad del saco dural

(Franco-Bourland *et al.*, 2013; Reyes-Alva *et al.*, 2013, 2014). Sin embargo, a pesar de la heterogeneidad intragrupo, se detectaron diferencias estadísticas significativas entre los grupos.

Con respecto a las vías preferenciales para el flujo del medio de contraste a través del ESAE se observaron variaciones en la etapa subaguda (figura 23), independientemente de la gravedad de la LTME, que podrían estar relacionadas con cambios histopatológicos como por ejemplo, aracnoiditis postraumática por fibrosis meníngea, anclaje de la ME y atrapamiento de la raíz nerviosa (Keskin *et al.*, 2021). Esta aracnoiditis es el resultado de la evolución de la inflamación meníngea aguda hasta la cicatrización tardía. Los hematomas subaracnoideos pueden potenciar la irritación e inflamación meníngea postraumática aguda que conlleva a una aracnoiditis crónica más intensa (Aarabi *et al.*, 2019; Peng y Conermann, 2021). Los resultados del presente trabajo son consistentes con el restablecimiento de la dinámica del flujo de LCR propuesto por otros investigadores (Brodbelt *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

El LCR puede drenar hacia el sistema linfático a través de la unión anatómica entre el ESAE y el manguito formado por la extensión del saco dural alrededor de las raíces de los nervios espinales (Brierley, 1950; Chen *et al.*, 2015). El flujo del LCR desde el ESAE hacia los nervios espinales ha sido identificado en estudios experimentales que involucran la identificación morfológica de trazadores inyectados en el ESAE (Brierley, 1950; Steer y Horney, 1968). Además, la unión entre el ESAE y la manga de las raíces nerviosas ha sido demostrada por diversos métodos de neuroimagen en humanos (Dietemann *et al.*, 2012). El nuevo hallazgo en el presente trabajo es la imagen de la raíz nerviosa y la manga que la rodea en animales tan pequeños como ratas (figura 24).

Se desconoce la razón por la cual solo se observaron algunas raíces nerviosas en algunos de los animales. Aunque se ha descrito que la obstrucción experimental del ESAE puede resultar en la interrupción del drenaje linfático cervical en las vainas de la raíz del nervio espinal (Berliner *et al.*, 2019), no se observó correlación entre la observación de las raíces y la permeabilidad u obstrucción del ESAE de las ratas de los grupos experimentales. Posiblemente variables como variantes anatómicas de la vaina de la raíz nerviosa, (Dietemann *et al.*, 2012; Maiuri *et al.*, 1990), variaciones en las condiciones respiratorias (Lloyd *et al.*, 2020) y diferencias en la presión intratecal podrían estar involucradas en la presencia del medio de contraste en la raíz nerviosa por el método de micro-TC.

En este experimento, mediante mielografía en micro-TC se detectaron dos animales que presentaron fuga del LCR o medio de contraste (figura 24), por lo cual no fueron utilizados para los análisis grupales. Esta anomalía tuvo como causa posible, el desgarro del saco dural por la lesión traumática o la laminectomía. En humanos, se considera que diferentes formas de mielografías (Dietemann *et al.*, 2012) y la sustracción de imágenes digitales (Nagesh *et al.*, 2021) son eficaces para detectar fugas del LCR.

8. CONCLUSIONES

1. Se logró desarrollar una técnica de mielografía *in vivo* con sustracción digital, que proporciona imágenes 2D y 3D de alta resolución sin interferencia de tejidos vecinos, en rata.
2. El grupo donde se obtuvieron los mejores resultados cuantitativos y cualitativos en ratas íntegras fue el grupo con Iomeron y energía única.
3. Con respecto a la lesión traumática de médula espinal severa, más de la mitad de los animales tuvieron obstrucción del espacio subaracnoideo espinal tanto en estadios agudos como subagudos.
4. Los cambios en la distribución del medio de contraste a lo largo del espacio subaracnoideo espinal fueron más significativos en la fase aguda de las lesiones severas en el lugar de la lesión.
5. En la etapa subaguda, independientemente de la severidad de la lesión, hubo un cambio en la vía preferida para el flujo del medio de contraste de la región dorsal a ventral y lateral a partir del sitio de la lesión.
6. Se visualizaron detalles como el marcaje de las raíces nerviosas y la fuga de medio de contraste debido al desgarro del saco dural.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aarabi, B., Olexa, J., Chryssikos, T., Galvagno, S. M., Hersh, D. S., Wessell, A., Sansur, C., Schwartzbauer, G., Crandall, K., Shanmuganathan, K., Simard, J. M., Mushlin, H., Kole, M., Le, E., Pratt, N., Cannarsa, G., Lomangino, C. D., Scarboro, M., Aresco, C., y Curry, B. (2019). Extent of Spinal Cord Decompression in Motor Complete (American Spinal Injury Association Impairment Scale Grades A and B) Traumatic Spinal Cord Injury Patients: Post-Operative Magnetic Resonance Imaging Analysis of Standard Operative Approaches. *Journal of Neurotrauma*, 36(6), 862-876. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5834>
- Ahrens, J., Geveci, B., y Law, C. (2005). ParaView: An End-User Tool for Large-Data Visualization. In C. D. Hansen y C. R. Johnson (Eds.), *The Visualization Handbook*. Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/B978-012387582-2/50038-1>
- Akai, T., Hatta, T., Sakata-Haga, H., Yamamoto, S., Otani, H., Yamamoto, S., y Kuroda, S. (2021). Cerebrospinal fluid may flow out from the brain through the frontal skull base and choroid plexus: a gold colloid and cadaverine injection study in mouse fetus. *Child's Nervous System*, 37(10), 3013-3020. <https://doi.org/10.1007/s00381-021-05253-1>
- Alcolado, R., Weller, R., Parrish, E., y Garrod, D. (1988). The cranial arachnoid and pia mater in man: anatomical and ultrastructural observations. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 14(1), 1-17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1988.tb00862.x>
- Aldskogius, H., y Kozlova, E. (2021). Dorsal Root Injury-A Model for Exploring Pathophysiology and Therapeutic Strategies in Spinal Cord Injury. *Cells*, 10(9), 2185. <https://doi.org/10.3390/cells10092185>
- Alqahtany, M., McFaul, S., Chen, L., Zhang, S., Saarela, O., Alqahtani, F., y Cusimano, M. (2021). The Changing Etiology and Epidemiology of Traumatic Spinal Injury: A Population-Based Study. *World Neurosurgery*, 149, e116-e127. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2021.02.066>
- All, A., y Al-Nashash, H. (2021). Comparative analysis of functional assessment for contusion and transection models of spinal cord injury. *Spinal Cord*, 59(11), 1206-1209. <https://doi.org/10.1038/s41393-021-00698-2>
- Allan, S., y Rothwell, N. (2003). Inflammation in central nervous system injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 358(1438), 1669-1677. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1358>

- Anjum, A., Yazid, M., Fauzi, M., Idris, J., Ng, A., Selvi, A., Ismail, O., Athi, R., y Lokanathan, Y. (2020). Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7533. <https://doi.org/10.3390/ijms21207533>
- Artru, A. (2017). Cerebrospinal Fluid. In J. Cottrell y P. Patel (Eds.), *Cottrell and Patel's Neuroanesthesia* (pp. 60-74). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-05908-4.10008-9>
- Ashton, J., West, J., y Badea, C. (2015). *In vivo* small animal micro-CT using nanoparticle contrast agents [Review]. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 256. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00256>
- Austin, J., Afshar, M., y Fehlings, M. (2012). The Relationship between Localized Subarachnoid Inflammation and Parenchymal Pathophysiology after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*, 29(10), 1838-1849. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2354>
- Bag, S., Schambach, S., Boll, H., Schilling, L., Groden, C., y Brockmann, M. (2010). Current Concepts for Experimental Micro-CT in Small Animals. *RöFo: Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der Nuklearmedizin*, 182(5), 390-403. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1245301>
- Bakkum, B. (2014). Surface Anatomy of the Back and Vertebral Levels of Clinically Important Structures. In G. Cramer y S. Darby (Eds.), *Clinical Anatomy of the Spine, Spinal Cord, and ANS*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07954-9.00001-3>
- Baron, J., Mastrolia, S., Shelef, I., Tirosh, D., Mijalovsky, A., Ben-Harush, Y., y Hershkovitz, R. (2020). Fetal wide subarachnoid space and its outcome in cases of macrocephaly without ventriculomegaly. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 33(15), 2570-2575. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1555805>
- Baroncini, A., Maffulli, N., Eschweiler, J., Tingart, M., y Migliorini, F. (2021). Pharmacological management of secondary spinal cord injury. *Expert Opinion in Pharmacotherapy*, 22(13), 1793-1800. <https://doi.org/10.1080/14656566.2021.1918674>
- Berliner, J., Woodcock, T., Najafi, E., Hemley, S., Lam, M., Cheng, S., Bilston, L., y Stoodley, M. (2019). Effect of extradural constriction on CSF flow in rat spinal cord. *Fluids and Barriers of the CNS*, 16, 7. <https://doi.org/10.1186/s12987-019-0127-8>

- Berumen, F., Ayala-Domínguez, L., Medina, L., y Brandan, M. (2016). *A method to optimize the image acquisition protocol of a MicroCT unit for preclinical studies using contrast-enhanced digital subtraction* AIP Conference Proceedings, <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.4954123>
- Bothwell, S., Omileke, D., Hood, R., Pepperall, D., Azarpeykan, S., Patabendige, A., y Spratt, N. (2021). Altered Cerebrospinal Fluid Clearance and Increased Intracranial Pressure in Rats 18 h After Experimental Cortical Ischaemia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, 159. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.712779>
- Bozanovic-Sosic, R., Mollanji, R., y Johnston, M. (2001). Spinal and cranial contributions to total cerebrospinal fluid transport. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281(3), R909-R916. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.3.R909>
- Brierley, J. (1950). The penetration of particulate matter from the cerebrospinal fluid into the spinal fluid into the spinal ganglia, peripheral, nerves, and perivascular spaces of the central nervous system. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 13(3), 203-215. <https://doi.org/10.1136/jnnp.13.3.203>
- Brodbelt, A., y Stoodley, M. (2007). CSF pathways: a review. *British Journal of Neurosurgery*, 21(5), 510-520. <https://doi.org/10.1080/02688690701447420>
- Brodbelt, A., Stoodley, M., Watling, A., Tu, J., Burke, S., y Jones, N. (2003). Altered Subarachnoid Space Compliance and Fluid Flow in an Animal Model of Posttraumatic Syringomyelia. *Spine*, 28(20), E413-E419. <https://doi.org/10.1097/01.Brs.0000092346.83686.B9>
- Carlson, G., y Gorden, C. (2002). Current developments in spinal cord injury research. *The Spine Journal*, 2, 116-128. [https://doi.org/10.1016/S1529-9430\(01\)00029-8](https://doi.org/10.1016/S1529-9430(01)00029-8)
- Castillo, J., Corona-Nieblas, L., Berumen, F., Ayala-Domínguez, L., Medina, L., y Brandan, M. (2016). *Optimization of dual-energy subtraction for preclinical studies using a commercial MicroCT unit* AIP Conference Proceedings, <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.4954125>
- Chakraborty, A., Ciciriello, A., Dumont, C., y Pearson, R. (2021). Nanoparticle-Based Delivery to Treat Spinal Cord Injury-a Mini-review. *AAPS PharmSciTech*, 22(3), 101. <https://doi.org/10.1208/s12249-021-01975-2>

- Chen, L., Elias, G., Yostos, M., Stimec, B., Fasel, J., y Murphy, K. (2015). Pathways of cerebrospinal fluid outflow: a deeper understanding of resorption. *Neuroradiology*, 57(2), 139-147. <https://doi.org/10.1007/s00234-014-1461-9>
- Courtice, F., y Simmonds, W. (1951). The removal of protein from the subarachnoid space. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 29(4), 255-263.
- Cruz-Bastida, J., Rosado-Méndez, I., Pérez-Ponce, H., Villaseñor, Y., Galván, H. A., Trujillo-Zamudio, F., Benítez-Bribiesca, L., y Brandan, M. (2012). Contrast Optimization in Clinical Contrast-Enhanced Digital Mammography Images. In A. D. A. Maidment, P. R. Bakic, y S. Gavenonis, *Breast Imaging Proceedings of the 11th international conference on Breast Imaging*, Berlin, Heidelberg.
- da Costa, R., y Samii, V. (2010). Advanced imaging of the spine in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(5), 765-790. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.05.002>
- Darby, S. (2014). General Anatomy of the Spinal Cord In G. Cramer y S. Darby (Eds.), *Clinical Anatomy of the Spine, Spinal Cord, and Ans* (pp. 65-97). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07954-9.00003-7>
- Dietemann, J., Bogorin, A., Abu Eid, M., Sanda, R., Mourao, I., Draghici, S., Rotaru, N., y Koob, M. (2012). Tips and traps in neurological imaging: imaging the perimedullary spaces. *Diagnostic and Interventional Imaging*, 93(12), 985-992. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2012.08.005>
- Doost, A., y Arnolda, L. (2021). Iodine staining outperforms phosphotungstic acid in high-resolution micro-CT scanning of post-natal mice cardiac structures. *Journal of Medical Imaging*, 8(2), 027001. <https://doi.org/10.1117/1.Jmi.8.2.027001>
- Driver, C., Rose, J., Tauro, A., Fernandes, R., y Rusbridge, C. (2019). Magnetic resonance image findings in pug dogs with thoracolumbar myelopathy and concurrent caudal articular process dysplasia. *BMC veterinary research*, 15, 182. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1866-0>
- Eli, I., Lerner, D., y Ghogawala, Z. (2021). Acute Traumatic Spinal Cord Injury. *Neurologic Clinics*, 39(2), 471-488. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2021.02.004>
- Ellis, H. (2009). The anatomy of the epidural space. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 10(11), 533-535. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2009.08.003>

- Fehlings, M., y Nguyen, D. (2010). Immunoglobulin G: A Potential Treatment to Attenuate Neuroinflammation Following Spinal Cord Injury. *Journal of Clinical Immunology*, 30(1), 109-112. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9404-7>
- Fehlings, M., Tator, C., y Linden, R. (1989). The effect of nimodipine and dextran on axonal function and blood flow following experimental spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*, 71(3), 403-416. <https://doi.org/10.3171/jns.1989.71.3.0403>
- Fraher, J. P. (1999). The transitional zone and CNS regeneration. *Journal of anatomy*, 194, 161-182. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1999.19420161.x>
- Franco-Bourland, R., Guízar-Sahagún, G., Quintana-Armenta, A., Reyes-Alva, H., Martínez-Cruz, A., y Madrazo, I. (2013). Superparamagnetic beads for estimation of spinal subarachnoid space permeability in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 219(2), 271-275. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.08.004>
- Franco-Bourland, R., Reyes-Alva, H., Quintana-Armenta, A., Martínez-Cruz, A., Madrazo, I., y Guízar-Sahagún, G. (2015). Temporal changes of spinal subarachnoid space patency after graded spinal cord injury in rats. *Injury*, 46(4), 634-637. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2015.01.007>
- Gallotti, A., Uggeri, F., Favilla, A., Cabrini, M., y de Haën, C. (1994). The chemistry of iomeprol and physico-chemical properties of its aqueous solutions and pharmaceutical formulations. *European Journal of Radiology*, 18, S1-12. [https://doi.org/10.1016/0720-048x\(94\)90089-2](https://doi.org/10.1016/0720-048x(94)90089-2)
- Gao, J., Khang, M., Liao, Z., Detloff, M., y Lee, J. S. (2021). Therapeutic targets and nanomaterial-based therapies for mitigation of secondary injury after spinal cord injury. *Nanomedicine*, 16(22), 2013-2028. <https://doi.org/10.2217/nnm-2021-0113>
- Gomez, D., Chambers, A., Di Benedetto, A., y Potts, D. (1974). The spinal cerebrospinal fluid absorptive pathways. *Neuroradiology*, 8, 61-66. <https://doi.org/10.1007/bf00345037>
- Grossman, S., y Krabak, M. (1999). Leptomeningeal carcinomatosis. *Cancer Treatment Reviews*, 25(2), 103-119. <https://doi.org/10.1053/ctrv.1999.0119>
- Hachem, L., y Fehlings, M. (2021). Pathophysiology of Spinal Cord Injury. *Neurosurgery Clinics of North America*, 32(3), 305-313. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2021.03.002>

- Haines, D. (1991). On the question of a subdural space. *The Anatomical Record*, 230(1), 3-21. <https://doi.org/10.1002/ar.1092300103>
- Hainfeld, J., Slatkin, D., Focella, T., y Smilowitz, H. (2006). Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *The British Journal of Radiology*, 79(939), 248-253. <https://doi.org/10.1259/bjr/13169882>
- Han, Q., Zheng, Z., Liang, Q., Zhang, K., Yang, F., Fu, X., Luo, X., Ding, J., Xie, R., Zhu, W., y Zhu, P. (2021). Testing if Micro-CT Is Capable of Quantitating the Extent of Proteoglycan-Aggregan Induced Axial Spondyloarthritis in Mice. *Frontiers in immunology*, 12, 681217. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.681217>
- Harrington, M., Salomon, R., Pogoda, J., Oborina, E., Okey, N., Johnson, B., Schmidt, D., Fonteh, A., y Dalleska, N. (2010). Cerebrospinal fluid sodium rhythms. *Cerebrospinal Fluid Research*, 7, 3. <https://doi.org/10.1186/1743-8454-7-3>
- Harrison, G. (1999). Topographical anatomy of the lumbar epidural region: an in vivo study using computerized axial tomography. *British Journal of Anaesthesia*, 83(2), 229-234. <https://doi.org/10.1093/bja/83.2.229>
- Hodgetts, S., Plant, G., y Harvey, A. (2009). Spinal Cord Injury: experimental animal models and relation to human therapy. In C. Watson, G. Paxinos, y G. Kayalioglu (Eds.), *The Spinal Cord* (pp. 209-237). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374247-6.50018-3>
- Hsu, M., Laaker, C., Sandor, M., y Fabry, Z. (2021). Neuroinflammation-Driven Lymphangiogenesis in CNS Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 200. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.683676>
- Hsu, Y., Tran, M., y Linninger, A. (2015). Dynamic regulation of aquaporin-4 water channels in neurological disorders. *Croatian medical journal*, 56(5), 401-421. <https://doi.org/10.3325/cmj.2015.56.401>
- Hubbell, J., y Seltzer, S. (2004). *X-ray mass attenuation coefficients (NIST standard reference database 126)* <https://doi.org/10.18434/T4D01F>
- Iannotti, C., Zhang, Y., Shields, L., Han, Y., Burke, D., Xu, X., y Shields, C. (2006). Dural repair reduces connective tissue scar invasion and cystic cavity formation after acute spinal cord laceration injury in adult rats. *Journal of Neurotrauma*, 23(6), 853-865. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.853>

- Jin, L., Li, J., Wang, K., Xia, W., Zhu, Z., Wang, C., Li, X., y Liu, H. (2021). Blood-Spinal Cord Barrier in Spinal Cord Injury: A Review. *Journal of Neurotrauma*, 38(9), 1203-1224. <https://doi.org/10.1089/neu.2020.7413>
- Johanson, C., Duncan, J., Klinge, P., Brinker, T., Stopa, E., y Silverberg, G. (2008). Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Research*, 5, 10. <https://doi.org/10.1186/1743-8454-5-10>
- Johnston, M., Zakharov, A., Koh, L., y Armstrong, D. (2005). Subarachnoid injection of Microfil reveals connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatics in the non-human primate. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 31(6), 632-640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2005.00679.x>
- Kayalioglu, G. (2009a). The Spinal Nerves. In C. Watson, G. Paxinos, y G. Kayalioglu (Eds.), *The Spinal Cord* (pp. 37-56). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374247-6.50008-0>
- Kayalioglu, G. (2009b). The Vertebral Column and Spinal Meninges. In C. Watson, G. Paxinos, y G. Kayalioglu (Eds.), *The Spinal Cord* (pp. 17-36). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374247-6.50007-9>
- Keskin, E., Aydın, H., Kalaycı, M., Işık, E., Özgen, U., Şimşek, K., Baklacı, D., y Gökçe, M. (2021). The histopathological effects of reabsorbable polyethylene glycol hydrogel (Coseal) on epidural fibrosis in an experimental postlaminectomy model in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 51(3), 1512-1520. <https://doi.org/10.3906/sag-2009-241>
- Kido, D., Gomez, D., Pavese, A., y Potts, D. (1976). Human spinal arachnoid villi and granulations. *Neuroradiology*, 11(5), 221-228. <https://doi.org/10.1007/bf00328377>
- Kjell, J., y Olson, L. (2016). Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. *Disease Models & Mechanisms*, 9(10), 1125-1137. <https://doi.org/10.1242/dmm.025833>
- Kuhlman, J., Collins, J., Brooks, G., Yandow, D., y Broderick, L. (2006). Dual-Energy Subtraction Chest Radiography: What to Look for beyond Calcified Nodules. *RadioGraphics*, 26(1), 79-92. <https://doi.org/10.1148/rg.261055034>
- Kumar, V., Umair, Z., Kumar, S., Goutam, R., Park, S., y Kim, J. (2021). The regulatory roles of motile cilia in CSF circulation and hydrocephalus. *Fluids and Barriers CNS*, 18(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12987-021-00265-0>

- Kwon, B., Curt, A., Belanger, L., Bernardo, A., Chan, D., Markez, J., Gorelik, S., Slobogean, G., Umedaly, H., Giffin, M., Nikolakis, M., Street, J., Boyd, M., Paquette, S., Fisher, C., y Dvorak, M. (2009). Intrathecal pressure monitoring and cerebrospinal fluid drainage in acute spinal cord injury: a prospective randomized trial. *Journal of Neurosurgery: Spine SPI*, 10(3), 181-193. <https://doi.org/10.3171/2008.10.Spine08217>
- La Noce, A., Bertani, F., Lorusso, V., Luzzani, F., Tirone, P., y de Haen, C. (1994). Preclinical safety assessment of iomeprol for injection as contrast medium for myelography. *European Journal of Radiology*, 18 Suppl 1, S43-50. [https://doi.org/10.1016/0720-048x\(94\)90093-0](https://doi.org/10.1016/0720-048x(94)90093-0)
- Lee, D., y Lee, J. (2013). Animal models of axon regeneration after spinal cord injury. *Neuroscience bulletin*, 29(4), 436-444. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1365-4>
- Lewin, J., Isaacs, P., Vance, V., y Larke, F. (2003). Dual-Energy Contrast-enhanced Digital Subtraction Mammography: Feasibility. *Radiology*, 229(1), 261-268. <https://doi.org/10.1148/radiol.2291021276>
- Li, F., Engelmann, R., Doi, K., y MacMahon, H. (2008). Improved Detection of Small Lung Cancers with Dual-Energy Subtraction Chest Radiography. *American Journal of Roentgenology*, 190(4), 886-891. <https://doi.org/10.2214/AJR.07.2875>
- Li, X., Anton, N., Zuber, G., y Vandamme, T. (2014). Contrast agents for preclinical targeted X-ray imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 76, 116-133. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.07.013>
- Liem, T., y Vogt, R. (2012). Membranous structures within the cranial bowl and intraspinal space. In R. Schleip, T. Findley, L. Chaitow, y P. Huijing (Eds.), *Fascia: The Tensional Network of the Human Body* (pp. 57-65). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3425-1.00043-X>
- Lloyd, R., Butler, J., Gandevia, S., Ball, I., Toson, B., Stoodley, M., y Bilston, L. (2020). Respiratory cerebrospinal fluid flow is driven by the thoracic and lumbar spinal pressures. *The Journal of Physiology*, 598(24), 5789-5805. <https://doi.org/10.1113/jp279458>
- Mahesh, M. (2013). *The Essential Physics of Medical Imaging* (Vol. 40). <https://doi.org/10.1118/1.4811156>

- Maiuri, F., Gangemi, M., y Gambardella, A. (1990). Anatomical and radiological variations of the lumbar dural sac and nerve root sheaths. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 92(3), 203-213. [https://doi.org/10.1016/0303-8467\(90\)90022-w](https://doi.org/10.1016/0303-8467(90)90022-w)
- Mason, W., Yeh, S., y DeAngelis, L. (1998). 111Indium-diethylenetriamine pentaacetic acid cerebrospinal fluid flow studies predict distribution of intrathecally administered chemotherapy and outcome in patients with leptomeningeal metastases. *Neurology*, 50(2), 438-444. <https://doi.org/10.1212/wnl.50.2.438>
- Masterman, E., y Ahmed, Z. (2021). Experimental Treatments for Oedema in Spinal Cord Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cells*, 10(10), 2682. <https://doi.org/10.3390/cells10102682>
- Matsumae, M., Sato, O., Hirayama, A., Hayashi, N., Takizawa, K., Atsumi, H., y Sorimachi, T. (2016). Research into the Physiology of Cerebrospinal Fluid Reaches a New Horizon: Intimate Exchange between Cerebrospinal Fluid and Interstitial Fluid May Contribute to Maintenance of Homeostasis in the Central Nervous System. *Neurologia Medico-chirurgica*, 56(7), 416-441. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2016-0020>
- Matsuura, H., Ohnishi, M., Yoshioka, Y., Togami, Y., Hosomi, S., Umemura, Y., Ebihara, T., Shimizu, K., Ogura, H., y Shimazu, T. (2021). Original experimental rat model of blast-induced mild traumatic brain injury: a pilot study. *Brain Injury*, 35(3), 368-381. <https://doi.org/10.1080/02699052.2020.1861653>
- Mawe, G., Bresnahan, J., y Beattie, M. (1984). Primary afferent projections from dorsal and ventral roots to autonomic preganglionic neurons in the cat sacral spinal cord: light and electron microscopic observations. *Brain Research*, 290(1), 152-157. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90746-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90746-7)
- MaxMauer, U., Danz, B., Gottschalk, A., y Kunz, U. (2011). Endoscope-Assisted Surgery of Spinal Intradural Adhesions in the Presence of Cerebrospinal Fluid Flow Obstruction. *Spine*, 36(12), E773-E779. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181fb8698>
- Meyer, B., Hirschler, L., Lee, S., Kurpad, S., Warnking, J., Barbier, E., y Budde, M. (2021). Optimized cervical spinal cord perfusion MRI after traumatic injury in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 41(8), 2010-2025. <https://doi.org/10.1177/0271678x20982396>
- Mollanji, R., Bozanovic-Sosic, R., Zakharov, A., Makarian, L., y Johnston, M. (2002). Blocking cerebrospinal fluid absorption through the cribriform plate increases resting intracranial pressure. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and*

- Moore, K. (2013). *Anatomía con orientación clínica* (L. W. Wilkins, Ed. 7 ed.).
- Nagesh, C., Devaraj, R., Joshi, G., Shafi, P., Krishna, K., y Satischandra, P. (2021). The importance of repeat digital subtraction myelography in the diagnosis of cryptogenic CSF-venous fistula causing spontaneous intracranial hypotension. *Interventional Neuroradiology*, 27(5), 727-732. <https://doi.org/10.1177/1591019921991398>
- Nakae, A., Nakai, K., Yano, K., Hosokawa, K., Shibata, M., y Mashimo, T. (2011). The animal model of spinal cord injury as an experimental pain model. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 939023. <https://doi.org/10.1155/2011/939023>
- Newell, R. (1999). The spinal epidural space. *Clinical Anatomy*, 12(5), 375-379. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2353\(1999\)12:5%3C375::AID-CA7%3E3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2353(1999)12:5%3C375::AID-CA7%3E3.0.CO;2-6)
- Nicholas, D., y Weller, R. (1988). The fine anatomy of the human spinal meninges. A light and scanning electron microscopy study. *Journal of Neurosurgery*, 69(2), 276-282. <https://doi.org/10.3171/jns.1988.69.2.0276>
- Nolan, R. (1969). Traumatic oedema of the spinal cord. *British Medical Journal*, 1, 710. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5645.710>
- Noo, F., Clackdoyle, R., Mennessier, C., White, T., y Roney, T. (2000). Analytic method based on identification of ellipse parameters for scanner calibration in cone-beam tomography. *Physics in Medicine and Biology*, 45(11), 3489-3508. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/45/11/327>
- Ourselin, S., Roche, A., Subsol, G., Pennec, X., y Ayache, N. (2000). Reconstructing a 3D structure from serial histological sections. *Image and Vision Computing*, 19(1), 25-31. [https://doi.org/10.1016/S0262-8856\(00\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S0262-8856(00)00052-4)
- Oyinbo, C. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 71(2), 281-299.
- Paterniti, I., Genovese, T., Crisafulli, C., Mazzon, E., Di Paola, R., Galuppo, M., Bramanti, P., y Cuzzocrea, S. (2009). Treatment with green tea extract attenuates secondary inflammatory response in an experimental model of spinal cord trauma. *Naunyn-*

Schmiedeberg's archives of pharmacology, 380, 179-192.
<https://doi.org/10.1007/s00210-009-0414-z>

Peng, H., y Conermann, T. (2021). Arachnoiditis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555973/>

Pollay, M. (2010). The function and structure of the cerebrospinal fluid outflow system. *Cerebrospinal Fluid Research*, 7(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1743-8454-7-9>

Price, D., y Ortiz, A. (2017). Myelography: From Lipid-Based to Gadolinium-Based Contrast Agents. *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America*, 25(4), 713-724.
<https://doi.org/10.1016/j.mric.2017.06.005>

Proulx, S. (2021). Cerebrospinal fluid outflow: a review of the historical and contemporary evidence for arachnoid villi, perineural routes, and dural lymphatics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, 2429-2457. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03706-5>

Reina, M., Prats-Galino, A., Sola, R., Puigdellívol-Sánchez, A., Arriazu Navarro, R., y De Andrés, J. (2010). Morfología de la lámina aracnoidea espinal humana. Barrera que limita la permeabilidad del saco dural. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación*, 57(8), 486-492. [https://doi.org/10.1016/S0034-9356\(10\)70709-X](https://doi.org/10.1016/S0034-9356(10)70709-X)

Reulen, H. (1976). Vasogenic brain oedema. New aspects in its formation, resolution and therapy. *British Journal of Anaesthesia*, 48(8), 741-752.
<https://doi.org/10.1093/bja/48.8.741>

Reyes-Alva, H., Franco-Bourland, R., Martínez-Cruz, A., Grijalva, I., Madrazo, I., y Guízar-Sahagún, G. (2013). Spatial and temporal morphological changes in the subarachnoid space after graded spinal cord contusion in the rat. *Journal of Neurotrauma*, 30(12), 1084-1091. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2764>

Reyes-Alva, H., Franco-Bourland, R., Martínez-Cruz, A., Grijalva, I., Madrazo, I., y Guízar-Sahagún, G. (2014). Characterization of spinal subarachnoid bleeding associated to graded traumatic spinal cord injury in the rat. *Spinal Cord*, 52, S14.
<https://doi.org/10.1038/sc.2014.93>

Sakka, L., Coll, G., y Chazal, J. (2011). Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, 128(6), 309-316. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2011.03.002>

- Schambach, S., Bag, S., Schilling, L., Groden, C., y Brockmann, M. (2010). Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods*, 50(1), 2-13. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.08.007>
- Sekhon, L., y Fehlings, M. (2001). Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, 26(24S), S2-12. <https://doi.org/10.1097/00007632-200112151-00002>
- Sharma, H. (2005). Pathophysiology of blood-spinal cord barrier in traumatic injury and repair. *Current Pharmaceutical Design*, 11(11), 1353-1389. <https://doi.org/10.2174/1381612053507837>
- Sharma, H., y Olsson, Y. (1990). Edema formation and cellular alterations following spinal cord injury in the rat and their modification with p-chlorophenylalanine. *Acta Neuropathologica*, 79, 604-610. <https://doi.org/10.1007/bf00294237>
- Simmonds, W. (1953). The absorption of labelled erythrocytes from the subarachnoid space in rabbits. *The Australian journal of experimental biology and medical science*, 31(1), 77-83. <https://doi.org/10.1038/icb.1953.10>
- Steer, J., y Horney, F. (1968). Evidence for passage of cerebrospinal fluid among spinal nerves. *The Canadian Medical Association Journal*, 98(2), 71-74.
- Suárez, I., y Schulte-Merker, S. (2021). Cells with Many Talents: Lymphatic Endothelial Cells in the Brain Meninges. *Cells*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/cells10040799>
- Takahashi, K., y Ninomiya, T. (1987). Morphological changes of dorsal root ganglion cells in the process-forming period. *Progress in Neurobiology*, 29(4), 393-410. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(87\)90020-7](https://doi.org/10.1016/0301-0082(87)90020-7)
- Tang, G., y Yang, G. (2016). Aquaporin-4: A Potential Therapeutic Target for Cerebral Edema. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1413. <https://doi.org/10.3390/ijms17101413>
- Tator, C., y Koyanagi, I. (1997). Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*, 86(3), 483-492. <https://doi.org/10.3171/jns.1997.86.3.0483>
- Tortora, C., y Derrickson, B. (2018). Principios de Anatomía y Fisiología. *Médica Panamericana*.

- Tubbs, R., Salter, G., Grabb, P., y Oakes, W. (2001). The denticulate ligament: anatomy and functional significance. *Journal of Neurosurgery*, 94(2 S), 271-275. <https://doi.org/10.3171/spi.2001.94.2.0271>
- van Aarle, W., Palenstijn, W., Cant, J., Janssens, E., Bleichrodt, F., Dabravolski, A., De Beenhouwer, J., Joost Batenburg, K., y Sijbers, J. (2016). Fast and flexible X-ray tomography using the ASTRA toolbox. *Optic Express*, 24(22), 25129-25147. <https://doi.org/10.1364/oe.24.025129>
- van Aarle, W., Palenstijn, W., De Beenhouwer, J., Altantzis, T., Bals, S., Batenburg, K., y Sijbers, J. (2015). The ASTRA Toolbox: A platform for advanced algorithm development in electron tomography. *Ultramicroscopy*, 157, 35-47. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2015.05.002>
- Vandenabeele, F., Creemers, J., y Lambrichts, I. (1996). Ultrastructure of the human spinal arachnoid mater and dura mater. *Journal of anatomy*, 189, 417-430.
- Veening, J., y Barendregt, H. (2010). The regulation of brain states by neuroactive substances distributed via the cerebrospinal fluid; a review. *Cerebrospinal Fluid Research*, 7, 1. <https://doi.org/10.1186/1743-8454-7-1>
- Vigh, B., Manzano, M., Frank, C., Vincze, C., Czirok, S., Szabo, A., Lukats, A., y Szel, A. (2004). The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histology and Histopathology*, 19(2), 607-628. <https://doi.org/10.14670/hh-19.607>
- Watson, C., y Kayalioglu, G. (2008). The Organization of the Spinal Cord. In A. C. a. D. R. Foundation (Ed.), *The Spinal Cord* (1st ed.). Elsevier.
- Waxman, S. (2011). *Neuroanatomía Clínica* (McGraw-Hill, Ed. 26 ed.).
- Welch, K., y Friedman, V. (1960). The cerebrospinal fluid valves. *Brain*, 83(3), 454-469. <https://doi.org/10.1093/brain/83.3.454>
- Weller, R. (2005). Microscopic morphology and histology of the human meninges. *Morphologie*, 89(284), 22-34. [https://doi.org/10.1016/s1286-0115\(05\)83235-7](https://doi.org/10.1016/s1286-0115(05)83235-7)
- Wiltse, L. (2000). Anatomy of the extradural compartments of the lumbar spinal canal. Peridural membrane and circumneural sheath. *Radiologic Clinics of North America*, 38(6), 1177-1206. [https://doi.org/10.1016/s0033-8389\(08\)70003-4](https://doi.org/10.1016/s0033-8389(08)70003-4)

- Yang, Y., Pang, M., Du, C., Liu, Z., Chen, Z., Wang, N., Zhang, L., Chen, Y., Mo, J., Dong, J., Xie, P., Wang, Q., Liu, B., y Rong, L. (2021). Repeated subarachnoid administrations of allogeneic human umbilical cord mesenchymal stem cells for spinal cord injury: a phase 1/2 pilot study. *Cytotherapy*, 23(1), 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.09.012>
- Yao, C., Cao, X., y Yu, B. (2021). Revascularization After Traumatic Spinal Cord Injury [Review]. *Frontiers in Physiology*, 12(570). <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.631500>
- Yoshizawa, H. (2002). Presidential address: pathomechanism of myelopathy and radiculopathy from the viewpoint of blood flow and cerebrospinal fluid flow including a short historical review. *Spine*, 27(12), 1255-1263. <https://doi.org/10.1097/00007632-200206150-00004>
- Zakharov, A., Papaiconomou, C., Djenic, J., Midha, R., y Johnston, M. (2003). Lymphatic cerebrospinal fluid absorption pathways in neonatal sheep revealed by subarachnoid injection of Microfil. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 29(6), 563-573. <https://doi.org/10.1046/j.0305-1846.2003.00508.x>
- Zambrano-Rodríguez, P., Bolaños-Puchet, S., Reyes-Alva, H., de Los Santos, R., Martínez-Cruz, A., Guízar-Sahagún, G., y Medina, L. (2021). High-resolution Micro-CT Myelography to Assess Spinal Subarachnoid Space Changes After Spinal Cord Injury in Rats. *Journal of neuroimaging*, 31(1), 79-89. <https://doi.org/10.1111/jon.12813>
- Zambrano-Rodríguez, P., Bolaños-Puchet, S., Reyes-Alva, H., García-Orozco, L., Romero-Piña, M., Martínez-Cruz, A., Guízar-Sahagún, G., y Medina, L. (2019). Micro-CT myelography using contrast-enhanced digital subtraction: feasibility and initial results in healthy rats. *Neuroradiology*, 61(3), 323-330. <https://doi.org/10.1007/s00234-019-02162-8>
- Zappaterra, M., y Lehtinen, M. (2012). The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 2863-2878. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0957-x>
- Zenzes, M., y Zaslansky, P. (2021). Micro-CT data of early physiological cancellous bone formation in the lumbar spine of female C57BL/6 mice. *Scientific Data*, 8(1), 132. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-00913-y>
- Zhang, Y., Al Mamun, A., Yuan, Y., Lu, Q., Xiong, J., Yang, S., Wu, C., Wu, Y., y Wang, J. (2021). Acute spinal cord injury: Pathophysiology and pharmacological

intervention (Review). *Molecular Medicine Reports*, 23(6), 417.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12056>

Zhang, Z., Krebs, C., y Guth, L. (1997). Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. *Experimental Neurology*, 143(1), 141-152. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.6355>