

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Estudio de la morfometría cerebral mediante mapas de fracción anisotrópica obtenidos con Imagenología por Resonancia Magnética en pacientes amputados de un miembro pélvico

Tesis que para obtener el grado de Doctorado en Ciencias Biomédicas
presenta

SARAEAL ALCAUTER SOLÓRZANO

Tutor:

Dr. Fernando A. Barrios Alvarez

Investigador Titular B, INB-UNAM Juriquilla

Comité tutorial:

Dr. Jorge A. Larriva Sahd

Investigador Titular C, INB-UNAM Juriquilla

Dr. Juan Fernández Ruiz

Profesor Titular B, Facultad de Medicina



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Resumen

Después de una amputación, ocurren varios cambios en la fisiología del paciente. Se ha observado, por ejemplo, una expansión de la representación cortical adyacente de las partes intactas del cuerpo hacia la región cortical cerebral de la parte o miembro amputado, principalmente en las cortezas somatosensoriales y motoras. Sin embargo, poco se han estudiado los cambios estructurales en cerebro debido a la pérdida de aferencias y eferencias tras la amputación. Se ha mostrado recientemente usando técnicas de neuroimagen cuantitativa en pacientes amputados, la disminución de sustancia gris en el núcleo ventral posterolateral del tálamo y la disminución de sustancia gris en la corteza somatosensorial primaria en pacientes con deafferentación del nervio mediano, como resultado de la degeneración transneuronal en las vías aferentes. Los cambios estructurales en las vías somatomotoras sólo han sido demostrados en el caso de lesiones medulares, ya sea controladas o por accidente, tanto en humanos como en monos.

La imagen por tensor de difusión, es una técnica de imagen por resonancia magnética que permite obtener información de la difusión del agua en el tejido cerebral, donde se pueden identificar patrones de difusión (difusión isotrópica o anisotrópica) de acuerdo a la estructura del tejido mismo. En particular, en la sustancia blanca se obtienen patrones de difusión anisotrópica debido a que la membrana axonal así como la mielina, proporcionan una barrera a la difusión en la dirección perpendicular al trayecto de los tractos nerviosos. De esta forma, una alteración en la integridad de la sustancia blanca, como un proceso desmielinizante, o la atrofia misma, llevan a una disminución en la anisotropía de la difusión, debido a los cambios en su difusión a lo largo de las fibras o de forma transversal a ellas. El objetivo de este proyecto es estudiar, la fracción de an-

isotropía, y los coeficientes aparentes de difusión transversal y longitudinal, obtenidos mediante la imagen por tensor de difusión, los cambios ocurridos en sustancia blanca en cerebro como consecuencia de la amputación de un miembro pélvico.

Los resultados muestran una disminución en la anisotropía de la difusión en vías aferentes y eferentes relacionadas con los sistemas somatosensorial y somatomotor asociados al miembro amputado, pero también en áreas de integración de información multisensorial como la ínsula, lóbulo temporal y occipital. Los cambios en las propiedades de difusión parecen estar dominados por el coeficiente aparente de difusión transversal a las fibras, lo que sugiere una alteración en la integridad de la mielina.

Índice general

1. Antecedentes	2
1.1. Cambios estructurales en cerebro en primates no humanos con lesión de vías aferentes.	2
1.2. Diferencias entre deaferentación central y periférica.	6
1.3. Alteraciones estructurales a nivel central en humanos con lesiones medulares.	9
1.4. Evidencia <i>in vivo</i> de cambios estructurales en cerebro posterior a la lesión de vías aferentes y eferentes a partir de estudios de neuroimagen.	10
1.5. Imagen por tensor de difusión en el estudio de la integridad de la sustancia blanca cerebral.	14
1.5.1. Difusión	16
1.5.2. Movimiento Browniano y la ecuación de Einstein	16
1.5.3. Codificando la señal de Resonancia Magnética para inferir la Difusión	17
1.5.4. Modelo Básico y Cuantificación de la Difusión	18
1.5.5. Influencia de la Estructura Anisotrópica en la RM pesada a Difusión	19
1.5.6. Tensor de Difusión	20
1.5.7. Fracción Anisotrópica	21
1.6. Bases Biológicas de la Difusión Anisotrópica	23

1.6.1. Relación de la difusión anisotrópica del agua con la microestructura del tejido en sustancia blanca.	23
1.7. Métodos de análisis de los mapas de fracción anisotrópica y propiedades de difusión.	29
1.7.1. Métodos de corrección.	30
1.7.2. Análisis estilo VBM.	31
1.7.3. Análisis mediante TBSS.	33
1.7.4. Morfometría basada en voxel (VBM) en el estudio de la sustancia gris.	35
2. Sujetos y métodos	39
2.1. Planteamiento del problema.	39
2.2. Objetivos generales.	40
2.3. Objetivos particulares.	40
2.4. Hipótesis.	40
2.5. Criterios de inclusión.	41
2.6. Criterios de exclusión.	41
2.7. Criterios de eliminación (ambos grupos).	42
2.8. Sujetos.	42
2.9. Adquisición de Imagen.	44
2.10. Procesamiento de imágenes.	44
2.10.1. Sustancia Blanca.	44
2.10.2. Sustancia Gris.	45
2.11. Validación de la Metodología Propuesta.	46
2.11.1. Ataxia Espinocerebelar Tipo 7.	47
2.11.2. Sujetos.	48
2.11.3. Resultados.	49
2.11.4. Discusión.	53
2.11.5. Conclusión.	54

3. Resultados	56
3.1. Propiedades de difusión.	57
3.2. Sustancia Gris.	65
3.3. Correlaciones.	66
4. Discusión y conclusiones.	68
4.1. Conclusiones.	73
Bibliografía	73

Capítulo 1

Antecedentes

Cuando se da una amputación, como resultado de ella ocurren varios cambios en la fisiología del paciente, desde cambios cardiovasculares hasta cambios funcionales en el sistema nervioso central y, por supuesto, cambios emocionales muy profundos. Algunos estudios recientes han abordado la búsqueda de cambios estructurales a nivel del sistema nervioso central como resultado a la amputación de algún miembro [Jones y Pons, 1998; Woods *et al.*, 2000; Graziano y Jones, 2009]. En dichos trabajos se analizan las diferencias entre el caso de lesiones controladas a nivel central en modelos experimentales en comparación a la amputación de un miembro y otros procesos fisiológicos. En humanos, algunos de estos estudios reportan investigación *in vivo* de cambios estructurales en amputados y de algunos casos de lesiones en médula espinal que han sido realizados utilizando métodos actuales de neuroimagen.

1.1. Cambios estructurales en cerebro en primates no humanos con lesión de vías aferentes.

Pons y sus colaboradores [Pons *et al.*, 1991] estudiaron los núcleos somatosensoriales del tálamo en 8 macacos que presentaban expansiones masivas en la representación

cortical de la cara ocurrida tras 12 o más años de haber sufrido deaferentación de un miembro superior. Se hizo evidente mediante técnicas histológicas, la atrofia transneuronal en el núcleo cuneiforme del tallo cerebral y en el núcleo ventral posterolateral del tálamo [Jones y Pons, 1998]. En todos los casos encontraron una reorganización significativa en el mapa corporal representado en el tálamo en particular en las representaciones de la cara y el tronco. En todos los monos, el fascículo cuneiforme de la médula espinal, que normalmente contiene axones de las células ganglionares dorsales del miembro superior, prácticamente había desaparecido como resultado de la degeneración de los axones de las células ganglionares dorsales desde el segmento C2 a T4. Lo cual se asoció con una disminución del volumen en el núcleo cuneiforme de un 30 a 45 %, donde estos axones normalmente hacen sinapsis, resultado de una atrofia transneuronal primaria de las células deaferentadas.

La degeneración transneuronal subsecuente a la deaferentación es un fenómeno ampliamente reconocido en ciertas regiones del sistema nervioso central [Shibuya *et al.*, 1993; Payne *et al.*, 1984; Page *et al.*, 1993]. El ejemplo clásico de la degeneración primaria transneuronal es el que ocurre en el sistema visual, donde las células del núcleo geniculado lateral del tálamo sufren una atrofia significativa tras la remoción de un ojo [Matthews *et al.*, 1960]. En los monos se ha visto que las células comienzan a encogerse después de los 7 días del procedimiento, y al año tienen el 50 % de su tamaño original [M R Matthews, 1964]. La muerte de las células sin embargo, ocurre hasta después de varios años [Goldby, 1957].

En un estudio del sistema somatosensorial, [Loewy, 1973], trabajando con cerebros de humanos y monos que sufrieron transección de la columna dorsal o de la médula espinal, reportó encogimiento de núcleo gracilis con disminución del tamaño de las células de un 25 %, pero sin pérdida de células aún después de 22 años.

En el estudio de los monos que sufrieron deaferentación de un miembro superior

por largo tiempo antes de ser estudiados, se encontró infiltración de células neurogliales en el núcleo cuneiforme encogido, indicando la presencia de un proceso degenerativo activo, pero de forma similar al estudio de Loewy, hubo muy poca pérdida de neuronas [Jones y Pons, 1998; Woods *et al.*, 2000]. Los resultados indicaron una sobrevivencia del 85 al 95 % de las neuronas en el núcleo cuneiforme aún 20 años después de la lesión [Woods *et al.*, 2000]. Sin embargo, todas las neuronas presentaron disminución de tamaño de un 12 a 29 % a los 12 años y de 45 % después de 20 años, en comparación con las neuronas del lado opuesto. La densidad de las células se incrementó debido a la pérdida de la neuropila que resultó de la muerte de los axones aferentes. El núcleo cuneiforme externo, que también recibe aferentes del miembro superior pero proyecta hacia el cerebelo, también mostró gliosis y evidencia de atrofia neuronal progresiva, la pérdida de neuronas no fue mayor al 10 %.

Las células del núcleo cuneiforme normalmente proyectan sus axones al núcleo talámico Ventral Posterior contralateral, que representa el miembro superior y parte superior del tronco. En estas células se encontraron cambios indicativos de atrofia transneuronal. La atrofia transneuronal secundaria en el núcleo ventral posterior lateral (VPL) contralateral al núcleo cuneiforme, deaferentado por rizotomías dorsales, estaba caracterizada por un encogimiento de 30 a 40 % en el área de representación del miembro superior y tronco superior (Figura 1.1). Lo cual estaba asociado con una severa deformación de todo el complejo ventral posterior, siendo mayor en el animal deaferentado por más tiempo (20 años), indicando que se trata de un proceso progresivo. La mayoría de la estructura de sustancia blanca que divide al complejo había desaparecido (Figura 1.1) debido al retroceso de los axones de las células atrofiadas en el núcleo cuneiforme. Las células que pertenecían a la mitad posterior o más del núcleo ventral posterior medial (VPM) se desplazaron hacia la parte reducida de la representación del miembro superior en el VPL.

REPRESENTACION DEL NUCLEO TALAMICO VENTRAL POSTERIOR EN EL MONO

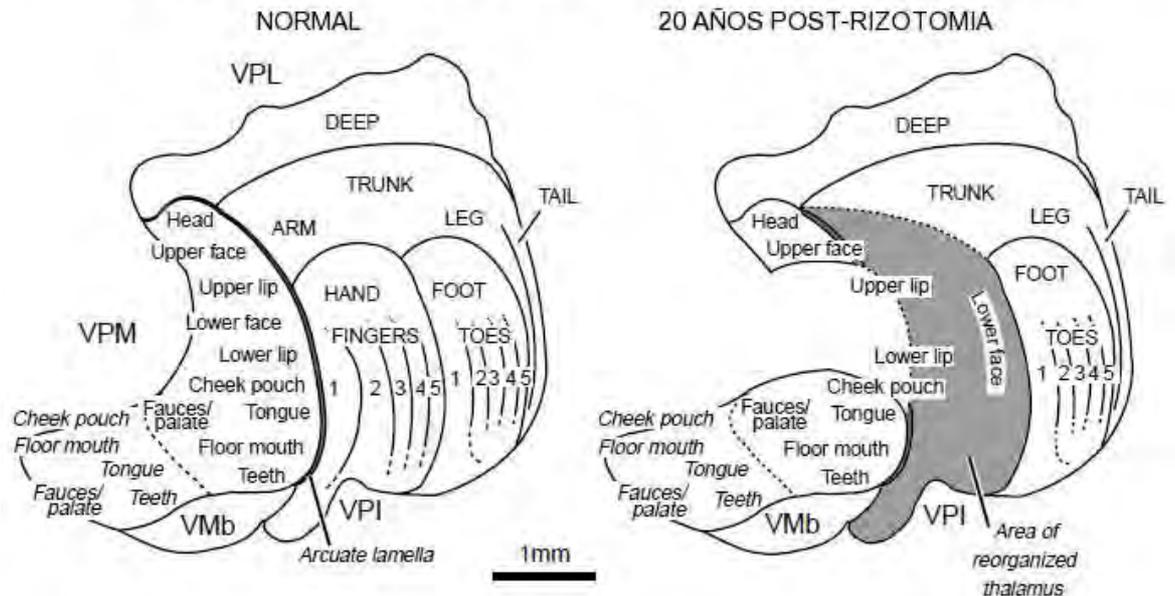


Figura 1.1: Izquierda, representación del cuerpo en una sección frontal del complejo ventral posterior del tálamo en un macaco sin afectación de las vías neuronales aferentes. Derecha, representación de la región que sufrió reorganización funcional y estructural en un mono macaco que sufrió el corte de las raíces dorsales entre C2 y T4, 20 años previos al estudio, se observa expansión de la región inferior del rostro. Abreviaciones, VPL, núcleo ventral posterior lateral; VMb, núcleo ventral medial basal; VPI, núcleo ventral posterior inferior. Tomado de [Jones, 2000].

La región del tálamo posteromedial al núcleo VP encogido se encontró invadido de pequeñas células identificadas por estar densamente inmunoteñidas para la proteína ligada al calcio, calbindin, y ligeramente teñida por histoquímica para la enzima metabólica, citocromo oxidasa, avanzando de forma anterógrada desde el núcleo talámico posterior [Rausell *et al.*, 1992b]. Esta región posterior de células inmunoreactivas a calbindin contiene las concentraciones más densas de terminales de axones espino-talámicos y del trigémino espinal [Rausell *et al.*, 1992a]. La experiencia neuroquirúrgica en humanos indica que una parte del tálamo es aquella involucrada únicamente con la transmisión del dolor central [Lenz *et al.*, 1993]. En la parte afectada del VPL, en los monos deafferentados se encontró menor inmunoteñido para receptores $GABA_A$ y mayor inmunoteñido para calbindin [Rausell *et al.*, 1992b]. La expresión de estas

proteínas generalmente ocurre de manera posterior a la actividad neuronal, de modo que las alteraciones encontradas sugieren una modificación del patrón normal de innervación en la región talámica reorganizada, que a su vez, puede llevar a sensaciones dolorosas y anormales referidas a la región denervada. Estas son las clases de sensaciones comúnmente experimentadas por pacientes amputados y pacientes con lesiones medulares (espinales). Los monos estudiados presentaron comportamientos que sugieren sensaciones anormales del miembro deaferentado [Jones y Pons, 1998].

1.2. Diferencias entre deaferentación central y periférica.

La desconexión de una parte de la representación cortical somatosensorial de sus fuentes de aferencias sensitivas al seccionar las raíces dorsales de la médula espinal o al seccionar las columnas dorsales mismas, es claramente diferente a seccionar nervios periféricos, ya sea directamente o debido a la amputación de un miembro. En el último caso, se lesionan los axones periféricos de las raíces ganglionares dorsales, los cuales, a diferencia de los axones centrales, comúnmente mueren cuando son cortados y tienen capacidad de regeneración. La preservación de las raíces ganglionares dorsales afectadas asegura que sus axones centrales en las columnas dorsales permanezcan intactos. Al rededor del 70 al 80 % de las raíces ganglionares dorsales normalmente sobreviven al seccionamiento de los nervios periféricos a menos que el corte ocurra cercano al ganglio y por tanto deprive a las células nerviosas de una parte significativa de sus axones [Lekan *et al.*, 1997]. Las células ganglionares también pueden sobrevivir la pérdida de sus receptores en la piel y el músculo, como ocurre en una amputación, al hacer conexiones con regiones adyacentes. [Wall *et al.*, 1988], al examinar la relación entre el grado de degeneración de las células ganglionares dorsales y la plasticidad cortical en ratas adultas, encontraron que la reorganización de la representación cortical de la piel

de la pata trasera ocurrida entre los 6 y 101 días posteriores a seccionar el nervio ciático, presumiblemente con una modesta pérdida celular en los ganglios de L4 y L5, era idéntica a aquélla encontrada tras la muerte de varias células en los mismos ganglios debido al uso de una neurotoxina transportada de forma retrógrada. Esto sugiere que en animales adultos, seccionar nervios periféricos y rizotomías deberían tener efectos similares en la corteza sensitiva, al menos en plazos de tiempo cortos e intermedios.

Deaferentaciones periféricas de gran escala, por ejemplo, cortando todos los nervios de un miembro, estarán acompañados generalmente por una pérdida considerable de células ganglionares. Bajo estas circunstancias, describieron en gatos en los que seccionaron los tractos mayores del miembro anterior, atrofia transneuronal sin pérdida de células, comenzando en el núcleo cuneiforme dentro de las primeras 4 a 5 semanas y siendo mayor después de las 20 a 36 semanas.

En términos de plasticidad cortical, el grado en que la amputación o sección de nervios periféricos asemeja los efectos centrales a largo plazo de aquéllos de una rizotomía dorsal, parece depender de que los ganglios dorsales que sobreviven a la pérdida de sus axones periféricos puedan mantener una representación del miembro afectado a nivel central [Jain *et al.*, 1997]. En la ausencia de una pérdida sustancial de células en los ganglios, es poco probable que ocurra degeneración transneuronal en los núcleos de las columnas dorsales o en el tálamo. Bajo estas circunstancias, es probable que el patrón de plasticidad cortical y talámica sea diferente y menos severo que en el caso de una lesión central.

Las amputaciones, especialmente aquellas de un miembro completo o de una parte sustancial de él, tienen más probabilidad de producir cambios semejantes a una deaferentación central porque, en la ausencia de receptores periféricos, muchas de las células ganglionares dorsales sufrirán degeneración retrógrada, llevando a una pérdida secundaria de sus axones centrales y efectos transneuronales similares o idénticos a

aquéllos que ocurren posterior a rizotomías dorsales o sección de las columnas dorsales [Jones, 2000]. Por tanto, es significativo que la amputación de una mano tenga como consecuencia la reorganización cortical de escala comparable con aquella vista posterior a la denervación o rizotomía [Florence y Kaas, 1995]. Es complicado interpretar los cambios en el mapa cortical tras las amputaciones, debido a la presencia de neuromas en la región del muñón. Estos intentos de regeneración en la parte de los axones periféricos puede servir para proteger las células de la degeneración [Jones, 2000]. Se cree que están involucrados en las sensaciones asociadas al fenómeno del miembro fantasma.

Estudiando ratas en las que se ha seccionado el nervio ciático, [Coggeshall *et al.*, 1997], no encontraron un efecto inmediato en el número de axones de las raíces ganglionares dorsales de L4 y L5, lo que sugiere que no hay una pérdida inmediata de células ganglionares. Sin embargo, posterior a 16 semanas, se encontró una pérdida selectiva de más del 50 % de fibras no mielinizadas. Las fibras mielinizadas, cuyas ramificaciones proveen de información proveniente de mecanoreceptores de bajo umbral permanecieron sin afectación. Esto es de gran interés en términos de plasticidad cortical ya que [Calford y Tweedale, 1991a,b,c] observaron en monos y murciélagos frugívoros, que el efecto de silenciar fibras periféricas no mielinizadas mediante la aplicación de una toxina selectiva a fibras C, la capsaicina, o anestesia local, tuvo una influencia profunda e inmediata en la emergencia de campos receptivos nuevos en la corteza somatosensorial, un efecto que se cree debido a la ausencia de los mecanismos inhibitorios centrales de las fibras C. De este modo, la pérdida selectiva de fibras C posterior a la amputación podría permitir la expresión de divergencias de la información aferente de los mecanoreceptores de bajo umbral, en el tallo, tálamo y corteza.

1.3. Alteraciones estructurales a nivel central en humanos con lesiones medulares.

Existe evidencia de que ocurre degeneración Walleriana en los tractos nerviosos de pacientes que sufrieron lesiones de la médula espinal. [Buss *et al.*, 2004], utilizando técnicas inmunohistoquímicas *post mortem*, estudiaron la dinámica de la degeneración Walleriana en la médula espinal de pacientes que murieron 2 días a 30 años después de sufrir lesión traumática de la médula espinal o infarto cerebral. La tinción de neurofilamento mediante técnicas inmunohistoquímicas demostró un patrón espacio-temporal de pérdida axonal en la degeneración descendente de los tractos nerviosos que pudo ser detectada cerca de la lesión a partir de los 12 días posteriores al daño, hasta una desaparición prácticamente completa en los pacientes con 1 año o más de sobrevivencia. Se demostró también la deposición a largo plazo de una cicatriz astrocítica densa en los tractos degenerados a partir de los 4 meses posteriores a la lesión. Estos cambios se vieron acompañados de la reducción gradual de la mielina, con una pérdida casi completa a partir de los 3 años posteriores a la lesión. Los autores no encontraron un aumento en la expresión de la molécula condroitín sulfato proteoglicano (CSPG) en los tractos degenerados ya que es un fuerte inhibidor de la regeneración axonal y un componente importante en los tejidos de cicatriz gliótica.

La afirmación si las lesiones medulares producen cambios significativos a nivel central, incluyendo la pérdida neuronal en la corteza motora primaria (M1) es controversial [Wrigley *et al.*, 2009]. Algunos estudios reportan cambios pequeños en el número de neuronas de M1 posterior a la lesión del tracto corticoespinal [Tower, 1940; Lassek, 1942]. Sin embargo, un estudio más reciente, por Wannier y cols (2005) encontró que posterior a la disrupción del tracto corticoespinal unilateral en dos monos macacos, no se encontraron cambios en el número de células piramidales en M1. Sin embargo, los autores reportaron que los somas sobrevivientes en M1 se encogieron significativamente respecto a aquéllos del hemisferio no afectado.

En contraste a estos estudios, otras investigaciones reportan la muerte de neuronas corticoespinales posterior al seccionamiento de la vía piramidal o lesiones de los cordones cervicales [Levin y Beadford, 1938; Pernet y Hepp-Reymond, 1975]. Por ejemplo, [Pernet y Hepp-Reymond, 1975] mostraron que posterior al seccionamiento unilateral de la vía piramidal, se perdieron aproximadamente el 70 % de las células piramidales en la corteza motora contralateral. Estudios recientes en roedores han mostrado que la transección del tracto corticoespinal a nivel torácico da como resultado la muerte programada (apoptosis) de hasta un 40 % de las neuronas corticoespinales [Hains *et al.*, 2003]. Además de la pérdida neuronal en M1, se ha reportado que la lesión de la médula espinal en modelos animales, evoca cambios morfométricos en el sistema motor descendente, incluyendo cambios en la densidad de espinas sinápticas [Kim *et al.*, 2006].

1.4. Evidencia *in vivo* de cambios estructurales en cerebro posterior a la lesión de vías aferentes y eferentes a partir de estudios de neuroimagen.

En un estudio *in vivo* de pacientes que sufrieron lesión de la médula espinal a nivel torácico, los autores reportaron una disminución del volumen de sustancia gris en regiones localizadas en comparación con un grupo control sin lesión [Wrigley *et al.*, 2009]. Estas reducciones fueron evidentes en la región de la corteza motora izquierda que enerva los miembros inferiores, la corteza prefrontal medial izquierda y derecha, la corteza anterior del cíngulo, la corteza temporal anterior izquierda y derecha, el hipotálamo lateral y la corteza insular. No reportaron ninguna región con aumento del volumen de sustancia gris en pacientes en comparación de los controles. En términos de la sustancia blanca, reportaron disminución de la fracción de anisotropía (*FA*) en los pacientes en las regiones inmediatas a las cortezas motora y sensitiva prima-

rias que representan los miembros inferiores y regiones asociadas al trayecto del tracto corticoespinal en ambos hemisferios, como la corona radiada, el brazo posterior de la cápsula interna y la región ventral del puente. También encontraron disminución de la FA en la sustancia blanca próxima a la corteza cerebelar superior, y en regiones de la sustancia blanca próximas a la corteza del cíngulo anterior. No encontraron aumento de la sustancia blanca en los pacientes en comparación a los controles. Sin embargo, no encontraron correlaciones significativas entre los cambios estructurales y la edad de los sujetos, ni con el tiempo ocurrido desde la lesión hasta el estudio de imagen. Los cambios estructurales reportados en este estudio, tanto en sustancia blanca como en sustancia gris posterior, posteriores a la lesión de la médula espinal, podrían ser el resultado tanto de la muerte neuronal o de un encogimiento de las neuronas del tracto corticoespinal. Los cambios reportados en cerebelo son interesantes, pues a diferencia de las cortezas motoras y somatosensoriales primarias que tienen proyecciones directas a la región de la lesión, la mayoría de las proyecciones de la corteza superior del cerebelo son hacia y desde el tallo y la corteza cerebral. Esto podría indicar que ocurren cambios anatómicos secundarios que no resultan directamente de la lesión. Los autores adquirieron imágenes estructurales T1 de alta resolución ($1mm^3$) e imágenes de tensor de difusión, y utilizaron técnicas de análisis morfométrico basadas en voxel (*Voxel-based morphometry, VBM*).

Estudios previos que utilizaron VBM y técnicas de medición a partir de regiones de interés han tenido dificultades en detectar cambios en el volumen de sustancia gris en M1 posterior a la lesión de la médula espinal [Crawley *et al.*, 2004; Jurkiewicz *et al.*, 2006]. Aunque se encontró una pequeña diferencia en el volumen de sustancia gris que no fue suficiente para alcanzar la significancia estadística en el estudio de Crawley, está de acuerdo con los resultados presentados por [Wrigley *et al.*, 2009]. La diferencia en la robustez y significancia de los resultados en M1 mostrados por [Wrigley *et al.*, 2009], se puede deber a la selección de los pacientes, que a diferencia de los otros estudios, incluyeron únicamente a pacientes masculinos, parapléjicos, con lesión completa

de la médula. Sin embargo, [Jurkiewicz *et al.*, 2006] encontraron cambios en la integridad estructural en la corteza somatosensorial primaria, evidenciando una degeneración transneuronal anterógrada. En un estudio reciente, [Freund *et al.*, 2011], encontraron atrofia de la médula, atrofia cortical en las cortezas motora y somatosensorial primarias en 10 pacientes que sufrieron lesión en la médula espinal a nivel cervical que se relacionaron con el grado de discapacidad. Los autores relacionan la atrofia medular a una serie de procesos neurodegenerativos que incluyen degeneración axonal, desmielinización y pérdida neuronal. De forma similar, relacionan la disminución del volumen de sustancia blanca subcortical en el tracto corticoespinal y el volumen de sustancia gris cortical con una degeneración retrógrada [Hains *et al.*, 2003; Beaud *et al.*, 2008], que también podría deberse a una disminución en la conectividad cortical debido a la disminución de la densidad de espinas dendríticas [Kim *et al.*, 2006]. Los cambios en la corteza somatosensorial primaria los relacionan con una actividad celular reducida iniciada por una degeneración transneuronal [Freund *et al.*, 2011].

Recientemente, [Draganski *et al.*, 2006] estudiaron los cambios estructurales de la sustancia gris en 28 pacientes con amputación unilateral de un miembro (brazo o pierna) a partir de imágenes de alta resolución y contraste adquiridas con Resonancia Magnética, utilizando la metodología conocida como morfometría basada en voxel (*VBM*). Esta técnica se basa en la comparación voxel a voxel, de las intensidades de imágenes previamente normalizadas a un espacio común y segmentadas de modo que, únicamente representen la anatomía de la sustancia gris de cada sujeto en el estudio. Un aumento o una disminución en la intensidad del voxel en estas imágenes preprocesadas será interpretado como un aumento o disminución de la densidad de sustancia gris. Encontraron una disminución de la sustancia gris en la región posterolateral del tálamo contralateral al lado de la amputación. Estas diferencias en la sustancia gris tuvieron una correlación positiva con el tiempo transcurrido desde la amputación y parecen revelar una degeneración transneuronal. Dado que no se encontraron diferencias a nivel cortical, los autores suponen que debe haber un equilibrio entre la degeneración transneuronal

y el crecimiento de dendritas que puede ocurrir a nivel cortical [Rausell *et al.*, 1998; Draganski *et al.*, 2006]. Los autores consideran que la resolución de la imagen y el proceso de suavizado que la disminuye, pueden afectar la distinción entre los núcleos del tálamo sensitivos y motores. La mayoría de los participantes amputados de este estudio hacían uso de prótesis mecánicas o prótesis mioeléctrica, lo que contribuiría a que se preserve la función motora eferente.

En un estudio reciente, [Taylor *et al.*, 2009] examinaron los cambios estructurales en sustancia blanca y sustancia gris y su correlación con medidas de recuperación en 14 pacientes con deaferentación completa del nervio mediano y/o ulnar derechos que se sometieron a microcirugía para reparar el daño al menos 1.5 años previos al estudio de imagen. Estudiaron también 14 sujetos control pareados en sexo y edad. Comparado con el lado sano, los nervios afectados y reparados tienen afectaciones en la conducción en las vías aferentes y eferentes, con amplitud disminuida y un aumento en la latencia. Encontraron reducción de sustancia gris en varias regiones cerebrales, incluyendo las cortezas somatosensoriales primaria y secundarias. La disminución de la sustancia gris en el giro postcentral correlacionó de forma negativa con mediciones de la recuperación sensorial (detección mecánica y de vibración), demostrando la relación funcional y estructural. Sin embargo, no reportan cambios en la fracción anisotrópica (propiedad de difusión que refleja integridad estructural de la sustancia blanca) en las vías hacia la corteza S1, únicamente en la sustancia blanca próxima a la ínsula derecha, una región donde también reportaron cambios en la sustancia gris.

1.5. Imagen por tensor de difusión en el estudio de la integridad de la sustancia blanca cerebral.

La imagen por resonancia magnética (RM) se basa en la absorción de energía por los núcleos de hidrógeno y su posterior reemisión cuando éstos están inmersos en un campo magnético externo. Este fenómeno ocurre cuando se cumple la condición de que la energía electromagnética de excitación iguale la frecuencia de precesión de los protones muestreados (determinada por la magnitud del campo magnético externo). De esta forma los movimientos de los protones por diversos fenómenos, entre ellos la difusión, afectará la señal emitida por los protones excitados y es posible estimar en forma cuantitativa algunas propiedades de la difusión, como se explica más adelante. Se hace una revisión de los trabajos que relacionan las propiedades de difusión medidas con RM y la integridad estructural de la sustancia blanca.

La imagen por tensor de difusión es una técnica que nos brinda la oportunidad de cuantificar la difusión de las moléculas de agua en el tejido cerebral. Está basada en el fenómeno de difusión de agua conocido como el movimiento Browniano. Ahora se sabe que el movimiento molecular está afectado por las propiedades del medio en el que ocurre, y que la difusión en los tejidos biológicos refleja la estructura y arquitectura de éstos a nivel microscópico.

La difusión igual o isotrópica ocurre cuando un medio no restringe el movimiento molecular, como debería ser el caso para el líquido cefalorraquídeo, donde una molécula de agua tendría la misma posibilidad de difundirse hacia cualquier dirección. La difusión anisotrópica es aquella que ocurre cuando no es igual en todas direcciones, se puede asociar entonces, una dirección preferencial a la difusión y se puede deber a las propiedades estructurales del medio. La difusión en los tractos de materia blanca del sistema nervioso central, no es igual en todas las direcciones, es anisotrópica, siendo la dirección principal de difusión paralela a los tractos mismos. Tomando ventaja

del hecho de que la difusión no es uniforme en el cerebro, se puede utilizar la imagen por tensor de difusión para evaluar las características microestructurales del tejido. La técnica es especialmente útil en el estudio de los tractos de materia blanca en el cerebro ya que la movilidad del agua está restringida perpendicularmente a los axones que están orientados por los tractos nerviosos (difusión anisotrópica). La mayor contribución a esta restricción de la difusión en ciertas direcciones se debe a la membrana axonal y la mielina [Beaulieu, 2002].

La imagen por tensor de difusión puede ser utilizada para caracterizar la dependencia orientacional de la difusión de las moléculas de agua en un medio. En la materia blanca, la difusión aparente del agua parece ser mayor a través de la dirección de las fibras y más restringida en una dirección perpendicular. La fracción anisotrópica o fracción de anisotropía (FA) provee información acerca de la forma del tensor de difusión en cada voxel. La fracción anisotrópica está basada en la varianza normalizada de los valores principales de los vectores principales de difusión, y permite diferenciar la difusión isotrópica de la anisotrópica. Esta medida refleja la organización direccional del tejido cerebral que está en gran medida influenciada por la magnitud y orientación de los tractos en la sustancia blanca. En paralelo, las mediciones de la fracción anisotrópica pueden servir para sondear la integridad de la organización tisular a un nivel que no es accesible para la resonancia magnética convencional. La fracción anisotrópica es una medida fácil de utilizar porque se estima en valores de 0 (difusión isotrópica) a 1 (difusión anisotrópica). La difusión de las moléculas de agua está principalmente relacionada a barreras estructurales microscópicas que alteran el movimiento aleatorio del agua en un nivel molecular. Debido a que el grado de permeabilidad de las membranas biológicas es pequeño, la principal contribución de la constante de difusión viene de las vías de difusión que se mueven alrededor de las células en vez de aquellas que cruzan las membranas celulares. Los modelos experimentales han revelado que las membranas celulares axonales aportan la mayor parte de la restricción del movimiento del agua en la sustancia blanca. La disrupción patológica de las membranas celulares, pérdida de

mielina, o cualquier proceso que pueda alterar la integridad de los axones, incluso en aquellos casos donde estudios histológicos demuestran la permanencia de los axones, existe un decremento en el valor de fracción anisotrópica [Beaulieu, 2002].

1.5.1. Difusión

La difusión es un proceso natural de transporte que no requiere movimiento de volumen, no debe ser confundido con convección o dispersión, otros mecanismos que sí requieren movimiento de volumen. Es un proceso físico esencial para el funcionamiento de los sistemas vivos. Por ejemplo, el transporte de metabolitos hacia el interior de las células es facilitado por la difusión.

1.5.2. Movimiento Browniano y la ecuación de Einstein

En 1827, Robert Brown estudiaba bajo el microscopio muestras de flora obtenidas en un viaje a Australasia, cuando notó que los granos de polen suspendidos en agua se movían de manera constante describiendo trayectorias aleatorias [Brown, 1828]. Este movimiento no se debe a los granos mismos, sino a las moléculas de agua en las que están suspendidas. De este modo, Brown describió el fenómeno de difusión de las moléculas de agua, que es un movimiento constante y aleatorio debido a la energía térmica que presentan todas las moléculas a temperatura mayor al cero absoluto, cero grados kelvin. Si fuera posible observar una sola molécula de agua, ésta describiría una trayectoria totalmente aleatoria, independientemente de la trayectoria seguida por sus vecinos. Trayectoria descrita como camino aleatorio o “random walk” en inglés.

En 1905 Einstein probó que, para una población de partículas con libertad de difusión, el cuadrado del desplazamiento de las mismas desde su punto de partida, promediado sobre todas las moléculas en la muestra, es directamente proporcional

al tiempo de observación t [Einstein, 1905]. La constante de proporcionalidad es el coeficiente de difusión, y esta relación se escribe en la forma de la ecuación de Einstein como,

$$\langle r^2 \rangle = 6Dt \tag{1.1}$$

siendo una distribución gaussiana con máximo en el desplazamiento cero y teniendo igual probabilidad de que el desplazamiento ocurra en cualquier dirección. Para una muestra de agua a temperatura corporal (37°C), el coeficiente de difusión del agua es $3 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$. Si observamos la muestra por 30ms , las moléculas de agua se habrán desplazado, en promedio, $25 \mu\text{m}$ en todas direcciones.

En términos prácticos, usando la imagen por resonancia magnética, se infiere el coeficiente de difusión a partir de observaciones de los desplazamientos en un tiempo dado. Si las moléculas de agua encuentran barreras en sus trayectorias, el desplazamiento promedio por unidad de tiempo será menor que aquel observado en agua “libre”. Al aplicar la ecuación de Einstein para calcular el coeficiente de difusión, éste será *aparéentemente menor*. Por tanto nos referimos a él como *coeficiente aparente de difusión*, abreviado *CAD* o *ADC* por las siglas en inglés de *apparent diffusion coefficient* [Bihan *et al.*, 1986]. La microestructura del medio afecta claramente al desplazamiento promedio de las moléculas de agua.

1.5.3. Codificando la señal de Resonancia Magnética para inferir la Difusión

Las secuencias de RM se hacen sensibles a la difusión mediante la aplicación de un gradiente de campo magnético, es decir, el campo magnético varía de forma lineal en el volumen de interés. La ecuación de Larmor, la ecuación fundamental en resonancia magnética,

$$\omega = \gamma B \tag{1.2}$$

describe la frecuencia de precesión ω de los spins con constante giromagnética γ (42.5 Mhz/T para hidrógeno) en el campo magnético B . De modo que un gradiente lineal impone una frecuencia de precesión dependiente de la posición. Si se permite que los spins precesen un tiempo dado, su fase de precesión variará. Normalmente esta variación se puede revertir aplicando un gradiente de igual magnitud pero en dirección opuesta, o bien igual magnitud y dirección pero posterior a la aplicación de un pulso de radiofrecuencia de 180° .

Si las moléculas permanecen estacionarias, la ganancia de fase dependiente de la posición será reversible con la aplicación del segundo gradiente. Sin embargo, como se mostró en la descripción del movimiento Browniano, éstas nunca permanecen estacionarias sino que están en movimiento constante. De modo que el campo magnético experimentado por un spin particular cambiará con el tiempo, y el cambio en la fase de precesión dependerá del desplazamiento neto. Debido al proceso de difusión y por tanto al camino aleatorio o “random walk”, existe una distribución de desplazamientos y por tanto una distribución de fases que disminuyen la señal. Mientras mayor sea la difusión (por tanto el coeficiente aparente de difusión) a lo largo de la dirección del gradiente, mayor será la dispersión de la fase de precesión y por tanto mayor la pérdida de señal. De forma contraria, mientras menor sea la difusión en esa dirección menor será la pérdida de señal.

1.5.4. Modelo Básico y Cuantificación de la Difusión

La atenuación de la señal de resonancia magnética debido a la difusión está dada por,

$$S2 = S1 e^{-bADC} \quad (1.3)$$

donde $S1$ y $S2$ son la señal de intensidad medidas con bajo y alto valor b respectivamente, y ADC es el coeficiente de difusión aparente. El valor b resume los parámetros

utilizados en la secuencia sensible a la difusión y está dado por

$$b = \gamma G \delta (\Delta - \delta/3) \quad (1.4)$$

donde γ es la constante giromagnética, G la magnitud del gradiente de campo magnético, δ y Δ son la duración y separación temporal respectivamente de los gradientes aplicados.

En otras palabras, existe una simple relación exponencial entre la señal y el *ADC*. De modo que para cuantificar la difusión en una dirección, se requieren al menos dos mediciones, conociendo la diferencia del valor b entre ambas mediciones se puede despejar y calcular el *ADC* utilizando la ecuación 1.4.

1.5.5. Influencia de la Estructura Anisotrópica en la RM pesada a Difusión

La microestructura afecta las propiedades de difusión aparente y por tanto la cuantificación de la misma mediante métodos no invasivos constituye una prueba sensible a los cambios en la estructura celular que afecten el desplazamiento de las moléculas de agua por unidad de tiempo. La aplicación clínica más relevante para las imágenes por resonancia magnética sensibles a difusión es el estudio de procesos isquémicos agudos, donde disminuye el desplazamiento de las moléculas por unidad de tiempo y por tanto del *ADC*, resultando en menor atenuación de señal y por tanto, la lesión se ve hipointensa [Moseley *et al.*, 1990a] aún cuando las imágenes convencionales T1, T2 y Flair se ven normales.

Casi al mismo tiempo que se observó que el *ADC* está reducido en la isquemia, se observó que en ciertas partes del cerebro del gato, el *ADC* medido depende de la dirección de medición (la dirección del gradiente aplicado) [Moseley *et al.*, 1990b].

Confirmando mediciones previas realizadas *ex vivo* en músculo y tejido cerebral [Hansen, 1971; Cleveland *et al.*, 1976]. La dependencia direccional del *ADC* también fue observada poco después en el cerebro humano [Chenevert *et al.*, 1990; Doran *et al.*, 1990].

En ciertas regiones del cerebro, la intensidad de señal de una imagen pesada a difusión es la misma en todas direcciones, sugiriendo que el *ADC* es igual en todas direcciones. En estas regiones decimos que la difusión es isotrópica. En regiones donde esto no ocurre, y por tanto, hay una dirección preferencial de difusión, en este caso decimos que la difusión es anisotrópica. Esta anisotropía refleja la microestructura del tejido estudiado. Se ha visto que la difusión ocurre principalmente a lo largo de los tractos nerviosos, y encuentra barreras en forma paralela a estos. Como estas observaciones se hicieron en cerebros de personas adultas, se concluyó que la anisotropía de la difusión se debía a la mielina actuando como barreras hidrofóbicas a la difusión [Thomsen *et al.*, 1987]. Sin embargo, esta anisotropía puede ser observada en ausencia de mielina [Wimberger *et al.*, 1995; Beaulieu, 2002].

1.5.6. Tensor de Difusión

Si consideramos una gota de tinta en el centro de un cubo de agua, con el tiempo, las partículas de tinta se desplazarán formando un patrón similar a una esfera, ya que la difusión será isotrópica. Sin embargo, en un medio anisotrópico, la difusión será mayor a lo largo de la dirección de mayor anisotropía que en forma perpendicular. El patrón que describirán las partículas de tinta no será una esfera sino algo similar a un elipsoide con el eje mayor paralelo a la dirección de mayor anisotropía del medio. Frecuentemente se piensa en el tensor de difusión en términos de esta elipsoide, y entonces, una superficie representando la distancia que una molécula se desplazará con igual probabilidad desde su origen. En términos matemáticos, el tensor de difusión es una matriz simétrica de

3×3 elementos que caracterizan los desplazamientos en 3D,

$$D = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{xy} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{xz} & D_{yz} & D_{zz} \end{pmatrix} \quad (1.5)$$

donde los elementos en la diagonal corresponden a la difusividad a lo largo de los tres ejes ortogonales (sistema de referencia del escáner), mientras que los elementos fuera de la diagonal corresponden a la correlación entre los desplazamientos a lo largo de los ejes ortogonales. Hay que tener en cuenta que D_{xy} no es exactamente el ADC en la dirección (x, y) , sino la correlación entre los desplazamientos en las direcciones x y y . El modelo del tensor de difusión describe un “marco de referencia interno”, llamado eigensistema o sistema propio. De este modo los ejes principales de la elipsoide están dados por los eigenvectores y las longitudes están dadas por la distancia de difusión en un tiempo dado, el cual vimos que es proporcional a la raíz cuadrada de la difusividad. Por tanto, la longitud de los ejes es proporcional a la raíz cuadrada de los eigenvalores.

La orientación del tensor se define de forma que es paralela al eigenvector principal e_1 , que se asocia con el eigenvalor mayor. El eigenvector principal se asume que es colineal con la orientación dominante de la fibra en el voxel estudiado.

1.5.7. Fracción Anisotrópica

Los índices de anisotropía se utilizan para representar con un valor cuantitativo, qué tan anisotrópica es la difusión y por tanto, el orden de la microestructura muestreada. Aunque existen varios índices de anisotropía propuestos, el más utilizado en la literatura es la Fracción Anisotrópica (FA), que básicamente consiste en la varianza de los eigenvalores respecto a su promedio, normalizada por la magnitud del tensor mismo. La FA está dada por [Basser y Pierpaoli, 1996],

$$FA = \sqrt{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{(\lambda_1 - \bar{\lambda})^2 + (\lambda_2 - \bar{\lambda})^2 + (\lambda_3 - \bar{\lambda})^2}{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}} \quad (1.6)$$

donde λ_1 , λ_2 y λ_3 son los eigenvalores del tensor. Como está normalizada respecto a la magnitud del tensor, la FA mide la fracción del tensor que puede ser asignada a la difusión anisotrópica, tomando valores de 0 (cuando la difusión es isotrópica) a 1 (cuando la difusión está restringida a un solo eje). De modo que al calcular la FA para cada voxel podemos generar mapas de FA como los mostrados en la Figura 1.2.

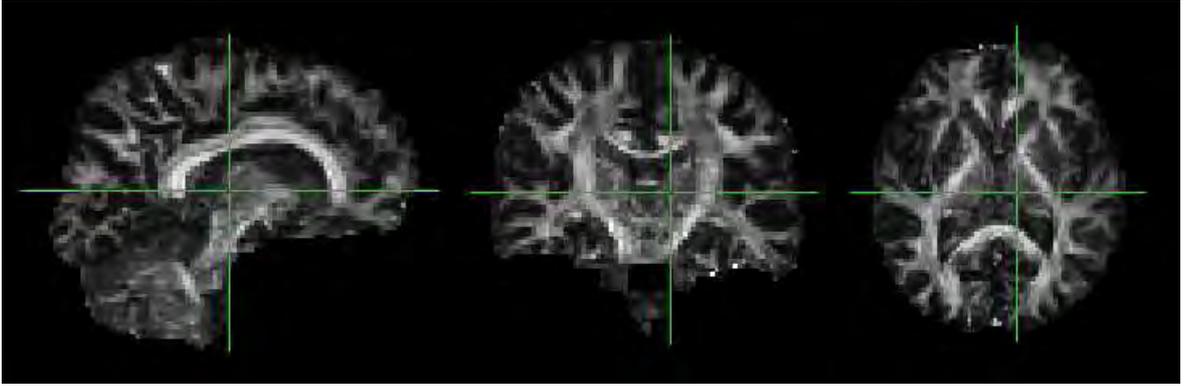


Figura 1.2: Ejemplo de un mapa de FA .

Aunque la FA es uno de los índices menos sensibles al coeficiente señal ruido, esta dependencia nunca será nula. Al disminuir el coeficiente señal ruido, la FA puede ser sobreestimada [Pierpaoli y Basser, 1996]. Así que la comparación de FA obtenida de diferentes estudios con parámetros distintos debe ser tomada con cuidado ya que el efecto del coeficiente señal ruido podría ser distinto para cada conjunto de datos.

Otra de las tantas formas de cuantificar la anisotropía es mediante el cociente ADC paralelo / ADC transversal (\parallel / \perp). En los experimentos de imagen por tensor de difusión, una vez que se tiene caracterizado el tensor, se asume que el eigenvalor mayor (λ_1 o $L1$) corresponde al ADC paralelo a lo largo de la fibra y los dos eigenvalores menores (λ_2 y λ_3) corresponden a los valores de ADC perpendiculares a la fibra. Por

simplificación, los dos eigenvalores menores se promedian para obtener un valor único de la llamada difusividad radial (λ_{\perp} o L_t).

1.6. Bases Biológicas de la Difusión Anisotrópica

Si bien la difusividad promedio de sustancia blanca y sustancia gris en cerebro son similares, el grado de anisotropía es muy diferente en estos tejidos debido a sus estructuras particulares [Pierpaoli *et al.*, 1996]. De hecho la Fracción Anisotrópica es baja en la sustancia gris cortical ($\sim 0,2$), varía en la sustancia gris profunda ($0,2 - 0,4$), y mayor pero en un intervalo muy amplio en la sustancia blanca, desde $\sim 0,45$ en las regiones próximas a los giros corticales, hasta $\sim 0,8$ en el cuerpo callos en el cuerpo calloso en sujetos sanos.

En la mayoría de los casos es difícil apreciar los cambios en los mapas de FA en forma cualitativa, a menos que la lesión sea muy severa como un infarto crónico donde toda la región ha sido degenerada. Por ello, la mayoría de los estudios se basan en análisis cuantitativos entre sujetos en estudio y sujetos control.

1.6.1. Relación de la difusión anisotrópica del agua con la microestructura del tejido en sustancia blanca.

Microtúbulos y neurofilamentos.

El citoesqueleto de los axones en sustancia blanca es denso y los numerosos neurofilamentos y microtúbulos orientados longitudinalmente podrían constituir una importante barrera física a la difusión perpendicular a los axones. Los neurofilamentos son más abundantes que los microtúbulos, y para probar su contribución a la anisotropía de la difusión, es necesario minimizar las interacciones de las moléculas con la membrana

celular. Dado que los diámetros típicos de los axones son del orden de 1 a $10\mu m$, ésta no es una tarea sencilla en la mayoría de las muestras de sistema nervioso central, ya que la difusión de las moléculas es aproximadamente de 5 a $11\mu m$ en un tiempo típico de difusión de $40ms$.

Existen dos estudios que midieron la difusión en axones de gran tamaño para disminuir el efecto de las membranas celulares. El primer estudio utilizó un axón gigante de calamar, con un diámetro $\sim 300\mu m$, que mostró prácticamente difusión isotrópica, con un cociente ADC paralelo / ADC transversal ($ADC_{\parallel}/ADC_{\perp}$) de 1.2 y FA de 0.11 [Beaulieu y Allen, 1994] que contrastan con los cocientes $ADC_{\parallel}/ADC_{\perp}$ típicos de 2 a 7 en sustancia blanca y FA entre 0.45 a 0.8 aproximadamente. En el segundo estudio, se mostró que la difusión es isotrópica ($ADC_{\parallel}/ADC_{\perp} = 1$, $FA = 0$) en los axones de Mauthner de la lamprea (*Petromyzon marinus*), cuyo diámetro es ~ 20 a $40\mu m$ [Takahashi *et al.*, 2002]. Estos estudios confirman que cuando el agua interacciona únicamente con un arreglo de neurofilamentos, sin membranas, la difusión es esencialmente isotrópica. Estos resultados experimentales son confirmados con simulaciones Monte Carlo de la matriz de neurofilamentos usando los diámetros conocidos ($10nm$) y el espacio promedio entre ellos ($20a60nm$) [Beaulieu y Allen, 1994]. Otro resultado de estos estudios es que la difusión en el axoplasma en ausencia de membranas es rápida y no tan lenta como uno podría esperar en un medio intracelular. El axoplasma con un 2.5% de proteínas y 87% de agua [Brown y Lasek, 1990], tiene una estructura similar a la de un gel de agarosa, donde la difusión del agua es cercana a la de agua pura dado el amplio espacio entre las cadenas polisacaradas [Woessner *et al.*, 1970; Derbyshire y Duff, 1974].

Los microtúbulos tienen dos métodos potenciales de contribuir a la anisotropía. El primero es su estructura, sin embargo su densidad es muy baja relativa a los microfilamentos. El segundo es que ellos facilitan el transporte axonal rápido de vesículas y organelos, que podría facilitar el movimiento del agua a lo largo del axón. Despolime-

rizando los microtúbulos con vinblastina, lo que también debería detener el transporte axonal rápido, se demostró que los microtúbulos y el transporte no juegan un papel importante en la anisotropía observada en sustancia blanca (Beaulieu y Allen, 1994a). Esto no significa que el transporte no afecte los valores individuales de ADC , ya que en las mediciones se mostró que el ADC paralelo y perpendicular fueron afectados, pero que la relación entre ellos se mantiene.

Membranas.

En la sección anterior se descartó el papel de los microtúbulos, neurofilamentos y transporte axonal como los factores dominantes en la anisotropía de la difusión del agua en la sustancia blanca. Los dos elementos restantes a explorar son la membrana axonal y la mielina, dada su prevalencia e importancia en desórdenes de la sustancia blanca, originalmente propuesta por [Bihan *et al.*, 1993] y [Moseley *et al.*, 1991].

Existe una variedad de estudios que confirman la anisotropía en tractos que no tienen mielina de forma no patológica en una variedad de modelos animales y en humanos, principalmente neonatos de pretérmino. Los modelos de sistemas no mielinizados en los que se ha demostrado marcada difusión anisotrópica han incluido mediciones de fibras (*i*) que son no mielinizadas por su naturaleza misma, (*ii*) que aún no han sido mielinizadas, o (*iii*) que no forman mielina debido a modificaciones genéticas.

Se encontró anisotropía en la difusión del agua en el nervio de una de las patas de langosta ($FA = 0,56$, $ADC_{\parallel}/ADC_{\perp} = 2,7$), que contiene axones no mielinizados con diámetros ~ 3 a $8\mu m$ [Beaulieu, 2002]. La médula espinal de las lampreas contiene regiones con axones no mielinizados de menor diámetro y densidades axonales variables. El grado de anisotropía, la FA varía desde $0,82$ ($ADC_{\parallel}/ADC_{\perp} = 7$), $0,69$ ($ADC_{\parallel}/ADC_{\perp} = 4,2$) a $0,34$ ($ADC_{\parallel}/ADC_{\perp} = 1,9$) para las porciones dorsal, dorsolateral y ventral, respectivamente, que corresponden con el orden de incremento

promedio del diámetro axonal y menor densidad axonal [Takahashi *et al.*, 2002]. De manera interesante, la reducción observada en la anisotropía corresponde a un incremento de la difusión perpendicular mientras que la difusión paralela permanece constante.

Estudios utilizando ITD en sustancia blanca cerebral de crías de rata han mostrado anisotropía significativa previa a que la mielinización fuera evidente con pruebas histológicas [Wimberger *et al.*, 1995; Prayer *et al.*, 1997]. En humanos, en niños prematuros, se delinearon pequeñas vías de asociación y proyección y se observó que la *FA* aumentó de 0.25 a 0.45 desde la semana 27 a la 42 de edad gestacional [Berman *et al.*, 2005; Partridge *et al.*, 2005]. La mielina no puede contribuir a la reducida difusión perpendicular a estas edades. La razón del cambio parece ser la mejor organización paralela y empaque de los axones estudiados conforme maduran.

De forma similar a los casos presentados, se ha demostrado anisotropía significativa en la sustancia blanca de la médula espinal y cerebro, en animales modificados genéticamente para que su tejido neuronal se desarrolle sin mielina (dismielinización). En el nervio óptico dismielinizado de ratones jimpy (jimpy mice), debido a una anomalía en el desarrollo de proteína proteolípida que es un componente principal de la mielina, se encontró que la anisotropía de la difusión es similar a aquella en sujetos control, aunque pequeña, probablemente debido a la corta edad de los ratones (dos semanas) [Ono *et al.*, 1995]. En ratones modificados genéticamente, borrando el gen básico para la producción de mielina, se encontraron varias regiones del cerebro con marcada anisotropía ($FA = 0,36$ a $0,57$), pero se encontró que el *ADC* radial era mayor que sujetos control y el *ADC* paralelo no difería significativamente respecto a los controles. En estos ratones se confirmó mediante microscopía electrónica, que las zonas estudiadas, pedúnculos cerebrales, cuerpo calloso, cápsula externa, fórnix, nervio óptico y tracto óptico, presentaban axones intactos pero sin mielinización.

Se puede concluir, que la anisotropía de la difusión no es específica de la mieli-

na, pues la mielina no es esencial en las fibras nerviosas para observar esta propiedad biofísica. Las membranas axonales por sí mismas son barreras suficientes a la difusión transversal en comparación a la difusión longitudinal a los tractos de sustancia blanca. Sin embargo, las capas de mielina pueden modular la anisotropía, aún cuando no son requisito estrictamente necesario para que ésta se presente. Sin ser los únicos reportes, existen seis publicaciones relevantes [Ono *et al.*, 1995; Gulani *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2002; Nair *et al.*, 2005; Tyszka *et al.*, 2006; Harsan *et al.*, 2007] que estudiaron modelos de animales modificados genéticamente que carecen de mielina presumiblemente sin afectar la integridad axonal en comparación con controles no modificados. De estos trabajos se puede resumir que, en ausencia total de mielina en modelos animales de dismielinación, los valores de FA indican que se preserva la anisotropía y ésta se reduce en promedio 15 % (mín, máx : 0, 32 %). Una observación constante de estos trabajos es que la difusión perpendicular se incrementa en mayor proporción de lo que cambia la difusión paralela, y que los incrementos de difusión perpendicular usualmente son mayores en porcentaje que los cambios en FA .

Aun cuando las membranas son las principales responsables de la anisotropía en los tractos nerviosos, la mielina y sus alteraciones o cambios tienen un papel importante. De este modo, cambios en la mielina, ya sea disminución o aumento, modifican la anisotropía medida en el tracto o región estudiada.

En varios estudios de desórdenes neurológicos se observa una disminución de la anisotropía que, por alguna razón, corresponden a la pérdida del orden longitudinal del tejido, probablemente debido a la pérdida o colapso de las barreras (mielina, axones) o a la adición de más agua (edema vasogénico) (Figura 1.3).

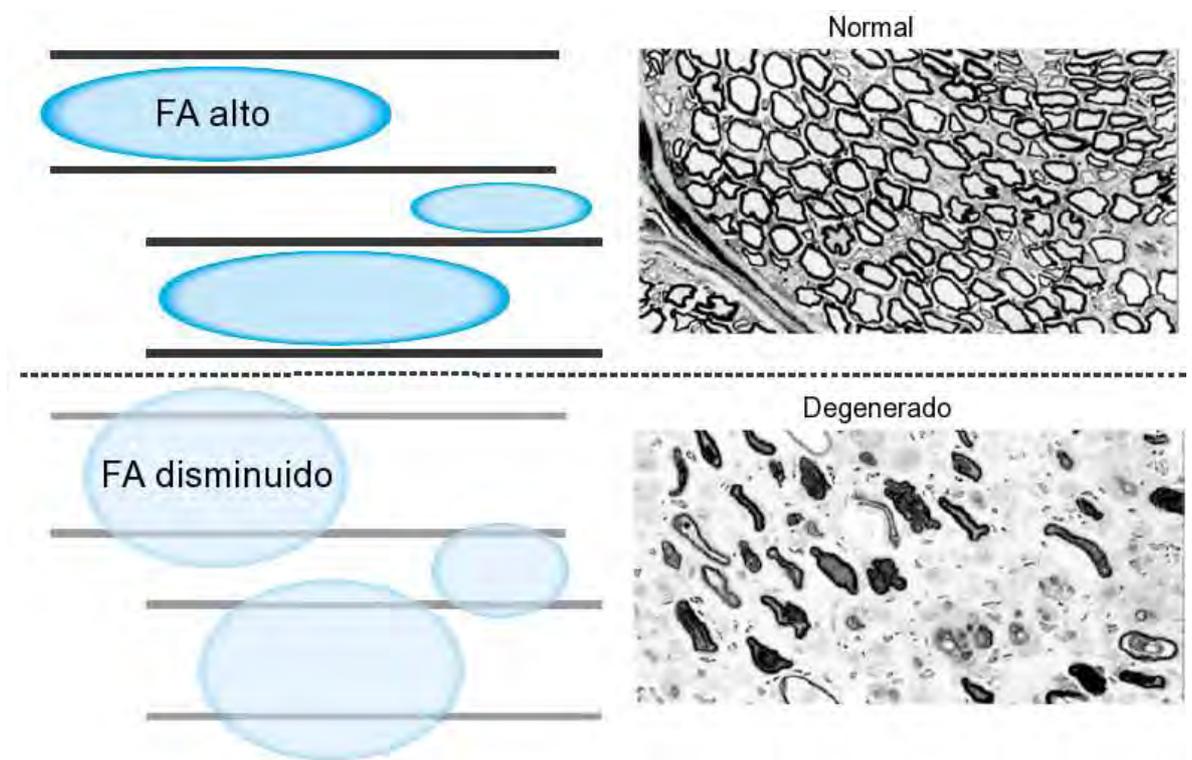


Figura 1.3: Izquierda, representación del daño sufrido por las barreras a la difusión y su efecto en la FA . Derecha, micrografías electrónicas del nervio ciático degenerado (abajo) y normal (arriba) de la rana. Tomado de [Beaulieu, 2009].

La anisotropía puede disminuir debido a una disminución de la difusión paralela o a un aumento de la difusión perpendicular, o una combinación de ambas. Así que no todos los cambios de FA se pueden interpretar de la misma forma, dependiendo de las alteraciones de los eigenvalores individuales.

Estudios recientes han demostrado en conjunto con verificación histológica, que la difusión paralela y perpendicular pueden ser interpretados en algunas situaciones, a partir de cambios axonales o en la mielina, respectivamente. Las primeras evidencias de esta relación se obtuvieron de estudios longitudinales donde la adquisición de datos se realizó poco después de la lesión. Un estudio de ITD realizado en forma temprana permite capturar el estado en que los axones están lesionados mientras que la mielina permanece intacta en su mayoría. En un modelo de isquemia retinal en ratón, se observaron diferentes curvas temporales del cambio en la difusión paralela y perpendicular

durante la degeneración Walleriana [Song *et al.*, 2002]. Específicamente se observó una reducción de la difusión paralela sin cambios en la difusión perpendicular en los primeros 3 días, mientras que la difusión perpendicular mostró cambios hasta pasados 14 días. Se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica para confirmar el periodo agudo de la degradación axonal con las capas de mielina preservadas, mientras que el periodo cónico mostró degradación de la mielina. Este trabajo sugiere que el colapso axonal por sí mismo no conlleva a un aumento en la difusión perpendicular. Otro ejemplo pero en humanos, se puede ver en pacientes con epilepsia que no responden a tratamiento y les realizan cirugía para seccionar las fibras del cuerpo calloso en un intento por disminuir sus crisis [Concha *et al.*, 2006]. Las mediciones de FA a la primer semana y a los dos meses fueron similares en el decremento mostrado, pero la medición más temprana fue resultado de una disminución de la difusión paralela, mientras que, el aumento de la difusión transversal fue la responsable del decremento de FA en la medición más tardía. Aunque la correlación entre los cambios en las propiedades de difusión y los cambios patológicos es alentadora, no se puede asegurar que son la única interpretación posible de los cambios encontrados, de modo que no en todos los estudios de ITD se puede ligar la disminución del ADC paralelo únicamente con degradación axonal o la elevación del ADC paralelo únicamente con la degradación de la mielina. La idea principal es que las propiedades de difusión paralela y perpendicular proveen de más información útil y probablemente más específica que una medida de anisotropía por sí misma.

1.7. Métodos de análisis de los mapas de fracción anisotrópica y propiedades de difusión.

El análisis de las propiedades de difusión medidas a partir de la imagen por tensor de difusión, particularmente la comparación de éstas entre grupos de pacientes, requiere de una coincidencia de las estructuras o regiones a comparar. Se puede hacer mediante

la definición de regiones o tractos de interés, los cuales son seleccionados o “disecados” a partir de los datos sujeto por sujeto y posteriormente puestos a prueba para evaluar su similitud o diferencia. Este tipo de análisis tiene la desventaja de que no permite hacer búsquedas en todo el cerebro, limitando los hallazgos a regiones previamente definidas, aunque tiene la ventaja de que no requiere de una concordancia espacial de las estructuras cerebrales y es particularmente útil cuando se tienen hipótesis referentes a una estructura confinada.

Para realizar comparaciones voxel a voxel entre mapas de las propiedades de difusión (u otras propiedades estructurales), es necesario solucionar el problema de correspondencia, es decir, que las estructuras cerebrales de todos los sujetos en la muestra estén representadas en la misma localización espacial del mapa que las representa. Para esto, se han utilizado comúnmente dos metodologías: 1) un análisis estilo VBM, desarrollado inicialmente para comparación de mapas de sustancia gris [Ashburner y Friston, 2000; Good *et al.*, 2001], descrito brevemente en otra sección de este capítulo; y 2) un análisis denominado Estadística Espacial Basada en Tracto (TBSS, por las siglas en inglés de Tract Based Spatial Statistics), que pretende solucionar el problema de correspondencia definiendo el esqueleto de la sustancia blanca común a los participantes del estudio y proyectando en él para cada sujeto los parámetros a comparar, p. ej. la *FA*.

1.7.1. Métodos de correregistro.

El correregistro o realineación consiste en encontrar las transformaciones espaciales necesarias para hacer que una imagen coincida con otra (correregistro) y en su caso, aplicar dichas transformaciones (registro o realineación). Básicamente, los métodos para llevar a cabo este proceso se pueden dividir en métodos lineales y no lineales.

El registro lineal limita las transformaciones aplicadas a: traslación y rotaciones

globales, escalamiento y deformaciones globales (los cuadrados se pueden volver paralelogramos). Estas transformaciones implican pocos grados de libertad (parámetros a ajustar), tienden a ser robustas y precisas para alinear imágenes del mismo sujeto, pero por lo general no son muy precisas entre sujetos, ya que se requieren deformaciones locales debido a las variantes anatómicas del cerebro en diferentes sujetos.

El registro no lineal es utilizado entonces principalmente para alinear imágenes entre diferentes sujetos, o de un sujeto a una plantilla en el espacio estándar. Estos métodos pueden aplicar deformaciones locales a comparación de las transformaciones globales simples que se aplican en los métodos lineales. El número de grados de libertad se puede variar, haciéndose mayor si se quiere una coincidencia casi perfecta. Los registros no lineales, generalmente se inician con registros lineales para hacer coincidir en un principio la orientación general y el tamaño en forma global.

1.7.2. Análisis estilo VBM.

Las ventajas de esta metodología incluyen que es un análisis totalmente automatizado, relativamente simple de aplicar, permite investigar diferencias en todo el cerebro sin la necesidad de definir o localizar estructuras particulares o patrones de interés. Sus desventajas para comparar propiedades de difusión de los tractos nerviosos, están relacionadas con el problema de correspondencia. [Simon *et al.*, 2005] discuten este problema en un estudio donde comparan un grupo de pacientes control con un grupo de pacientes que tienen ventrículos cerebrales de mayor tamaño pero poseen básicamente la misma integridad de sustancia blanca. Debido a la diferencia en el tamaño y posición de los ventrículos, el correregistro convencional utilizando un número pequeño a mediano de grados de libertad lleva el cuerpo caloso anterior de los pacientes a una posición más anterior respecto a los controles. Al realizar el análisis estadístico voxel a voxel, este error de correregistro lleva a observar una diferencia en FA al frente del cuerpo caloso,

aparentando FA mayor en los pacientes en relación a los controles, mientras que en la parte posterior de la misma estructura, se infiere lo contrario. [Simon *et al.*, 2005] son cautelosos al interpretar este cambio aparente de la FA como un cambio en el tamaño de los ventrículos y un problema de correregistro.

Un correregistro no lineal con un mayor número de grados de libertad permitiría mayores deformaciones y posiblemente mejor correregistro. Este escenario fue explorado por [Park *et al.*, 2003], utilizando una variedad de parámetros de difusión, evaluando el resultado cuantitativamente a partir de la similitud de los mapas finales de tractografía. Se mostró que se obtienen mejores resultados utilizando los seis componentes de difusión del tensor en vez de usar alguna combinación de los resultados de la imagen por tensor de difusión, incluyendo la FA , aunque los cambios no resultaron tan grandes. Esta metodología fue utilizada para comparar la estructura de la sustancia blanca en pacientes esquizofrénicos en relación a sujetos control [Park *et al.*, 2004]. A pesar de que el correregistro parece ser mejor que utilizando otras metodologías, los autores refieren que persisten algunos errores de correregistro en los bordes de algunas estructuras de sustancia blanca y por esa razón, no comparan directamente sus datos entre pacientes y controles utilizando técnicas de VBM.

En general, no parece seguro asumir que el correregistro no lineal puede alinear los datos de FA de manera satisfactoria entre sujetos como para interpretar de manera simple los resultados de un análisis voxel a voxel. Si no se puede asegurar que el correregistro es correcto, entonces se debe asumir que la sensibilidad no es óptima. De forma alternativa se podría pensar que es una ventaja que éstos métodos sean sensibles a diferencias estructurales, sin embargo, no sería sencillo interpretar qué cambios se deben a cambios morfológicos y cuáles se deben a cambios en las propiedades de difusión.

Si bien existen métodos de correregistro no lineal que pueden hacer una imagen prácticamente idéntica a otra, se corre el riesgo de no respetar la topología de la ima-

gen distorsionada, de modo que una estructura de sustancia blanca se seccione en dos estructuras no existentes en el sujeto estudiado, o de forma similar, mezclar estructuras en una misma.

1.7.3. Análisis mediante TBSS.

Este método fue desarrollado recientemente con el objetivo de combinar las ventajas de los análisis basados en VBM y los enfocados a tractos de sustancia blanca particulares [Smith *et al.*, 2006, 2007]. Pretende solucionar el problema de correspondencia y de seleccionar un kernel de tamaño arbitrario para el suavizado espacial, en tanto que es totalmente automatizado y permite investigar diferencias en todo el cerebro, sin requerir especificar tractos específicos. Para ello se estima un esqueleto promedio de FA para el grupo de estudio, que representa el centro de los cúmulos de fibras que son comunes entre los sujetos del estudio. Los datos de cada sujeto son proyectados a este espacio, de modo que cada voxel del esqueleto de cada sujeto contendrá el valor local más significativo del tracto más cercano, disminuyendo así el efecto del error del corregistro y correspondencia voxel a voxel.

El procedimiento se aplica utilizando las herramientas de FSL [Smith *et al.*, 2004] y se puede resumir en los siguientes pasos:

1. Alinear los mapas de FA de todos los sujetos a un espacio común utilizando técnicas de corregistro no lineal. En este paso, no se espera ni se requiere un alineamiento perfecto.
2. Crear el promedio de los mapas de FA alineados y aplicar un algoritmo de adelgazamiento de las estructuras para crear la imagen del esqueleto de sustancia blanca promedio. Aplicar un valor umbral para descartar áreas de alta variabilidad entre sujetos o FA bajo. Aplicar un valor entre 0.2 y 0.3 generalmente excluye voxeles

que corresponden principalmente a sustancia gris o líquido cefalorraquídeo en la mayoría de los sujetos, y también evita que el esqueleto se aproxime a la corteza y a las regiones donde no es seguro asumir que hay buena correspondencia entre los tractos de los sujetos.

La Figura 1.4 muestra la variabilidad de los mapas de FA respecto a la estructura esqueleto. Se puede observar que el esqueleto se encuentra sobre o cerca de los tractos de sustancia blanca sin requerir que el corregistro de los mapas sea perfecto (precisión voxel a voxel).

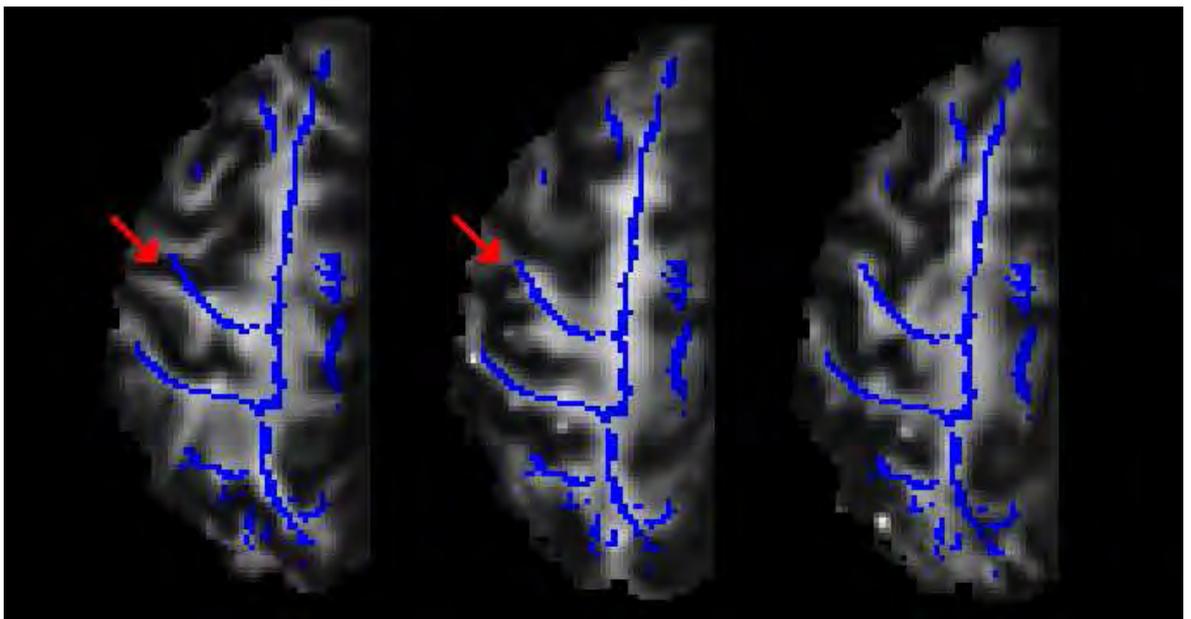


Figura 1.4: Ejemplo del esqueleto de sustancia blanca común al promedio de los mapas de FA de un grupo de sujetos, al proyectarlo sobre el mapa de FA de cada sujeto hay ligeras variaciones en algunas regiones (flecha roja), que se corregirán al proyectar los datos a la estructura.

3. Proyectar los datos de FA de cada sujeto al espacio de la estructura esqueleto. Esto se hace proyectando a cada voxel del espacio esqueleto el valor máximo de FA del sujeto encontrado en forma perpendicular a la estructura.

El objetivo es tomar en cuenta los errores remanentes del correregistro entre sujetos. Para cada punto del esqueleto se busca de forma perpendicular el valor máximo de FA y éste se asigna al voxel del esqueleto. De esta forma se logra la correspondencia entre el esqueleto y el mapa de FA de cada sujeto sin la necesidad de que el correregistro no lineal de los mapas de FA haya sido perfecto. La idea de tomar el valor máximo de FA disminuye el efecto de volumen parcial (es decir, es más específico del tracto que de otras estructuras que pueden contribuir a la señal).

4. Realizar las pruebas estadísticas voxel a voxel entre los mapas de FA proyectados al espacio esqueleto.

1.7.4. Morfometría basada en voxel (VBM) en el estudio de la sustancia gris.

Morfometría basada en voxel (VBM, por las siglas en inglés de *Voxel Based Morphometry*) [Ashburner y Friston, 2000; Good *et al.*, 2001] se ha utilizado en varios estudios de imagen para buscar diferencias localizadas en la densidad de sustancia gris, típicamente entre grupos de sujetos. Utiliza como datos de entrada imágenes de cerebro obtenidas con buena resolución, tamaño de voxel pequeño, generalmente cercana a $1 \times 1 \times 1mm^3$ y con buen contraste entre sustancia blanca y sustancia gris, típicamente imágenes con alto contraste T1 entre sustancia blanca y sustancia gris (propiedades de relajación del vector de magnetización al estar en un campo magnético, característico de cada tejido). El procedimiento puede resumirse en:

1. (Opcional) Crear un cerebro modelo común específico al estudio mediante el correregistro de las imágenes estructurales de cada sujeto a un espacio estándar. Promediar estas imágenes para generar un nuevo mapa que representa a todos los participantes, opcionalmente se puede suavizar espacialmente (difuminar el detalle espacial), esta imagen final se conoce como plantilla (template) específica

del estudio.

2. Corregistrar la imagen estructural de cada sujeto a la plantilla seleccionada (específica del estudio o una estándar), se recomienda usar una específica del estudio para tomar en cuenta la variabilidad de los sujetos participantes. Normalmente se inicia con métodos de corrección lineales y posteriormente métodos no lineales.
3. Segmentar las imágenes de cada sujeto en los diferentes tejidos, en particular se utilizan los mapas de sustancia gris. Las imágenes T1 representan la sustancia gris con voxels de menor intensidad respecto a la sustancia blanca y de mayor intensidad respecto al líquido cefalorraquídeo, el objetivo de este paso es crear un mapa que contenga únicamente voxels con intensidad que represente sustancia gris, como se aprecia en la Figura 1.5.

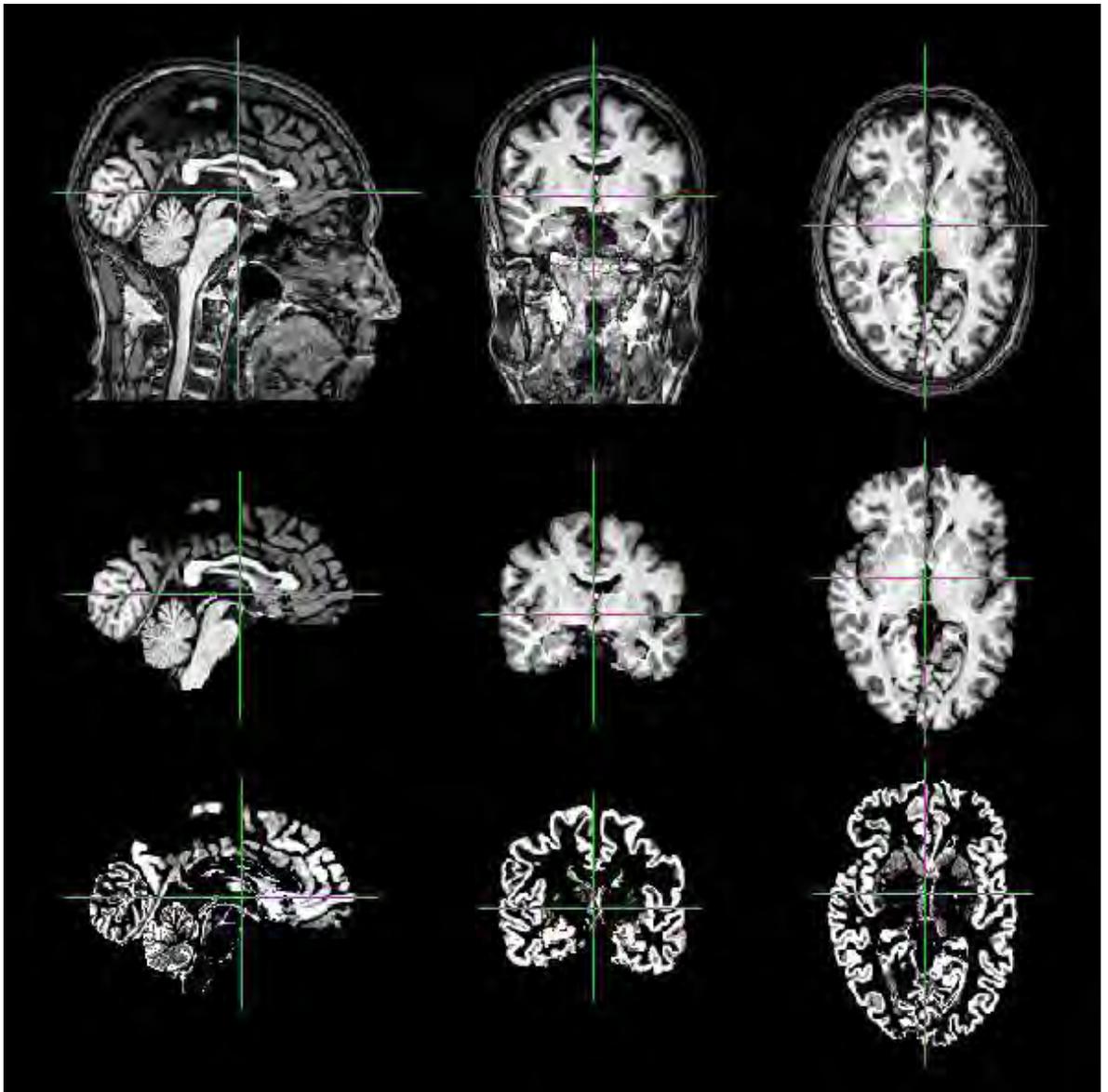


Figura 1.5: Ejemplo del resultado del proceso de segmentación, en la tercer fila se muestra el mapa de sustancia gris obtenido de la imagen T1 estructural de la fila 1.

4. Aplicar un suavizado especial a los mapas de sustancia gris. Esto ayuda a disminuir el efecto de los pequeños defectos en el corregistro de las imágenes de sujetos distintos, aumenta la sensibilidad del método y torna la distribución de los datos a una distribución más gaussiana. Por lo general se aplican filtros con un peso gaussiano, definido con un FWHM entre 4 y 16 mm .

5. Realizar las pruebas estadísticas voxel a voxel entre los mapas de sustancia gris proyectados al mismo espacio estándar.

Normalmente se aplica un proceso de optimización al método, denominado modulación [Good *et al.*, 2001], que compensa los cambios en el volumen representado debido al proceso de corrección, que lleva a cabo algunas deformaciones espaciales. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada principalmente para buscar cambios en sustancia gris en una variedad de enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas, ya que permite explorar todo el cerebro sin la necesidad de definir regiones en particular y es relativamente sencillo de aplicar en comparación con otras técnicas que requieren el delineado manual de estructuras.

Capítulo 2

Sujetos y métodos

2.1. Planteamiento del problema.

Se ha mostrado evidencia de que la lesión de vías aferentes a nivel central y periférico produce alteraciones estructurales en núcleos del tallo, tálamo y corteza cerebral, tanto en modelos animales como en humanos [Jones y Pons, 1998; Woods *et al.*, 2000; Graziano y Jones, 2009; Taylor *et al.*, 2009]. De igual forma lesiones de vías eferentes a nivel central produce cambios estructurales en la vía piramidal y la corteza motora primaria [Crawley *et al.*, 2004; Jurkiewicz *et al.*, 2006; Wrigley *et al.*, 2009]. Sin embargo, pocos estudios han observado los cambios estructurales que ocurren a nivel central debido a la amputación de un miembro o denervación periférica [Draganski *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2009], encontrando cambios principalmente en núcleos y relevos de la vía somatosensorial, sin que haya resultados de los cambios ocurridos en los tractos nerviosos. En este trabajo estudiamos los cambios ocurridos en la sustancia blanca de pacientes con amputación unilateral a nivel transfemoral, estudiamos también los cambios observables en la sustancia gris, utilizando técnicas cuantitativas de neuroimagen. Este abordaje permite hacer estudios *in vivo* en los pacientes participantes de forma no invasiva.

2.2. Objetivos generales.

Buscar en forma cuantitativa diferencias estructurales en cerebro vistas como cambios en las propiedades de difusión de la sustancia blanca y del volumen de sustancia gris utilizando técnicas de neuroimagen por resonancia magnética.

2.3. Objetivos particulares.

Comparar mapas de fracción anisotrópica (FA), coeficiente aparente de difusión longitudinal ($L1$) y coeficiente aparente de difusión transversal (Lt) de sustancia blanca de pacientes con amputación transfemoral unilateral con aquéllos en sujetos sanos control sin amputación.

Comparar los mapas de sustancia gris de pacientes con amputación transfemoral unilateral con aquéllos de sujetos sanos control sin amputación.

Correlacionar los cambios estructurales encontrados con el tiempo de amputación.

2.4. Hipótesis.

La fracción anisotrópica en pacientes amputados será significativamente menor que en los sujetos control, principalmente en el tracto corticoespinal hacia la corteza somatosensorial primaria medial y descendente de la corteza motora primaria medial contralateral a la amputación.

2.5. Criterios de inclusión.

Grupo Pacientes.

- Sujetos con amputación transfemoral unilateral a nivel medio.
- Amputación como consecuencia a traumatismo (no diabéticos, no oncológicos).
- 18 a 60 años de edad cumplidos a la fecha del estudio.
- Diestro según el cuestionario de Edimburgo [Oldfield, 1971].
- Que desee participar en el estudio y con capacidad de dar su consentimiento previamente informado.

Grupo Controles.

- 18 a 60 años de edad cumplidos a la fecha del estudio, similar a la de algún participante del grupo de pacientes.
- Diestro según el cuestionario de Edimburgo [Oldfield, 1971].
- Que desee participar en el estudio y con capacidad de dar su consentimiento previamente informado.

2.6. Criterios de exclusión.

Grupo Pacientes.

- Enfermedad crónica-degenerativa.
- Evidencia de desorden neurológico ni psiquiátrico identificado en entrevista con médico especialista.
- Impedimento para la realización de resonancia magnética de alto campo (3.0 Teslas, implante metálico irremovible, dispositivos electrónicos, claustrofobia, tatuaje de tinta no vegetal o desconocida).

- Traumatismo craneoencefálico con secuelas clínicas.
- Puntaje mayor a 2 en cualquiera de las dimensiones que evalúa la prueba SCL-90 versión computarizada [González-Santos *et al.*, 2007].

Grupo Controles.

- Amputación o denervación de algún miembro.
- Enfermedad crónica-degenerativa.
- Evidencia de desorden neurológico ni psiquiátrico identificado en entrevista con médico especialista.
- Impedimento para la realización de resonancia magnética de alto campo (3.0 Teslas, implante metálico irremovible, dispositivos electrónicos, claustrofobia, tatuaje de tinta no vegetal o desconocida).
- Traumatismo craneoencefálico con secuelas clínicas.
- Puntaje mayor a 2 en cualquiera de las dimensiones que evalúa la prueba SCL-90 versión computarizada [González-Santos *et al.*, 2007].

2.7. Criterios de eliminación (ambos grupos).

- Imagen de resonancia con evidencia de lesión cerebral o neoplasia.
- Movimiento durante el estudio.

2.8. Sujetos.

Participaron 11 pacientes referidos del servicio de rehabilitación de amputados del Instituto Nacional de Rehabilitación, que cumplieron los criterios de inclusión y desearon participar en el estudio. De los 11 pacientes, 10 fueron hombres y 1 mujer, la edad

Paciente	Género	Lado de amputación	Edad (años)	Meses de amputación
P01	Masculino	Der	56	506
P02	Masculino	Izq	59	102
P03	Masculino	Der	43	198
P04	Femenino	Izq	45	14
P05	Masculino	Izq	20	92
P06	Masculino	Izq	44	199
P07	Masculino	Izq	22	17
P08	Masculino	Der	40	36
P09	Masculino	Der	60	264
P10	Masculino	Izq	50	192
P11	Masculino	Der	50	240

Cuadro 2.1: Características de los pacientes participantes en el estudio.

promedio del grupo fue de 44.45 años con desviación estándar de 13.31 años, en un intervalo de 20 a 60 años, con tiempo de amputación promedio de 169.09 meses y desviación estándar de 143.23 meses, en un intervalo de 14 a 506 meses. 6 pacientes sufrieron amputación del miembro izquierdo y 5 del miembro derecho. Las características de los participantes se encuentran resumidas en el Cuadro 2.8.

Participaron 14 sujetos control reclutados de la población abierta de la Ciudad de México. De los 14 controles, 12 fueron hombres y 2 mujeres, la edad promedio del grupo fue de 41.06 años con desviación estándar de 14.96 años, en un intervalo de 19 a 60 años.

Todos los sujetos otorgaron su consentimiento por escrito previamente informado. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética e investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

2.9. Adquisición de Imagen.

La adquisición de imagen se realizó en un equipo de resonancia magnética de 3 Teslas (GE Healthcare, Milwaukee, EE.UU.) instalado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. La secuencia de tensor de difusión incluyó la adquisición de 60 imágenes axiales sin espacio entre cortes con secuencias EPI (echo planar imaging) single-shot, muestreando 32 direcciones independientes de la difusión con valor b máximo de $800\text{mm}^2/\text{s}$. Voxel isométrico de 2mm por lado. Con la intención de aumentar la relación señal-ruido se repitió la secuencia 2 veces. Se adquirió además secuencia T1 de alta resolución y contraste en orientación sagital, con resolución de 1mm por lado ($TR, TE : 8\text{ms}, 3,7\text{ms}$).

2.10. Procesamiento de imágenes.

Las imágenes se procesaron usando los algoritmos de las librerías del grupo del laboratorio de imagen funcional de la universidad de Oxford, FSL (de sus siglas en inglés FMRIB's Software Libraries) [Smith *et al.*, 2004]. Las imágenes de los seis sujetos con amputación de miembro izquierdo y seis sujetos control fueron volteadas en la dirección x para intercambiar los hemisferios, de modo que en todos los sujetos coincida el hemisferio contralateral al miembro amputado (hemisferio izquierdo).

2.10.1. Sustancia Blanca.

Las imágenes de las dos secuencias de imagen por tensor de difusión fueron concatenados y corregistradas tomando de referencia el primer volumen de la primer adquisición para disminuir los efectos del movimiento del paciente y de desplazamiento geométricos por la codificación de varias direcciones de difusión. Las secuencias fueron separadas nuevamente y promediadas voxel a voxel. Se ajustaron los datos al modelo

del tensor de difusión para obtener los mapas de las intensidades de los vectores principales de difusión y el mapa de fracción anisotrópica para cada sujeto. Se siguió la metodología de TBSS [Smith *et al.*, 2006] para realizar las comparaciones entre grupos voxel a voxel en todo el cerebro. Se extrajo la imagen del cerebro únicamente (Smith, 2002) de los mapas de FA para todos los sujetos. Estos mapas de FA segmentados son corregistrados a la imagen $FMRIB58_FA$ en el espacio estándar del Instituto Neurológico de Montreal utilizando transformaciones no lineales mediante la herramienta FNIRT parte de FSL [Rueckert *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2004]. Con los mapas de FA en el mismo espacio se crea la imagen promedio y se adelgaza a modo de dejar el esqueleto de sustancia blanca, se iguala a cero la intensidad de los voxeles que tienen valor menor o igual a 0.2 para descartar áreas de alta variabilidad entre sujetos o FA bajo. Los valores de FA de cada sujeto se proyectan al espacio del esqueleto, de modo que los datos están en un mismo espacio y coincidan las estructuras de sustancia blanca. Para comparar los mapas de L1 y Lt, se aplican las mismas transformaciones espaciales encontradas para los mapas de FA , de modo que coinciden a los mapas de FA pero con los valores que representan L1 y Lt.

Los valores de FA , L1 y Lt en el espacio del esqueleto de sustancia blanca se comparan voxel a voxel entre grupos utilizando una prueba t mediante el modelo lineal general, los resultados fueron corregidos para comparaciones múltiples usando métodos de permutaciones aleatorias [Nichols y Holmes, 2002; Hayasaka y Nichols, 2004]. Los únicos voxeles que se consideraron con diferencias significativas entre grupos fueron aquéllos con $p < 0,05$, corregida.

2.10.2. Sustancia Gris.

El análisis de las variaciones estructurales en sustancia gris fue realizado mediante la metodología de morfometría basada en voxel o VBM [Ashburner y Friston, 2000;

Good *et al.*, 2001] implementada en FSL [Smith *et al.*, 2004]. Primero se eliminan los voxeles que no son parte del tejido cerebral usando el algoritmo BET (por sus siglas en inglés Brain Extraction Tool, [Smith *et al.*, 2004]). Posteriormente se segmentan los tipos de tejidos muestreados, sustancia gris, sustancia blanca y líquido cefalorraquídeo [Zhang *et al.*, 2001]. Los mapas correspondientes a sustancia gris se corrigieron a la imagen MNI152 en el espacio estándar del Instituto Neurológico de Montreal usando transformaciones lineales y no lineales [Rueckert *et al.*, 1999; Jenkinson y Smith, 2001; Jenkinson *et al.*, 2002]. Se obtuvo el promedio de estos mapas en el espacio estándar para generar un mapa de referencia específico para este estudio. Los mapas de sustancia gris fueron corregidos a este mapa de referencia y las modificaciones al volumen de sustancia gris debido a las deformaciones locales fueron corregidas mediante el proceso de modulación que considera los vectores que expresan la expansión o contracción del mapa original [Good *et al.*, 2001]. Se aplica un suavizado espacial con un núcleo gaussiano isotrópico con sigma de $2mm$ ($FWHM \sim 4,7mm$).

Los mapas de sustancia gris se comparan voxel a voxel entre ambos grupos utilizando una prueba t mediante el modelo lineal general, los resultados fueron corregidos para comparaciones múltiples usando métodos de permutaciones aleatorias [Nichols y Holmes, 2002; Hayasaka y Nichols, 2004]. Los únicos voxeles que se consideraron con diferencias significativas entre grupos fueron aquéllos con $\rho < 0,05$, corregida.

2.11. Validación de la Metodología Propuesta.

Se realizó la exploración con la misma metodología en un grupo de pacientes con Ataxia Espinocerebelar tipo 7, ya que es una enfermedad neurodegenerativa con reportes detallados de los cambios en la estructura cerebral mediante estudios *post-mortem*.

2.11.1. Ataxia Espinocerebelar Tipo 7.

La ataxia espinocerebelar tipo 7 (SCA7, por las siglas en inglés de *spinocerebellar ataxia type 7*) es un desorden neurodegenerativo progresivo que se caracteriza por ataxia cerebelar y pérdida de la vista, siendo el único tipo de ataxia espinocerebelar que presenta ceguera irreversible [Michalik *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2009; Paulson, 2009]. Está causada por una repetición excesiva (> 35) del trinucleótido CAG en el gen que codifica la proteína ataxin 7 (Garden y La Spada, 2008). Existe una correlación entre la cantidad de repeticiones y la edad en la que los pacientes presentan el fenotipo [Johansson *et al.*, 1998; David *et al.*, 1998; Garden y Spada, 2008]. La pérdida de la vista se debe a una atrofia progresiva de las células fotorreceptoras, tanto conos como bastones, lo que resulta en degeneración macular en etapas avanzadas.

La mayor parte de información acerca de la neurodegeneración en la SCA7 proviene de estudios neuropatológicos *post-mortem*. La región más afectada es el cerebelo y el complejo olivar inferior, incluyendo la corteza cerebelar y los tractos espinocerebelar y olivocerebelar [Enevoldson *et al.*, 1994; Gouw *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1994]. También se ha observado degeneración en núcleos subtalámicos, el globo pálido y la sustancia nigra, así como las columnas dorsales [Enevoldson *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1994]. Los estudios de neuroimagen, principalmente estudios convencionales de resonancia magnética, han revelado una importante atrofia en el cerebelo y puente del tallo [Bang *et al.*, 2003; D'ohlinger *et al.*, 2008].

Los avances recientes en neuroimagen, en particular en la imagen por resonancia magnética, permite no solo la adquisición de imágenes con resolución milimétrica, sino que también permiten muestrear la microestructura del tejido a través de las propiedades de difusión del agua en el mismo. La técnica de morfometría basada en voxel (VBM, por las siglas en inglés de *voxel based morphometry*) es una herramienta de análisis voxel por voxel sensible a las diferencias morfológicas de la sustancia gris y por

tanto, a los cambios en la densidad y volumen cortical debido a procesos neurodegenerativos [Ashburner y Friston, 2000; Good *et al.*, 2001]. A su vez, estudiando la imagen por tensor de difusión, en particular la *FA*, que podrían reflejar un decremento en la coherencia axonal, degeneración de la mielina o axón, disminución del diámetro axonal o generación de células gliales, que en todos casos disminuyen el orden de las barreras a la difusión [Beaulieu, 2002]. La técnica de estadística espacial basada en tracto (TBSS, por las siglas en inglés de *tract-based spatial statistics*) es una herramienta de análisis voxel por voxel que disminuye los efectos de mal corregistro y facilita la interpretación de los resultados al comparar imágenes de DTI entre grupos [Smith *et al.*, 2006].

Se aplicaron estas técnicas utilizando la metodología descritas en el capítulo ?? sin necesidad de modificar la orientación de los hemisferios en este caso para comparar los mapas de *FA* y sustancia gris entre pacientes SCA 7 y los sujetos control. Se reportan los resultados, que confirman los hallazgos previos en cerebelo y puente, y que muestran además, alteraciones en regiones no reportadas previamente.

2.11.2. Sujetos.

Participaron nueve pacientes con diagnóstico molecular de SCA7, 7 mujeres, edad promedio $41,11 \pm 16,18$ años, en un intervalo de 18 a 69 años. El número promedio de repeticiones fue $47,11 \pm 4,08$, en un intervalo de 41 a 53. Participaron nueve sujetos voluntarios, 7 mujeres, con edad promedio $41,22 \pm 15,59$ años en un intervalo de 19 a 65 años, como grupo control, sin evidencia de trastorno psiquiátrico ni neurológico, evaluados por médico especialista.

La edad, sexo, años desde el inicio de la enfermedad hasta el estudio de imagen, el número de repeticiones de CAG, agudeza visual, resultados del Minimental State Examination y el University of Pennsylvania Smell Identification Test, síntomas cere-

Paciente	Edad	Género	Años desde inicio de síntomas	r-CAG	Agudeza Visual	Minimental State Examination	UPSIT
P01	18	Femenino	15	47	20/200	26	24
P02	18	Masculino	4	41	20/100	24	20
P03	39	Femenino	23	44	20/400	28	34
P04	40	Masculino	21	50	20/200	26	34
P05	42	Femenino	17	47	20/200	26	35
P06	43	Femenino	21	50	20/100	27	29
P07	44	Femenino	6	53	20/100	29	35
P08	58	Femenino	10	42	20/200	30	36
P09	68	Femenino	1	50	20/50	24	31

Cuadro 2.2: Características clínicas de los pacientes con SCA 7. Abreviaciones, r-CAG: repeticiones CAG, UPSIT: University of Pittsburg Smell Identification Test.

belares y pontinos de cada paciente, se encuentran resumidos en el Cuadro 2.11.2.

2.11.3. Resultados.

Las regiones que mostraron menor volumen de sustancia gris de forma significativa se resumen en las Figuras 2.1 y 2.2. Estas regiones incluyen, la corteza cerebelar bilateral, los giros pre y post centrales, los giros frontales inferior y medial, el parahipocampo, la cunea y precunea, en ambos hemisferios; en hemisferio derecho, la ínsula, giro frontal superior y lóbulo parietal inferior; el claustró en hemisferio izquierdo. No se encontraron regiones donde el volumen de sustancia gris fuera mayor en pacientes que en controles.

Los pacientes mostraron valores de FA menores que los controles en varias regiones, entre ellas cerebelo, tallo cerebral, pedúnculos cerebrales y cerebelares, mesencéfalo,

cápsula interna anterior y posterior, cápsula externa, cuerpo calloso, radiaciones ópticas, sustancia blanca en lóbulos parietal y frontal próximas al surco central, otras regiones en lóbulo frontal y temporal (Figura 2.2). No se encontraron regiones donde el grupo de pacientes tuviera FA mayor que el grupo control.

La Figura 2.2 ilustra la estrecha relación entre los cambios encontrados en sustancia gris y sustancia blanca, de forma particular en cerebelo, lóbulo occipital y corona radiada próxima al surco central. El análisis reveló una correlación significativa entre el número de años desde la detección de síntomas y el decremento de FA , principalmente en el cuerpo calloso, las radiaciones ópticas y el tracto corticoespinal en ambos hemisferios (Figura 2.2). No se encontraron otras correlaciones significativas.

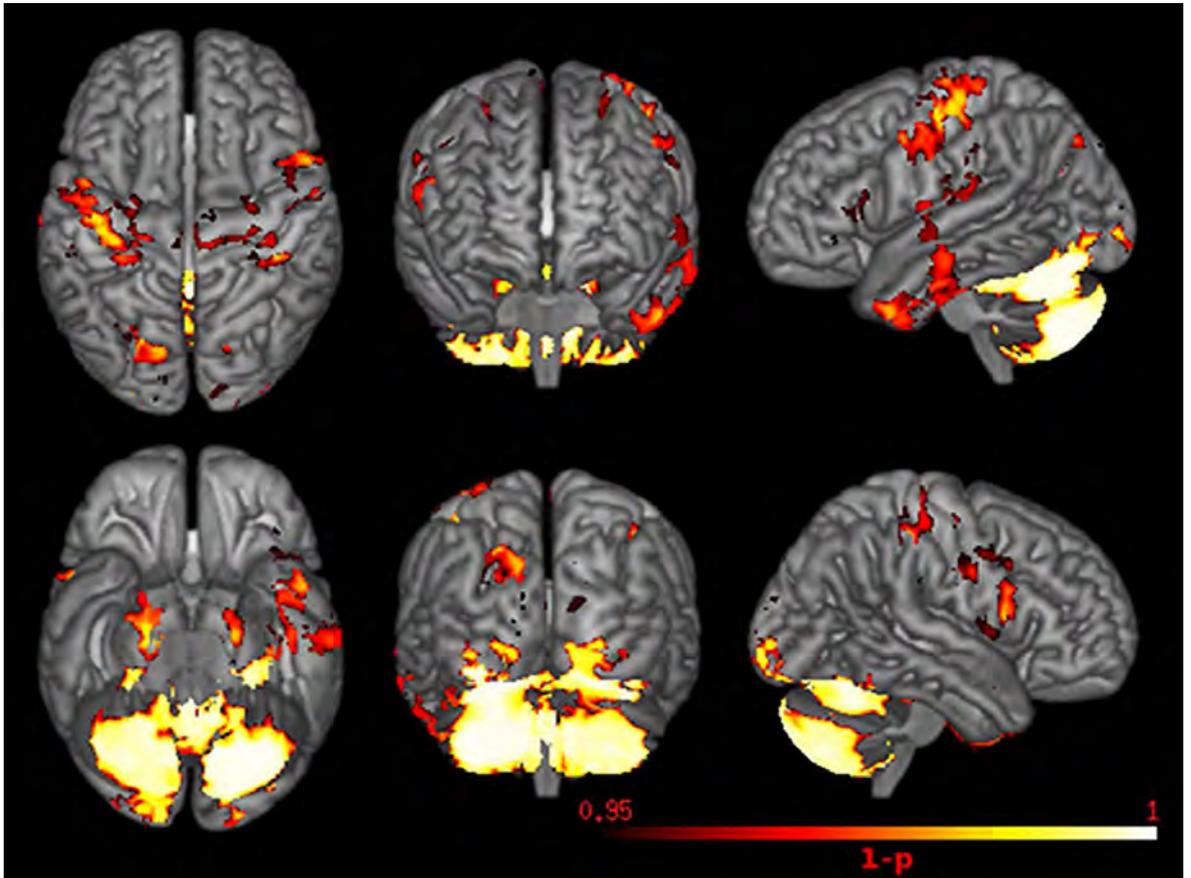


Figura 2.1: Regiones que muestran disminución de volumen de sustancia gris (rojo-amarillo) en los pacientes SCA 7 ($\rho < 0,05$, corregida).

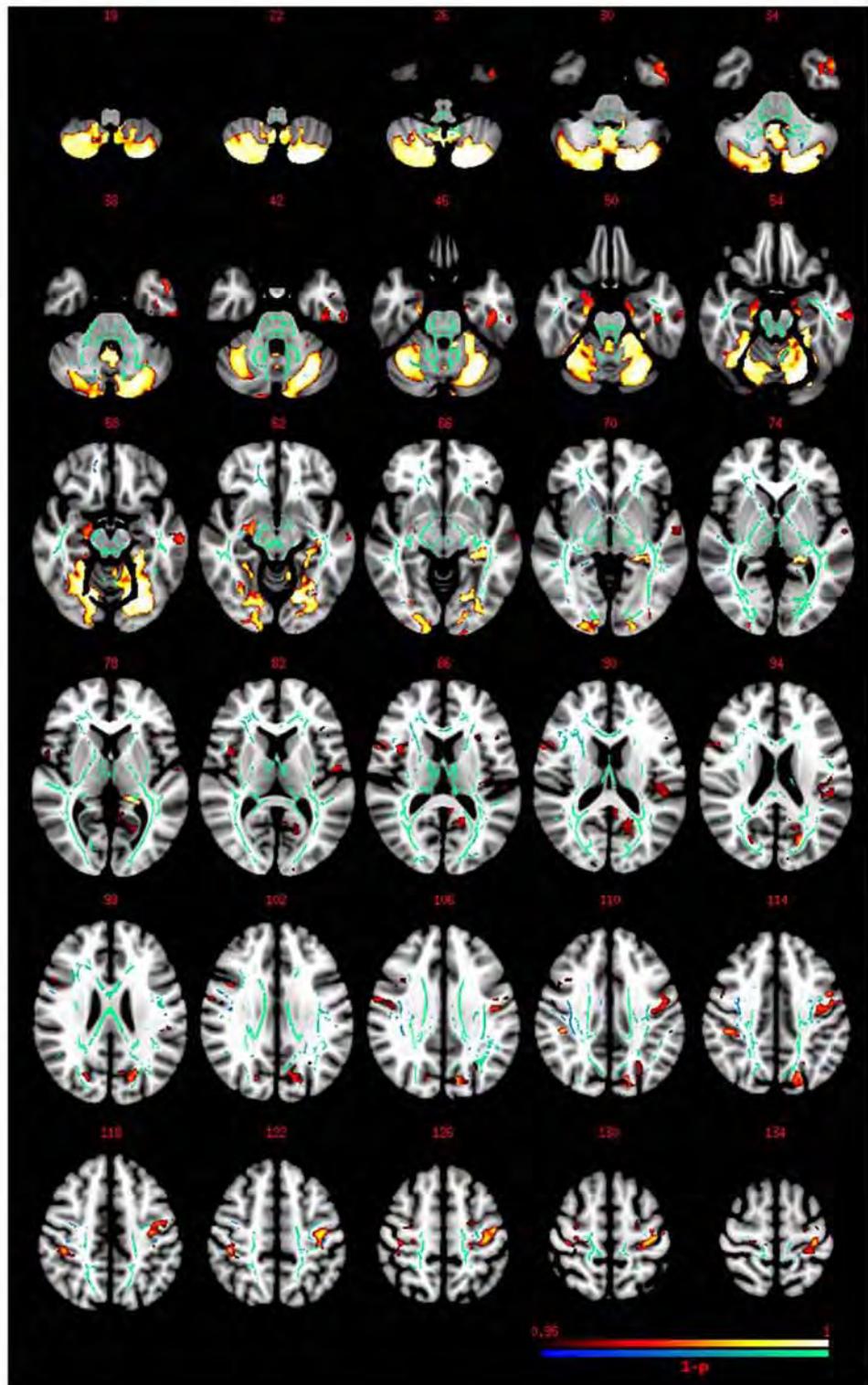


Figura 2.2: Regiones con disminución de volumen de sustancia gris (rojo-amarillo) y disminución de *FA* (azul-verde) en pacientes con SCA 7 ($p < 0,05$, corregida). Vista radiológica, lado derecho de la imagen representa hemisferio izquierdo.

2.11.4. Discusión.

En lo que respecta al estudio de la sustancia gris, los resultados mostraron cambios significativos en cerebelo, similares a los reportados en estudios neuropatológicos *post-mortem*, y estudios previos de imagen convencional [Enevoldson *et al.*, 1994; D'ohlinger *et al.*, 2008]. El análisis también permitió detectar regiones con menor volumen que no habían sido reportadas como la corteza entorrinal, la corteza del giro precentral, del lóbulo occipital, del surco frontal superior, del lóbulo parietal y del claustró.

Los estudios previos de sustancia blanca muestran resultados variables referentes a la pérdida de fibras mielinizadas en cerebelo, cuerpo caloso, nervio oculo motor, lemnisco lateral, tracto trigeminal mesencefálico, nervio abducens, fibras pontocerebelares, tracto piramidal, fibras olivocerebelares, fascículo cuneiforme, tractos espinocerebelares, entre otros [J'obsis *et al.*, 1997; Holmberg *et al.*, 1998; Masciullo *et al.*, 2007; Rüb *et al.*, 2008]. Los resultados del análisis aquí presentado muestran un decremento en la *FA* en el tallo cerebral y mesencéfalo, pero también en regiones que no habían sido reportadas, incluyendo la cápsula interna anterior, radiaciones ópticas, y regiones de sustancia blanca en lóbulo occipital, temporal y frontal.

El hallazgo del decremento de la *FA* en las radiaciones ópticas en conjunto con la disminución de volumen de sustancia gris en el lóbulo occipital es consistente con un estudio neuropatológico *post-mortem* realizado recientemente en tejido cerebral de un paciente de SCA7 con impedimentos visuales que encontró extensa degeneración del cerebelo y otras regiones de la base del cerebro (Rb y cols, 2008), en particular, encontró degeneración de los cuerpos geniculares laterales, hallazgo que no fue reportado en un estudio similar en el caso de un paciente que no presentaba impedimentos visuales [Rüb *et al.*, 2005]. Estos resultados y los presentados aquí parecen sugerir que los cambios en los cuerpos geniculados laterales, las radiaciones ópticas y la corteza occipital pueden ser resultado de una degeneración transneuronal que se manifiestan

conforme progresa la enfermedad.

Utilizando el anticuerpo 1C2 dirigido a la expansión poliglutamática característica en la SCA7, [Holmberg *et al.*, 1998] encontraron inclusiones intranucleares en neuronas en la corteza motora y visual, ínsula y el lóbulo temporal medial, lo que sugiere que la degeneración encontrada en estas regiones puede ser debido a un efecto directo de la enfermedad, ya que estudios similares en modelos de Huntington en ratones transgénicos han mostrado que las inclusiones nucleares pueden ocurrir previas a la degeneración neuronal [Davies *et al.*, 1997]. Es interesante notar que la disminución de la *FA* en radiaciones ópticas, tracto corticoespinal y cuerpo callos correlaciona con los años desde el inicio de los síntomas, sugiriendo que la evolución de los síntomas, principalmente visuales y piramidales, se debe a la degradación de los tractos nerviosos.

2.11.5. Conclusión.

Se presentó evidencia obtenida *in vivo* de cambios estructurales en sustancia gris y blanca en cerebro y cerebelo de pacientes con SCA7, cambios que van mas allá de la reducción de volumen cerebelar y del puente [Alcauter *et al.*, 2011]. Estos hallazgos pueden contribuir al mejor entendimiento de la sintomatología y transcurso de esta enfermedad que tanto afecta a los pacientes que la sufren.

Más allá de la importancia de los nuevos resultados respecto a la enfermedad SCA7, este trabajo demostró que los métodos utilizados no sólo son sensibles a los mayores cambios neurodegenerativos conocidos en esta enfermedad y visibles en imagen convencional, sino que tiene sensibilidad suficiente para encontrar cambios no reportados anteriormente, en parte por la factibilidad de estudiar varios pacientes de forma no invasiva pero también debido a que las técnicas aquí utilizadas son sensibles a los cambios microestructurales que pueden estar ocurriendo en el tejido afectado y no visibles

en la imagen radiológica convencional.

Capítulo 3

Resultados

Se muestran a continuación los resultados de comparar imágenes de fracción anisotrópica, coeficiente aparente de difusión longitudinal y transversal a la dirección de mayor difusión, entre el grupo de pacientes y grupo control. Las imágenes muestran aquellas regiones donde los valores del grupo de pacientes fueron menores ($\rho < 0,05$, corregida) respecto al grupo control.

La edad de los participantes no mostró diferencias significativas al compararse entre grupos mediante una prueba t de dos colas para grupos no pareados ($\rho = 0,58$).

La Figura 3.1 muestra el esqueleto de sustancia blanca para el análisis entre los grupos pacientes y control. El análisis se realiza sobre los voxels de esta estructura que tiene la misma distribución espacial en todos los sujetos pero contiene los datos de cada sujeto.

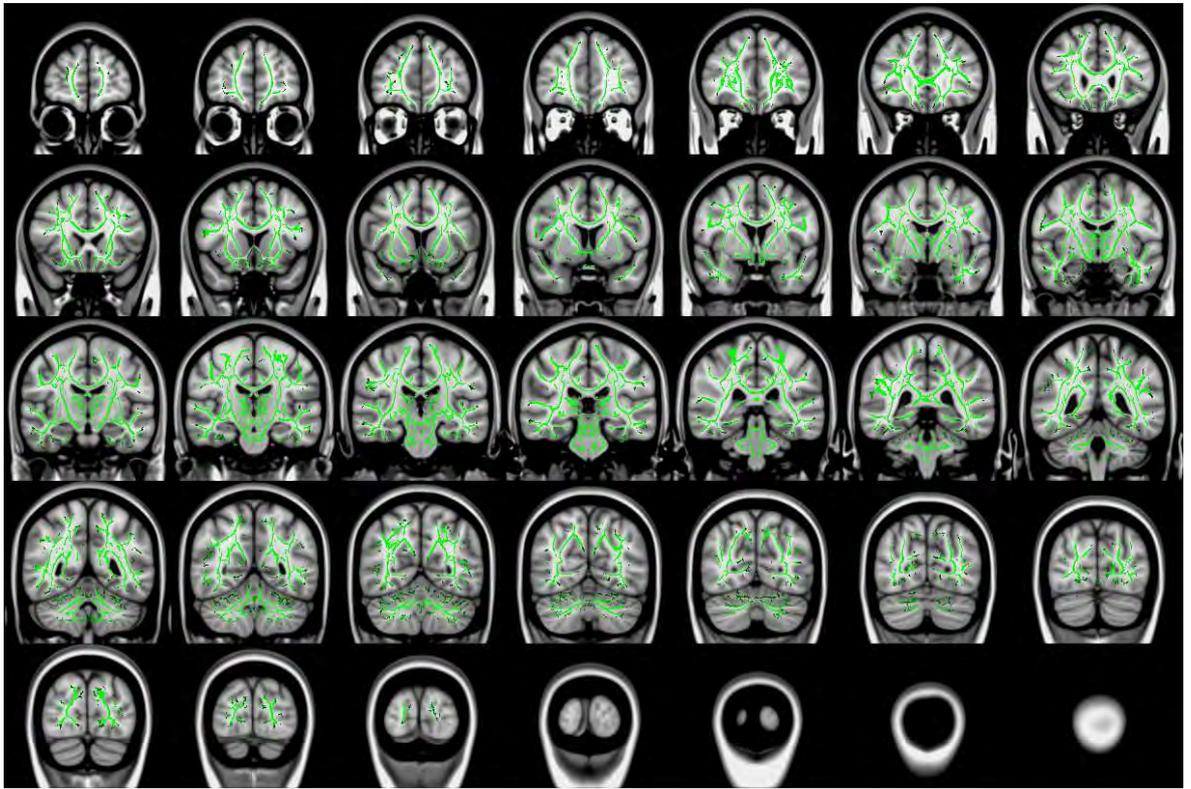


Figura 3.1: Skeleton (verde) representativo de los participantes del estudio, controles y pacientes, proyectado sobre el atlas T1MNI152 del Instituto Neurológico de Montreal.

3.1. Propiedades de difusión.

Se encontró disminución de la fracción de anisotropía en la sustancia blanca de varias regiones, siendo predominante en el hemisferio contralateral al miembro amputado (Figuras 3.2 a 3.5). Entre las regiones con disminución de FA en los pacientes se encuentra la sustancia blanca próxima a las cortezas somatosensorial y motora primarias mediales en ambos hemisferios, que corresponden a la representación de los miembros inferiores de acuerdo al homúnculo de Penfield [Penfield y Boldrey, 1937; Pasaye *et al.*, 2010], corona radiada bilateral y cuerpo caloso del lóbulo parietal y parte posterior del lóbulo frontal, cápsula externa y brazo posterior de la cápsula interna del hemisferio contralateral, pedúnculos cerebrales, sustancia blanca cerebelar y del tallo cerebral incluyendo pedúnculos cerebelares, sustancia blanca de los lóbulos occipitales y del polo

temporal contralateral. No se encontraron regiones con aumento de la FA en pacientes respecto a los controles.

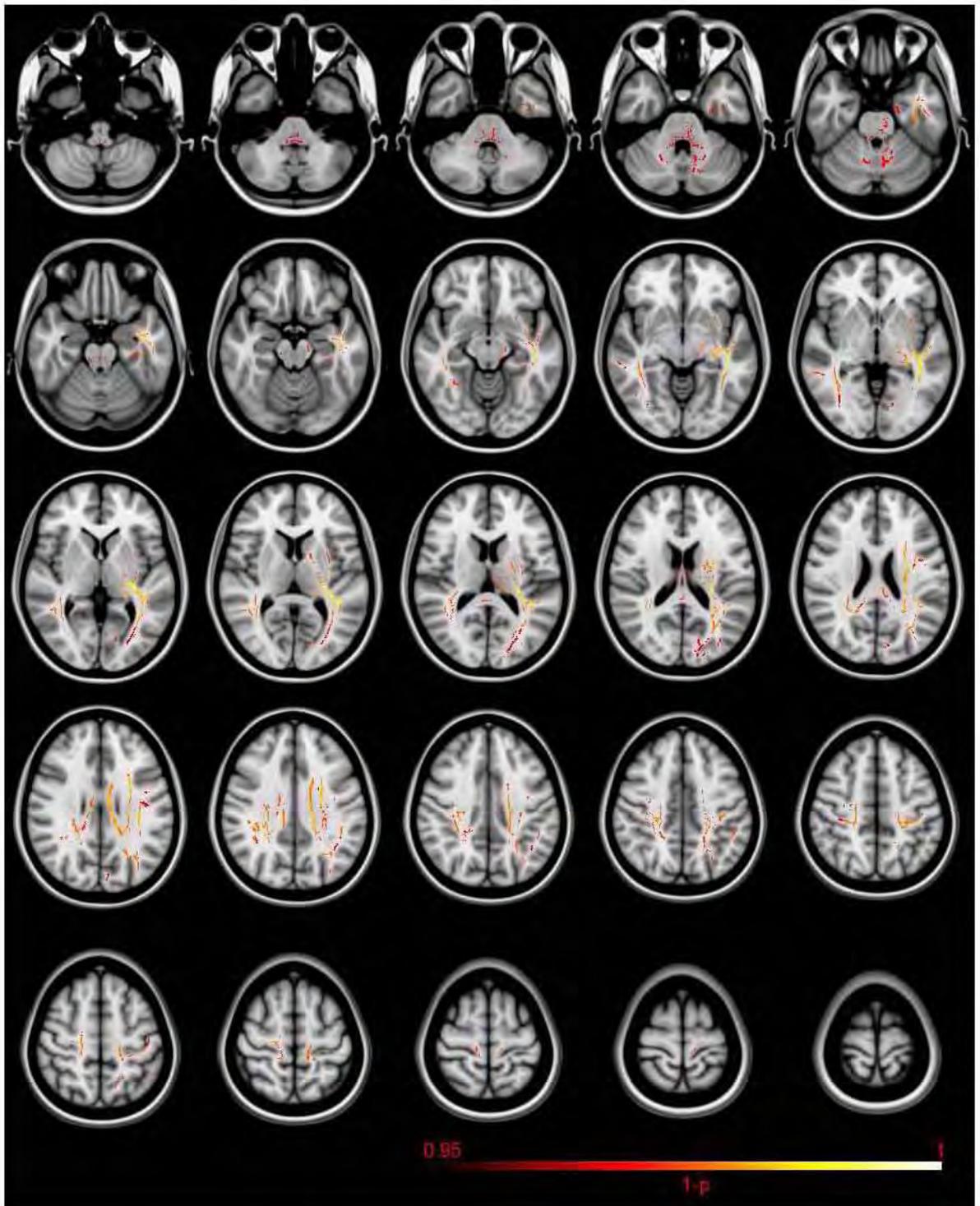


Figura 3.2: Proyecciones axiales que muestran las regiones de la sustancia blanca con disminución de la fracción anisotrópica (rojo-amarillo, $\rho < 0,05$, corregida) en pacientes amputados. El hemisferio mostrado a la derecha en la imagen corresponde al hemisferio contralateral al miembro amputado.

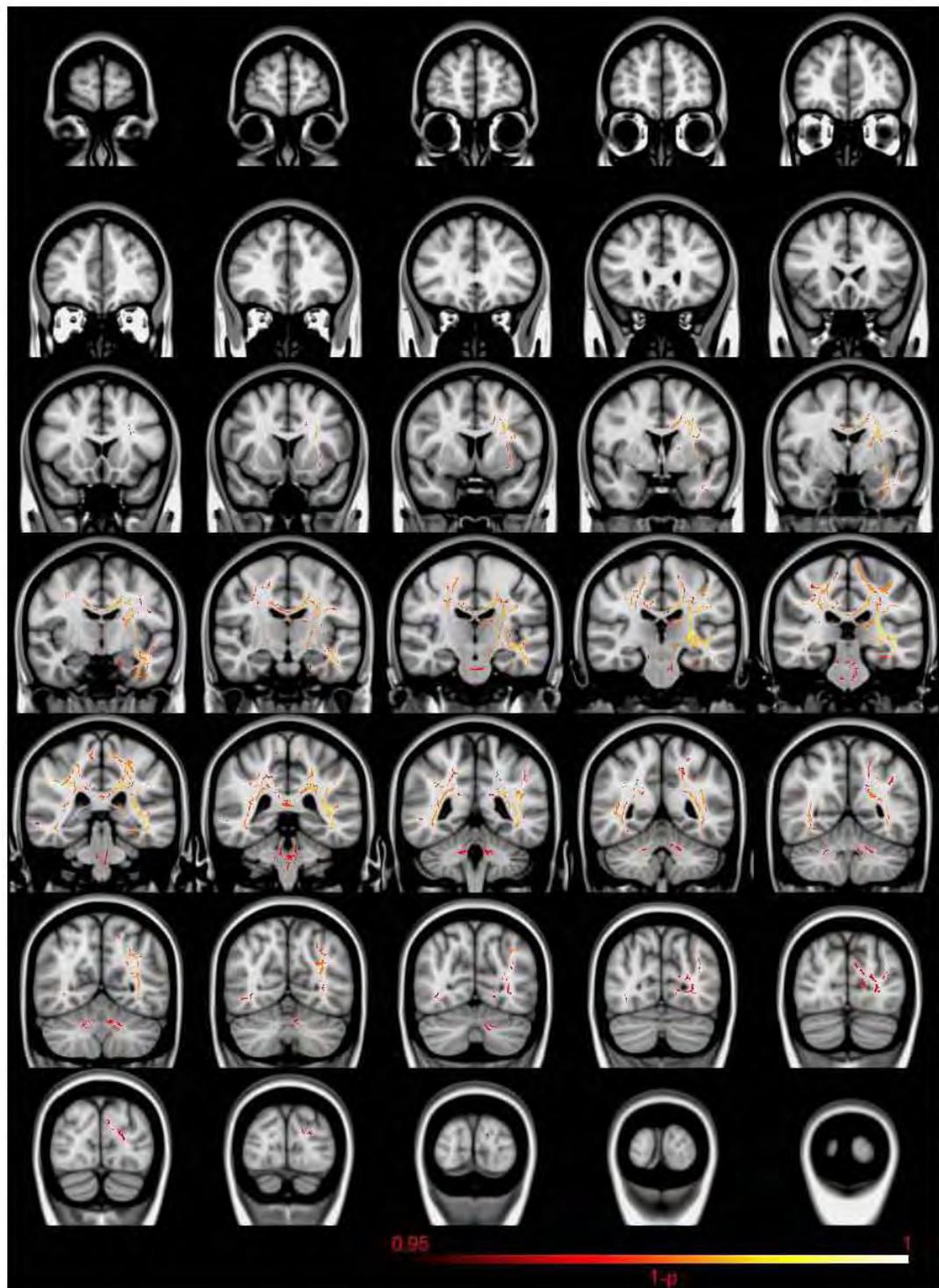


Figura 3.3: Proyecciones coronales que muestran las regiones de la sustancia blanca con disminución de la fracción anisotrópica (rojo-amarillo, $p < 0,05$, corregida) en pacientes amputados. El hemisferio mostrado a la derecha en la imagen corresponde al hemisferio contralateral al miembro amputado.

La Figura 3.4 muestra la relación de las regiones que mostraron diferencias significativas con el tracto corticoespinal definido por el atlas histológico de Juelich [Eickhoff *et al.*, 2007], y el atlas de tractografía de la Universidad John Hopkins [Mori *et al.*, 2008].

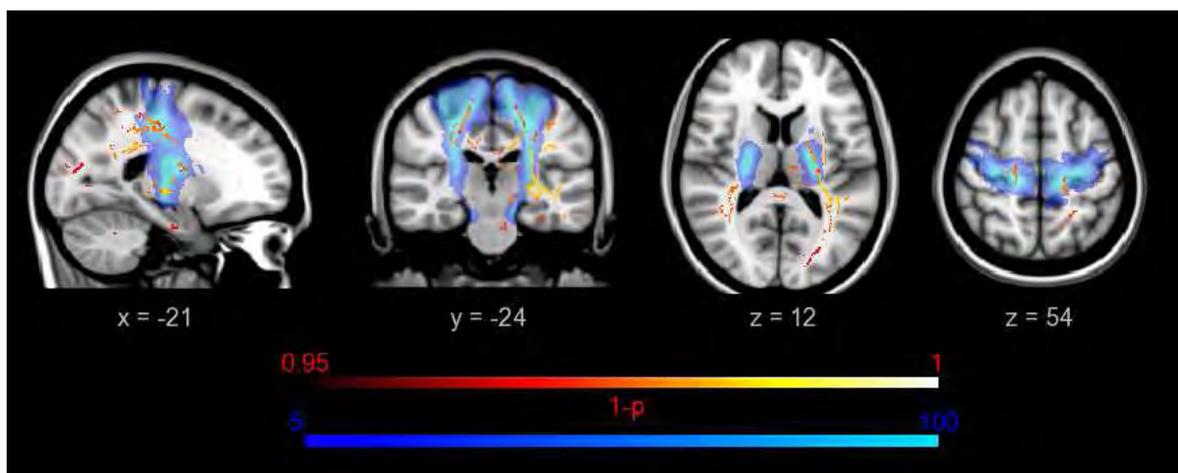


Figura 3.4: Regiones de la sustancia blanca con disminución de la fracción anisotrópica (rojo-amarillo, $\rho < 0,05$, corregida) en pacientes amputados. Se muestra en azul el tracto corticoespinal del atlas probabilístico de Julich, la escala representa el valor probabilístico del atlas. El hemisferio mostrado a la derecha en la imagen corresponde al hemisferio contralateral al miembro amputado. Las coordenadas representan el nivel del corte en el atlas T1MNI152 del Instituto Neurológico de Montreal.

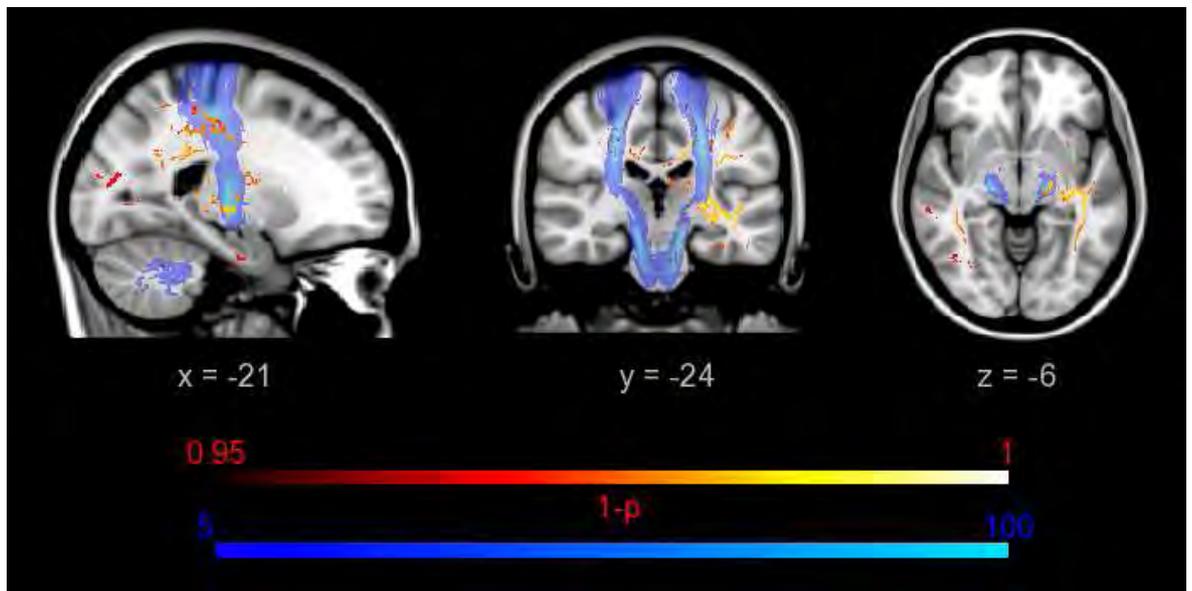


Figura 3.5: Regiones de la sustancia blanca con disminución de la fracción anisotrópica (rojo-amarillo, $\rho < 0,05$, corregida) en pacientes amputados. Se muestra en azul el tracto corticoespinal del atlas probabilístico de Tractografía de la Universidad John Hopkins, la escala representa el valor probabilístico del atlas. El hemisferio mostrado a la derecha en la imagen corresponde al hemisferio contralateral al miembro amputado. Las coordenadas representan el nivel del corte en el atlas T1MNI152 del Instituto Neurológico de Montreal.

Los mapas de L1, el coeficiente aparente de difusión a lo largo de la dirección principal de difusión, cuya disminución está relacionada con la afectación de la integridad axonal, mostraron diferencias en la corona radiada del hemisferio ipsilateral al lado de amputación (Figura 3.5). No se encontraron regiones con aumento de L1 en el grupo de pacientes en comparación con el grupo control.

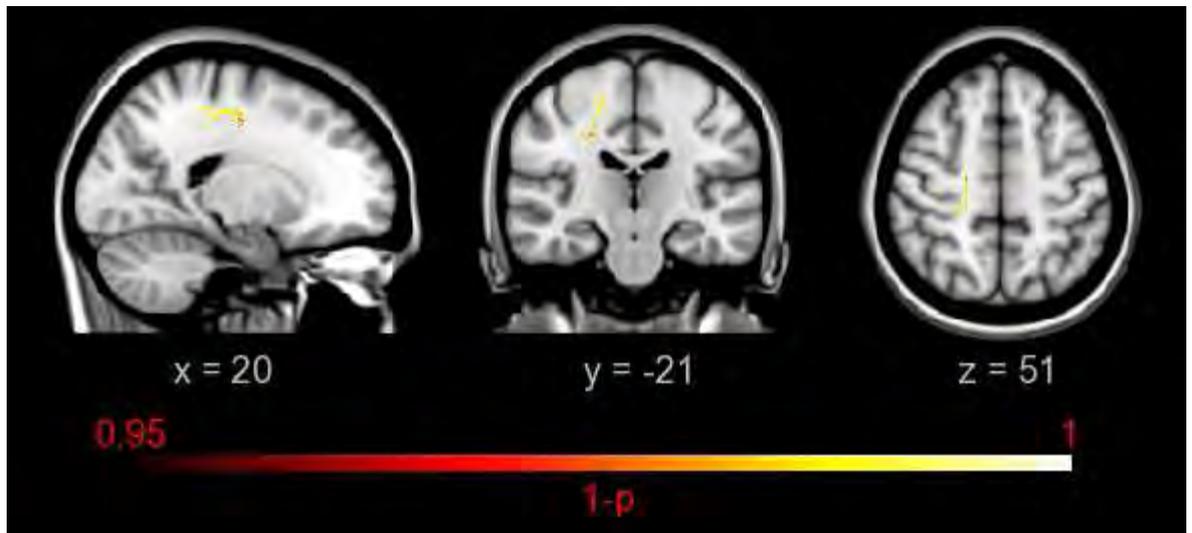


Figura 3.6: Regiones de la sustancia blanca con disminución del coeficiente aparente de difusión a lo largo de la dirección principal de difusión (rojo-amarillo, $\rho < 0,05$, corregida) en pacientes amputados. El hemisferio mostrado a la derecha en la imagen corresponde al hemisferio contralateral al miembro amputado. Las coordenadas representan el nivel del corte en el atlas T1MNI152 del Instituto Neurológico de Montreal.

Los mapas de L_t , el coeficiente aparente de difusión en la dirección transversal a la dirección principal de difusión, cuyo aumento se relaciona con deterioro de la integridad de la mielina, mostraron aumento en el grupo pacientes en la mayoría de las regiones en que la FA mostró disminución, excepto la corona radiada en el hemisferio ipsilateral (Figura 3.7). También se encontró un aumento significativo de L_t en cuerpo calloso del lóbulo prefrontal, y en la sustancia blanca próxima al cíngulo anterior (Figura 3.7), regiones que no mostraron disminución significativa de la FA (Figura 3.2). No se encontraron regiones con disminución de L_t en el grupo de pacientes.

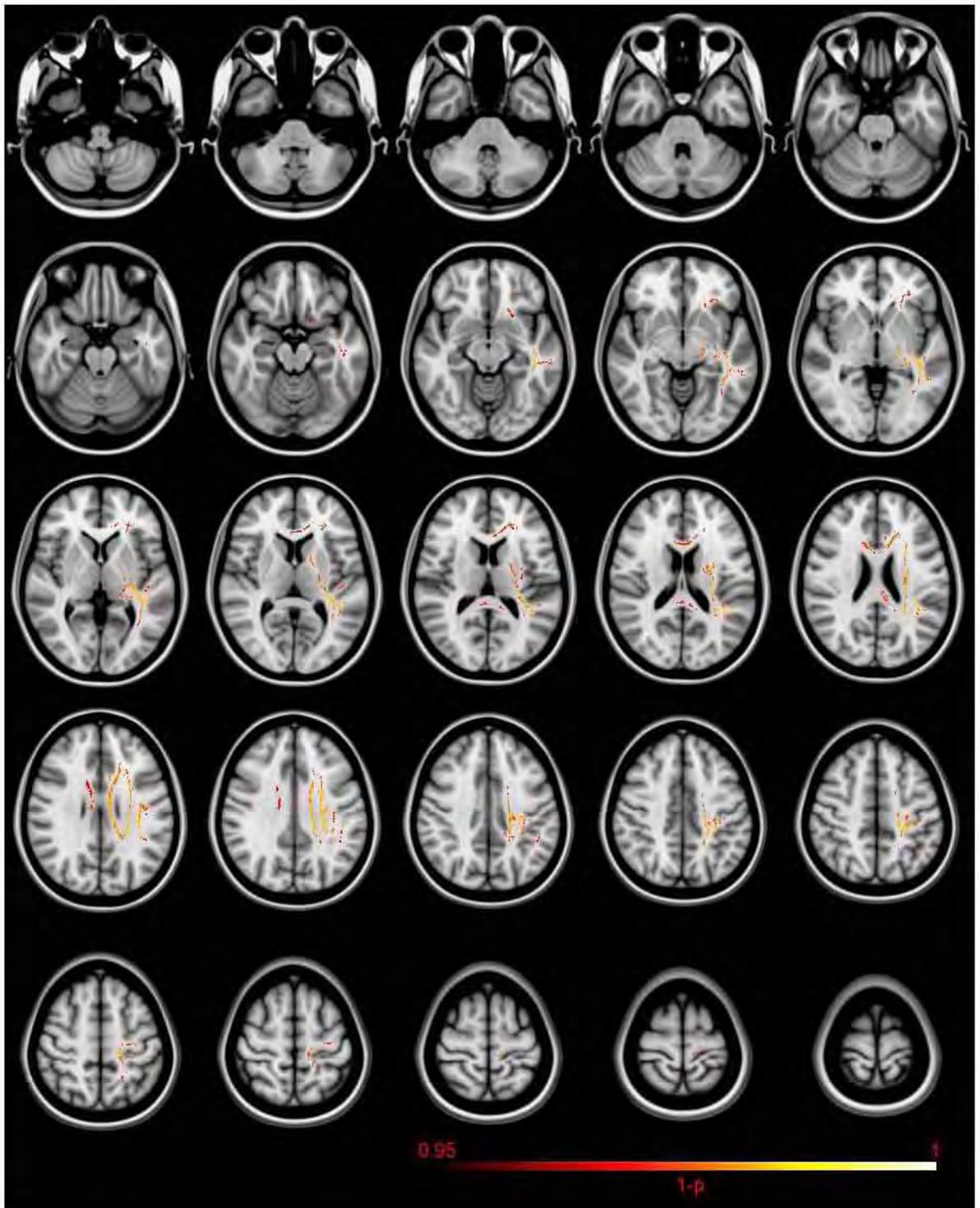


Figura 3.7: Proyecciones axiales que muestran las regiones de la sustancia blanca con aumento del coeficiente de difusión transversal, L_t (rojo-amarillo, $\rho < 0,05$, corregida) en pacientes amputados. El hemisferio mostrado a la derecha en la imagen corresponde al hemisferio contralateral al miembro amputado.

3.2. Sustancia Gris.

El análisis de volumen de sustancia gris mediante VBM no mostró diferencias entre los grupos con $\rho < 0,05$, corregida. El mapa de resultados de VBM con $\rho < 0,001$, sin corregir, mostró regiones con una posible disminución del volumen de sustancia gris en los pacientes respecto al grupo control, entre ellas el giro precentral y postcentral contralaterales, lóbulo occipital y prefrontal bilaterales y corteza del cerebelo ipsilateral (Figuras 3.8 y 3.9). No se encontraron regiones con mayor volumen de sustancia gris en el grupo de pacientes comparado con el grupo control. La Figura 3.9 muestra la relación entre los cambios en sustancia gris y sustancia blanca.

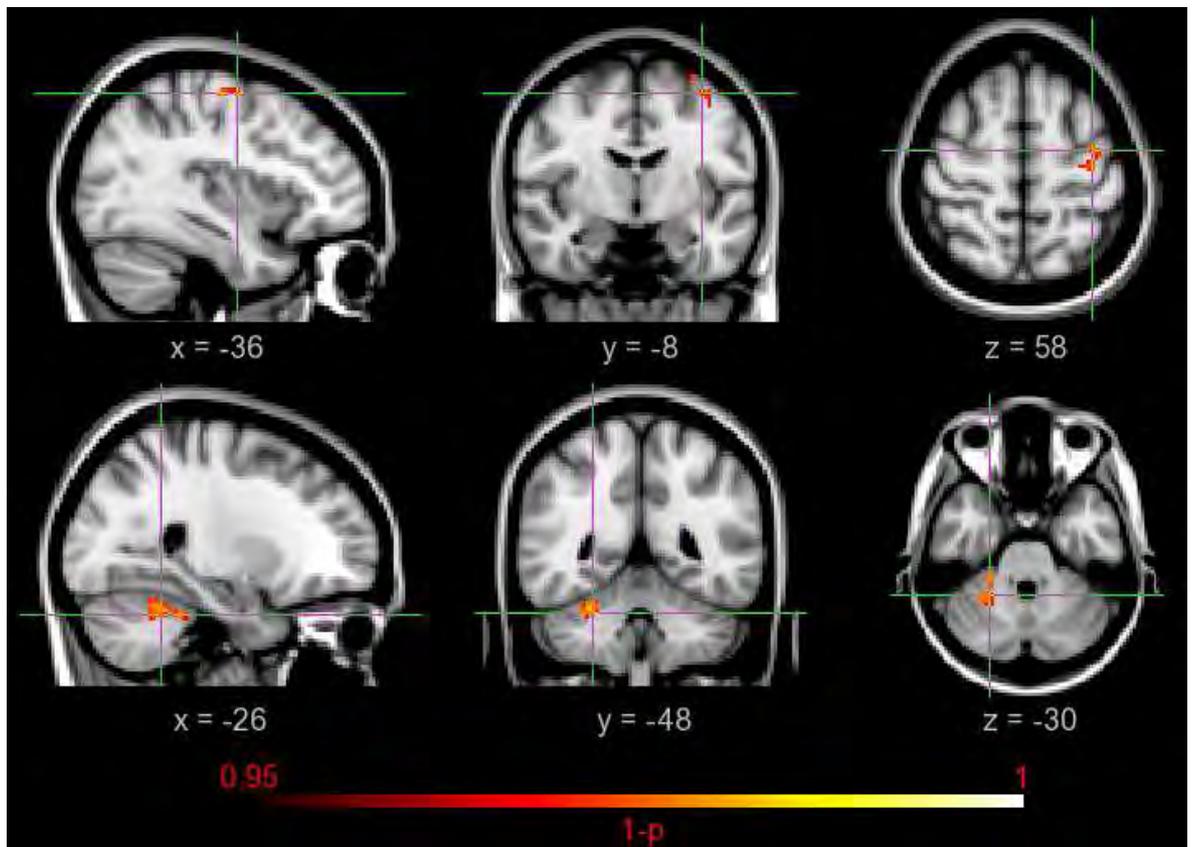


Figura 3.8: Regiones de sustancia gris con disminución de sustancia gris (rojo-amarillo, $\rho < 0,001$, sin corregir) en pacientes amputados. El hemisferio mostrado a la derecha en la imagen corresponde al hemisferio contralateral al miembro amputado. Las coordenadas representan el nivel del corte en el atlas T1MNI152 del Instituto Neurológico de Montreal.

3.3. Correlaciones.

No hubo resultados significativos ($\rho < 0,05$, corregida) para los análisis de correlación entre el número de meses desde la amputación hasta el estudio de imagen y los parámetros de difusión (FA , $L1$, Lt) y el volumen de sustancia gris, utilizando la edad de los pacientes como variable confusoria (Cuadro 2.8).

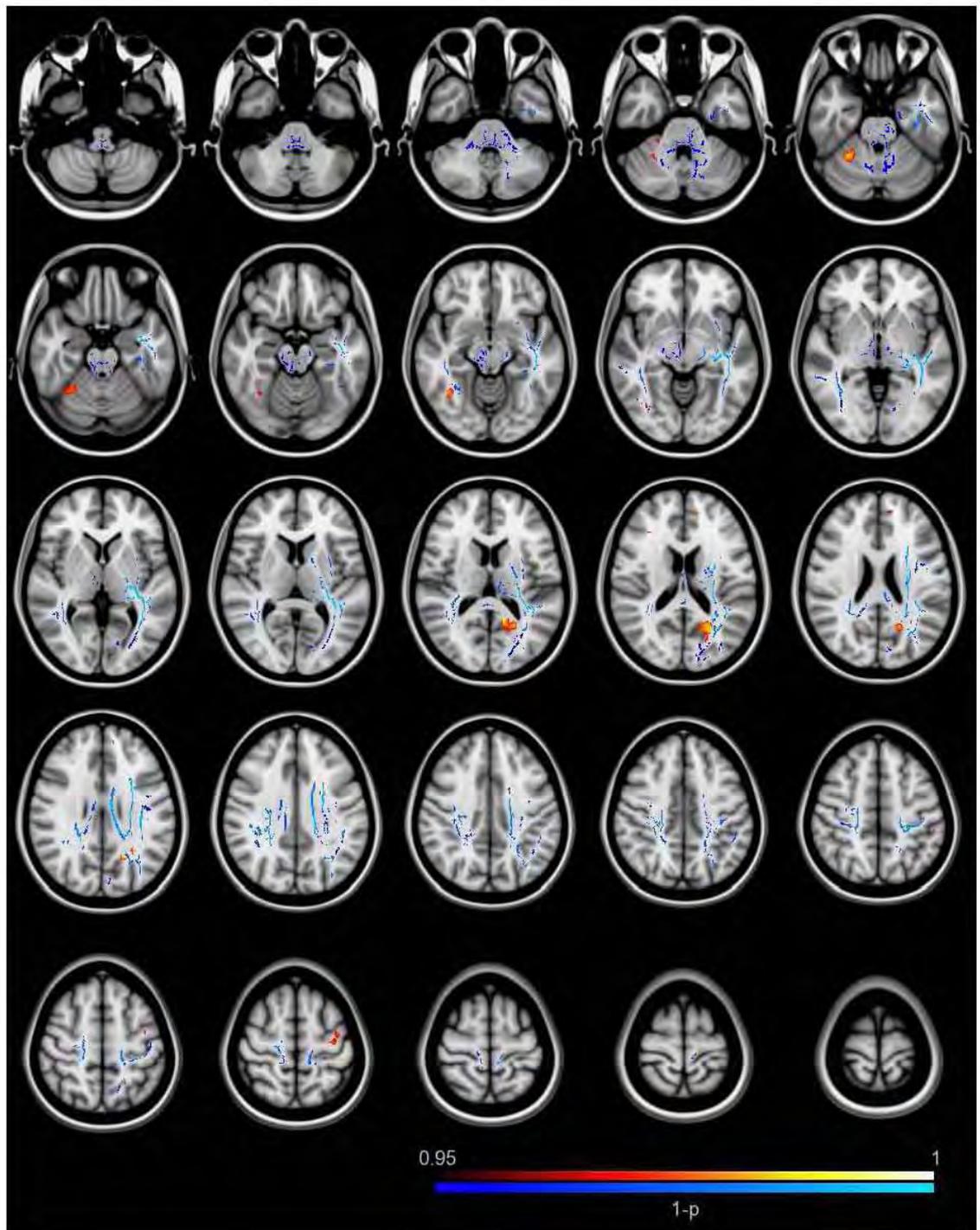


Figura 3.9: Proyecciones axiales que muestran las regiones de la sustancia blanca con disminución de la fracción anisotrópica (azul, $\rho < 0,05$, corregida) y disminución de volumen de sustancia gris (rojo-amarillo, $\rho < 0,001$, sin corregir) en pacientes amputados. El hemisferio mostrado a la derecha en la imagen corresponde al hemisferio contralateral al miembro amputado.

Capítulo 4

Discusión y conclusiones.

Los resultados muestran una disminución significativa de la fracción de anisotropía en varias regiones de la sustancia blanca de los pacientes amputados. La mayoría de esas regiones están asociadas con el tracto corticoespinal (Figuras 3.4 y 3.5), otras regiones incluyen la sustancia blanca del lóbulo parietal posterior, el cerebelo y tallo cerebral, pero también hay otras regiones que no están involucradas directamente con las vías somatosensoriales y motoras primarias, como la sustancia blanca del lóbulo temporal y del lóbulo occipital (Figura 3.2). Los cambios en sustancia gris no sobrevivieron el escrutinio de la corrección por múltiples comparaciones y deben considerarse como una posible tendencia, sin embargo, es interesante que incluye regiones del giro prefrontal contralateral a la amputación y la región anterior del cerebelo ipsilateral a la amputación.

Los cambios de la FA en el tracto corticoespinal son acordes con nuestra hipótesis: *La fracción anisotrópica en pacientes amputados será significativamente menor que en los sujetos control, principalmente en el tracto corticoespinal hacia la corteza somatosensorial primaria medial y descendente de la corteza motora primaria medial.* Esta hipótesis fue planteada en base a los estudios previos que han encontrado cambios estructurales en núcleos que forman parte de las vías somatosensoriales primarias hacia S1 tras la amputación o deafferentación de un miembro en monos y gatos [Jones y Pons,

1998; Woods *et al.*, 2000; Avendano y Dykes, 1996] usando técnicas inmunohistoquímicas. [Jones y Pons, 1998] encontraron atrofia transneuronal en el núcleo cuneiforme del tallo cerebral y en el núcleo ventral posterolateral del tálamo en 8 macacos que sufrieron deaferentación de un miembro superior por más de 12 años. En los que se encontró infiltración de células gliales y disminución del volumen de las células neuronales de 12 a 45 %, pero se encontró una sobrevivencia neuronal del 85 al 95 % [Woods *et al.*, 2000]. En base a nuestros resultados y las referencias aquí mencionadas podemos suponer que la disminución de la *FA* en las vías ascendentes hacia la corteza somatosensorial primaria y hacia el cerebelo, son el resultado de una degeneración transneuronal anterógrada.

Es interesante que en el único estudio reportado en pacientes amputados *in vivo* [Draganski *et al.*, 2006], no se encontraron resultados concluyentes en la corteza somatosensorial primaria, probablemente debido a la selección de sus pacientes, que incluía amputaciones de miembros superiores y/o inferiores. Aunque nuestro caso se basa en el análisis de propiedades de difusión en la sustancia blanca, la selección de pacientes amputados de miembro inferior únicamente pudo haber facilitado la detección en los cambios de *FA* próximos a las cortezas somatosensorial y motoras primarias.

Aunque los estudios en monos amputados se han enfocado principalmente en los cambios ocurridos en las vías aferentes, existen reportes de pacientes y monos que han sufrido lesiones medulares controladas o por accidente, que han mostrado cambios en la corteza motora primaria y vías descendentes. [Wannier *et al.*, 2005] encontraron que posterior a la disrupción del tracto corticoespinal de forma unilateral en dos monos macacos, no hubo cambios significativos en el número de células piramidales en M1, pero reportaron que los somas sobrevivientes en M1 se encogieron significativamente. Sin embargo, [Pernet y Hepp-Reymond, 1975] mostraron que posterior al seccionamiento unilateral de la vía piramidal en 3 macacos adultos, se perdieron aproximadamente el 70 % de las células piramidales en la corteza motora contralateral. De modo que la degeneración retrógrada de las vías motoras descendente se ha observado como una

disminución del volumen de las somas en M1 [Wannier *et al.*, 2005] y en algunos casos como una disminución significativa en el número de cuerpos neuronales en M1 [Levin y Beadford, 1938; Tower, 1940; Lassek, 1942; Pernet y Hepp-Reymond, 1975; Hains *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006]. Sin embargo, no se han reportado cambios similares en pacientes con amputación.

Los cambios en las vías descendentes en los pacientes amputados podrían ser el resultado de una degeneración transneuronal anterógrada por recibir la mayoría de sus aferencias desde la corteza somatosensorial primaria, o bien, una degeneración transneuronal retrógrada debido a la lesión de las vías motoras periféricas. Posterior a la amputación de un miembro o lesiones medulares completas, se ha observado una reorganización funcional en los sistemas somatosensoriales y la corteza motora primaria en humanos y primates [Merzenich *et al.*, 1983; Kaas *et al.*, 1997; Jain, 2002; Pasaye *et al.*, 2010; Tandon *et al.*, 2009]. Sin embargo, pocos estudios han buscado la reorganización de la corteza motora primaria como consecuencia de lesiones medulares de las vías ascendentes [Asanuma y Arissian, 1984; Favorov *et al.*, 1988; Kambi *et al.*, 2011], sin que ésta se haya demostrado en ninguno de ellos a pesar de ser evidente la reorganización en la corteza somatosensorial primaria [Kambi *et al.*, 2011]. De modo que en la ausencia de lesiones a las vías motoras directamente, no se observa una reorganización cortical en M1, por lo que los cambios estructurales en M1 y sus fibras podrían deberse a una degeneración transneuronal retrógrada más que anterógrada de S1 a M1. O bien una combinación de ambas, pues la lesión a las vías sensitivas aunque no modifica la organización topográfica, sí aumenta los umbrales de activación de la corteza motora primaria de las regiones deaferentadas [Favorov *et al.*, 1988; Kambi *et al.*, 2011].

Los resultados en los mapas de L1 y Lt, muestran que la disminución de la FA en los pacientes se debe principalmente a un aumento en el coeficiente aparente de difusión transversal a las fibras, lo cual se ha asociado con degeneración de las capas de mielina [Beaulieu, 2009]. Incluso se encontraron regiones con aumento de Lt que

no mostraron cambios significativos de FA , como en la sustancia blanca próxima al cíngulo anterior y en la rodilla del cuerpo caloso. En la sustancia blanca de la corona radiada ipsilateral a la amputación, el cambio principal de la FA se puede asociar con una disminución del coeficiente aparente de difusión longitudinal al trayecto de las fibras, $L1$, que se asocia con una disminución en la integridad del axón mismo [Beaulieu, 2009]. [Concha *et al.*, 2006], estudiaron las propiedades de difusión en el cuerpo caloso en pacientes con epilepsia que no responden a tratamiento y les realizaron callosotomía en un intento por disminuir sus crisis. Las mediciones de FA a la primer semana y a los dos meses fueron similares en el decremento mostrado, pero la medición más temprana fue resultado de una disminución de la difusión paralela ($L1$), mientras que, el aumento de la difusión transversal (Lt) fue la responsable del decremento de FA en la medición más tardía. Considerando estos resultados podemos suponer que los cambios en la corona radiada ipsilateral a la amputación, donde el decremento de $L1$ es el principal responsable de la disminución de la FA , son más recientes que aquéllos en el resto de las regiones donde Lt sufrió los cambios más significativos. Estos resultados sugieren que los cambios en la corona radiada del hemisferio ipsilateral podrían ser efecto de la degeneración transneuronal iniciada en el hemisferio contralateral a la amputación. Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre los cambios en FA , $L1$ y Lt , con el tiempo de amputación.

[Taylor *et al.*, 2009] estudiaron los cambios estructurales en cerebro en pacientes con denervación y posterior reparación del nervio mediano que incluye vías aferentes y eferentes hacia el miembro superior. Utilizaron técnicas similares a las del presente estudio, encontraron reducción de sustancia gris en varias regiones cerebrales, incluyendo las cortezas somatosensoriales primaria y secundarias. Sin embargo, no reportan cambios en la fracción anisotrópica en las vías hacia la corteza $S1$, únicamente en la sustancia blanca próxima a la ínsula derecha, similares a los cambios reportados en este estudio en la cápsula externa. Se cree que la ínsula juega un papel importante en la integración de información multimodal importante para las funciones sensitivo-

motoras, emocionales y cognitivas [Critchley, 2004; Craig, 2007]. Algunos estudios han reportado activación de la ínsula en respuesta a la estimulación táctil [Gelnar *et al.*, 1998; Downar *et al.*, 2002] y estudios con trazadores anatómicos han demostrado en primates que la ínsula está recíprocamente conectada con los lóbulos frontal, parietal y el lóbulo temporal [Augustine, 1996], una región en la que encontramos disminución de la *FA*. Los cambios en las propiedades de difusión en sustancia blanca del lóbulo occipital podrían estar relacionados con una afectación a las capas de mielina de las mismas. Podría estar relacionada con las vías de integración de la información visual con la información somatosensorial y motora [Helbig *et al.*, 2011].

Es interesante mencionar que los cambios estructurales en sustancia gris en esta muestra de pacientes amputados (Figura 3.7) no sobrevivió la corrección por comparaciones múltiples, lo que nos muestra que los cambios en sustancia gris son menos evidentes que aquéllos ocurridos en sustancia blanca. Esto se puede deber a que el número de pacientes es pequeño para detectar los cambios encontrados por [Draganski *et al.*, 2006], o que los cambios en la disminución de volumen en sustancia gris como resultado de la disminución del soma de las neuronas afectadas se encuentre compensado con el aumento de dendritas nuevas de las regiones adyacentes o con la formación de nuevo tejido glial [Jones y Pons, 1998; Woods *et al.*, 2000].

En un estudio reciente, [Graziano y Jones, 2009], estudiaron 10 macacos con deaferentación controlada del núcleo cuneiforme, encontraron que la atrofia transneuronal afecta la morfología de los axones lemniscales y de los núcleos tálamo-corticales mucho antes de que ocurra el encogimiento de sus somas deaferentados en los núcleos de la columna dorsal o el tálamo. Este encogimiento, con alguna pérdida de neuronas, ha sido observado en condiciones similares, posterior a los 10 años de que ocurra la deaferentación [Woods *et al.*, 2000]. El hecho de que no encontremos resultados significativos en la disminución del volumen de sustancia gris en nuestros pacientes podría explicarse por la variabilidad del tiempo de amputación en los pacientes participantes,

ya que sólo seis de ellos tienen tiempos de amputación mayores a los 10 años, y más aun, los cambios observados por lesiones en las columnas dorsales podrían ocurrir a mayor velocidad que aquéllos debidos a la amputación del miembro inferior, haciendo menos evidentes estos últimos en nuestro estudio.

4.1. Conclusiones.

El estudio de las propiedades de difusión del agua en el tejido cerebral mediante la imagen por tensor de difusión es sensible a los cambios que ocurren a nivel central posterior a la amputación a nivel transfemoral de un miembro pélvico.

Los cambios en las propiedades de difusión de las vías aferentes parecen ocurrir por la degeneración transneuronal anterógrada, expresada como una disminución de la integridad de la mielinización.

Los cambios en las propiedades de difusión de la vía somatomotora parecen ocurrir por la degeneración transneuronal retrógrada, expresada como una disminución de la integridad de la mielinización.

Los cambios en sustancia gris no son concluyentes, pero muestran una tendencia de disminución del volumen de sustancia gris en el lóbulo anterior del cerebelo ipsilateral a la amputación y en el giro precentral contralateral a la amputación.

Bibliografía

- Alcauter, S., Barrios, F. A., Díaz, R., y Fernández-Ruiz, J. (2011). Gray and white matter alterations in spinocerebellar ataxia type 7: An in vivo DTI and VBM study. *Neuroimage*.
- Asanuma, H. y Arissian, K. (1984). Experiments on functional role of peripheral input to motor cortex during voluntary movements in the monkey. *Journal of Neurophysiology*, **52**(2), 212–227.
- Ashburner, J. y Friston, K. J. (2000). Voxel-based morphometry—the methods. *NeuroImage*, **11**(6 Pt 1), 805–821. PMID: 10860804.
- Augustine, J. R. (1996). Circuitry and functional aspects of the insular lobe in primates including humans. *Brain Research Reviews*, **22**(3), 229–244.
- Avendano, C. y Dykes, R. W. (1996). Evolution of morphological and histochemical changes in the adult cat cuneate nucleus following forelimb denervation. *The Journal of Comparative Neurology*, **370**(4), 479–490. {PMID:} 8807449.
- Bang, O. Y., Huh, K., Lee, P. H., y Kim, H. J. (2003). Clinical and neuroradiological features of patients with spinocerebellar ataxias from korean kindreds. *Archives of Neurology*, **60**(11), 1566–1574. PMID: 14623729.
- Basser, P. J. y Pierpaoli, C. (1996). Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI. *Journal of Magnetic Resonance-Series B*, **111**(3), 209–219.

- Beaud, M., Schmidlin, E., Wannier, T., Freund, P., Bloch, J., Mir, A., Schwab, M. E., y Rouiller, E. M. (2008). Anti-Nogo-A antibody treatment does not prevent cell body shrinkage in the motor cortex in adult monkeys subjected to unilateral cervical cord lesion. *BMC Neuroscience*, **9**, 5. PMID: 18194520.
- Beaulieu, C. (2002). The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review. *NMR in Biomedicine*, **15**(7-8), 435–455. PMID: 12489094.
- Beaulieu, C. (2009). The biological basis of diffusion anisotropy. *Diffusion MRI: From quantitative measurement to in-vivo neuroanatomy*. London: Elsevier, pages 105–26.
- Beaulieu, C. y Allen, P. S. (1994). Water diffusion in the giant axon of the squid: implications for diffusion-weighted MRI of the nervous system. *Magnetic resonance in medicine*, **32**(5), 579–583.
- Berman, J. I., Mukherjee, P., Partridge, S. C., Miller, S. P., Ferriero, D. M., Barkovich, A. J., Vigneron, D. B., y Henry, R. G. (2005). Quantitative diffusion tensor MRI fiber tractography of sensorimotor white matter development in premature infants. *Neuroimage*, **27**(4), 862–871.
- Bihan, D. L., Breton, E., Lallemand, D., Grenier, P., Cabanis, E., y Laval-Jeantet, M. (1986). MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology*, **161**(2), 401–407. PMID: 3763909.
- Bihan, D. L., Turner, R., y Douek, P. (1993). Is water diffusion restricted in human brain white matter? an echo-planar NMR imaging study. *Neuroreport*, **4**(7), 887.
- Brown, A. y Lasek, R. J. (1990). *The cytoskeleton of the squid giant axon*. Plenum Press: New York.
- Brown, R. (1828). *A brief account of microscopical observations made... on the particles contained in the pollen of plants, and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies*.

- Buss, A., Brook, G. A., Kakulas, B., Martin, D., Franzen, R., Schoenen, J., Noth, J., y Schmitt, A. B. (2004). Gradual loss of myelin and formation of an astrocytic scar during wallerian degeneration in the human spinal cord. *Brain*, **127**(1), 34–44.
- Calford, M. B. y Tweedale, R. (1991a). Acute changes in cutaneous receptive fields in primary somatosensory cortex after digit denervation in adult flying fox. *Journal of Neurophysiology*, **65**(2), 178–187. PMID: 2016636.
- Calford, M. B. y Tweedale, R. (1991b). C-fibres provide a source of masking inhibition to primary somatosensory cortex. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, **243**(1308), 269–275. PMID: 1675804.
- Calford, M. B. y Tweedale, R. (1991c). Immediate expansion of receptive fields of neurons in area 3b of macaque monkeys after digit denervation. *Somatosensory & Motor Research*, **8**(3), 249–260. PMID: 1767621.
- Chenevert, T. L., Brunberg, J. A., y Pipe, J. G. (1990). Anisotropic diffusion in human white matter: demonstration with MR techniques in vivo. *Radiology*, **177**(2), 401.
- Cleveland, G. G., Chang, D. C., Hazlewood, C. F., y Rorschach, H. E. (1976). Nuclear magnetic resonance measurement of skeletal muscle: anisotropy of the diffusion coefficient of the intracellular water. *Biophysical Journal*, **16**(9), 1043–1053.
- Coggeshall, R. E., Lekan, H. A., Doubell, T. P., Allchorne, A., y Woolf, C. J. (1997). Central changes in primary afferent fibers following peripheral nerve lesions. *Neuroscience*, **77**(4), 1115–1122. PMID: 9130791.
- Concha, L., Gross, D. W., Wheatley, B. M., y Beaulieu, C. (2006). Diffusion tensor imaging of time-dependent axonal and myelin degradation after corpus callosotomy in epilepsy patients. *Neuroimage*, **32**(3), 1090–1099.
- Craig, A. D. (2007). Interoception and emotion: a neuroanatomical perspective. *Handbook of emotion*, pages 272–288.

- Crawley, A. P., Jurkiewicz, M. T., Yim, A., Heyn, S., Verrier, M. C., Fehlings, M. G., y Mikulis, D. J. (2004). Absence of localized grey matter volume changes in the motor cortex following spinal cord injury. *Brain research*, **1028**(1), 19–25.
- Critchley, H. D. (2004). The human cortex responds to an interoceptive challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(17), 6333.
- David, G., Dürr, A., Stevanin, G., Cancel, G., Abbas, N., Benomar, A., Belal, S., Lebre, A. S., Abada-Bendib, M., Grid, D., Holmberg, M., Yahyaoui, M., Hentati, F., Chkili, T., Agid, Y., y Brice, A. (1998). Molecular and clinical correlations in autosomal dominant cerebellar ataxia with progressive macular dystrophy (SCA7). *Human Molecular Genetics*, **7**(2), 165–170. PMID: 9425222.
- Davies, S., Turmaine, M., Cozens, B., Difiglia, M., Sharp, A., Ross, C., Scherzinger, E., Wanker, E., Mangiarini, L., y Bates, G. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, **90**(3), 537–548.
- Derbyshire, W. y Duff, I. D. (1974). NMR of agarose gels. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **57**, 243–254.
- D’ohlinger, S., Hauser, T., Borkert, J., Luft, A. R., y Schulz, J. B. (2008). Magnetic resonance imaging in spinocerebellar ataxias. *Cerebellum (London, England)*, **7**(2), 204–214. PMID: 18418677.
- Doran, M., Hajnal, J. V., Bruggen, N. V., King, M. D., Young, I. R., y Bydder, G. M. (1990). Normal and abnormal white matter tracts shown by MR imaging using directional diffusion weighted sequences. *Journal of computer assisted tomography*, **14**(6), 865.
- Downar, J., Crawley, A. P., Mikulis, D. J., y Davis, K. D. (2002). A cortical network

- sensitive to stimulus salience in a neutral behavioral context across multiple sensory modalities. *Journal of neurophysiology*, **87**(1), 615.
- Draganski, B., Moser, T., Lummel, N., Gänssbauer, S., Bogdahn, U., Haas, F., y May, A. (2006). Decrease of thalamic gray matter following limb amputation. *NeuroImage*, **31**(3), 951–957. PMID: 16520065.
- Eickhoff, S. B., Paus, T., Caspers, S., Grosbras, M. H., Evans, A. C., Zilles, K., y Amunts, K. (2007). Assignment of functional activations to probabilistic cytoarchitectonic areas revisited. *Neuroimage*, **36**(3), 511–521.
- Einstein, A. (1905). On the movement of small particles suspended in stationary liquids required by the molecular-kinetic theory of heat. *Annalen der physik*, **17**, 549–560.
- Enevoldson, T. P., Sanders, M. D., y Harding, A. E. (1994). Autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy. a clinical and genetic study of eight families. *Brain: A Journal of Neurology*, **117** (Pt 3), 445–460. PMID: 8032856.
- Favorov, O., Sakamoto, T., y Asanuma, H. (1988). Functional role of corticoperipheral loop circuits during voluntary movements in the monkey: a preferential bias theory. *The Journal of neuroscience*, **8**(9), 3266.
- Florence, S. L. y Kaas, J. H. (1995). Large-scale reorganization at multiple levels of the somatosensory pathway follows therapeutic amputation of the hand in monkeys. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **15**(12), 8083–8095. PMID: 8613744.
- Freund, P., Weiskopf, N., Ward, N. S., Hutton, C., Gall, A., Ciccarelli, O., Craggs, M., Friston, K., y Thompson, A. J. (2011). Disability, atrophy and cortical reorganization following spinal cord injury. *Brain: A Journal of Neurology*, **134**(Pt 6), 1610–1622. PMID: 21586596.

- Garden, G. A. y Spada, A. R. L. (2008). Molecular pathogenesis and cellular pathology of spinocerebellar ataxia type 7 neurodegeneration. *Cerebellum (London, England)*, **7**(2), 138–149. PMID: 18418675.
- Gelnar, P. A., Krauss, B. R., Szeverenyi, N. M., y Apkarian, A. V. (1998). Fingertip representation in the human somatosensory cortex: An fMRI study* 1. *Neuroimage*, **7**(4), 261–283.
- Goldby, F. (1957). A note on transneuronal atrophy in the human lateral geniculate body. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, **20**(3), 202–207. PMID: 13463620 PMCID: 497261.
- González-Santos, L., Mercadillo, R. E., Graff, A., y Barrios, F. A. (2007). Versión computarizada para la aplicación del listado de síntomas 90 (SCL 90) y del inventario de temperamento y carácter (ITC). *Salud Mental*, **30**(4), 31.
- Good, C. D., Johnsrude, I. S., Ashburner, J., Henson, R. N., Friston, K. J., y Frackowiak, R. S. (2001). A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. *NeuroImage*, **14**(1 Pt 1), 21–36. PMID: 11525331.
- Gouw, L. G., Digre, K. B., Harris, C. P., Haines, J. H., y Ptacek, L. J. (1994). Autosomal dominant cerebellar ataxia with retinal degeneration: clinical, neuropathologic, and genetic analysis of a large kindred. *Neurology*, **44**(8), 1441–1447. PMID: 8058146.
- Graziano, A. y Jones, E. G. (2009). Early withdrawal of axons from higher centers in response to peripheral somatosensory denervation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **29**(12), 3738–3748. PMID: 19321770.
- Gulani, V., Webb, A. G., Duncan, I. D., y Lauterbur, P. C. (2001). Apparent diffusion tensor measurements in myelin-deficient rat spinal cords. *Magnetic Resonance in Medicine*, **45**(2), 191–195.

- Hains, B. C., Black, J. A., y Waxman, S. G. (2003). Primary cortical motor neurons undergo apoptosis after axotomizing spinal cord injury. *The Journal of Comparative Neurology*, **462**(3), 328–341. PMID: 12794736.
- Hansen, J. R. (1971). Pulsed NMR study of water mobility in muscle and brain tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **230**(3), 482–486.
- Harsan, L. A., Poulet, P., Guignard, B., Parizel, N., Skoff, R. P., y Ghandour, M. S. (2007). Astrocytic hypertrophy in dysmyelination influences the diffusion anisotropy of white matter. *Journal of neuroscience research*, **85**(5), 935–944.
- Hayasaka, S. y Nichols, T. E. (2004). Combining voxel intensity and cluster extent with permutation test framework. *NeuroImage*, **23**(1), 54–63. PMID: 15325352.
- Helbig, H. B., Ernst, M. O., Ricciardi, E., Pietrini, P., Thielscher, A., Mayer, K. M., Schultz, J., y Noppeney, U. (2011). The neural mechanisms of reliability weighted integration of shape information from vision and touch. *NeuroImage*. PMID: 22001262.
- Holmberg, M., Duyckaerts, C., Durr, A., Cancel, G., Gourfinkel-An, I., Damier, P., Faucheux, B., Trottier, Y., Hirsch, E., Agid, Y., y Brice, A. (1998). Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions. *Hum. Mol. Genet.*, **7**(5), 913–918.
- Jain, N. (2002). Adult brain plasticity - what is revealed is exciting, what is hidden is critical. *Journal of Biosciences*, **27**(5), 439–442. PMID: 12381859.
- Jain, N., Catania, K. C., y Kaas, J. H. (1997). Deactivation and reactivation of somatosensory cortex after dorsal spinal cord injury. *Nature*, **386**(6624), 495–498.
- Jenkinson, M. y Smith, S. (2001). A global optimisation method for robust affine registration of brain images. *Medical Image Analysis*, **5**(2), 143–156. PMID: 11516708.

- Jenkinson, M., Bannister, P., Brady, M., y Smith, S. (2002). Improved optimization for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images. *NeuroImage*, **17**(2), 825–841. PMID: 12377157.
- J'obsis, G. J., Weber, J. W., Barth, P. G., Keizers, H., Baas, F., van Schooneveld, M. J., van Hilten, J. J., Troost, D., Geesink, H. H., y Bolhuis, P. A. (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia with retinal degeneration (ADCA II): clinical and neuropathological findings in two pedigrees and genetic linkage to 3p12-p21.1. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, **62**(4), 367–371. PMID: 9120450 PMCID: 1074093.
- Johansson, J., Forsgren, L., Sandgren, O., Brice, A., Holmgren, G., y Holmberg, M. (1998). Expanded CAG repeats in swedish spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) patients: effect of CAG repeat length on the clinical manifestation. *Human Molecular Genetics*, **7**(2), 171–176. PMID: 9425223.
- Jones, E. G. (2000). Cortical and subcortical contributions to Activity-Dependent plasticity in primate somatosensory cortex. *Annual Review of Neuroscience*, **23**(1), 1–37.
- Jones, E. G. y Pons, T. P. (1998). Thalamic and brainstem contributions to large-scale plasticity of primate somatosensory cortex. *Science* {(New} York, {N.Y.}}, **282**(5391), 1121–1125. {PMID:} 9804550.
- Jurkiewicz, M. T., Crawley, A. P., Verrier, M. C., Fehlings, M. G., y Mikulis, D. J. (2006). Somatosensory cortical atrophy after spinal cord injury: a voxel-based morphometry study. *Neurology*, **66**(5), 762.
- Kaas, J. H., Florence, S. L., y Jain, N. (1997). Reorganization of sensory systems of primates after injury. *The Neuroscientist*, **3**(2), 123.
- Kambi, N., Tandon, S., Mohammed, H., Lazar, L., y Jain, N. (2011). Reorganization

- of the primary motor cortex of adult macaque monkeys after sensory loss resulting from partial spinal cord injuries. *The Journal of Neuroscience*, **31**(10), 3696.
- Kim, B. G., Dai, H. N., McAtee, M., Vicini, S., y Bregman, B. S. (2006). Remodeling of synaptic structures in the motor cortex following spinal cord injury. *Experimental neurology*, **198**(2), 401–415.
- Lassek, A. M. (1942). The pyramidal tract: a study of retrograde degeneration in the monkey. *Arch Neurol Psychiatry*, **48**(4), 561–567.
- Lekan, H. A., Chung, K., Yoon, Y. W., Chung, J. M., y Coggeshall, R. E. (1997). Loss of dorsal root ganglion cells concomitant with dorsal root axon sprouting following segmental nerve lesions. *Neuroscience*, **81**(2), 527–534.
- Lenz, F. A., Seike, M., Richardson, R. T., Lin, Y. C., Baker, F. H., Khoja, I., Jaeger, C. J., y Gracely, R. H. (1993). Thermal and pain sensations evoked by microstimulation in the area of human ventrocaudal nucleus. *Journal of neurophysiology*, **70**(1), 200.
- Levin, P. M. y Beadford, F. K. (1938). The exact origin of the cortico-spinal tract in the monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, **68**(4), 411–422.
- Loewy, A. D. (1973). Transneuronal changes in the gracile nucleus. *The Journal of Comparative Neurology*, **147**(4), 497–510. PMID: 4122706.
- M R Matthews (1964). Further observations on transneuronal degeneration in the lateral geniculate nucleus of the macaque monkey. *Journal of Anatomy*, **98**, 255–263. PMID: 14157007.
- Martin, J. J., Regemorter, N. V., Krols, L., Brucher, J. M., de Barsy, T., Szliwowski, H., Evrard, P., Ceuterick, C., Tassignon, M. J., y Smet-Dieleman, H. (1994). On an autosomal dominant form of retinal-cerebellar degeneration: an autopsy study of five patients in one family. *Acta Neuropathologica*, **88**(4), 277–286. PMID: 7839819.

- Masciullo, M., Modoni, A., Pomponi, M. G., Tartaglione, T., Falsini, B., Tonali, P., y Silvestri, G. (2007). Evidence of white matter involvement in SCA 7. *Journal of Neurology*, **254**(4), 536–538. PMID: 16988791.
- Matthews, M. R., Cowan, W. M., y Powell, T. P. (1960). Transneuronal cell degeneration in the lateral geniculate nucleus of the macaque monkey. *Journal of Anatomy*, **94**(Pt 2), 145–169. PMID: 17105113.
- Merzenich, M. M., Kaas, J. H., Wall, J., Nelson, R. J., Sur, M., y Felleman, D. (1983). Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation. *Neuroscience*, **8**(1), 33–55.
- Michalik, A., Martin, J., y Broeckhoven, C. V. (2004). Spinocerebellar ataxia type 7 associated with pigmentary retinal dystrophy. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, **12**(1), 2–15. PMID: 14571264.
- Miller, R. C., Tewari, A., Miller, J. A., Garbern, J., y Stavarn, G. P. V. (2009). Neuro-ophthalmologic features of spinocerebellar ataxia type 7. *Journal of Neuro-Ophthalmology: The Official Journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*, **29**(3), 180–186. PMID: 19726938.
- Mori, S., Oishi, K., Jiang, H., Jiang, L., Li, X., Akhter, K., Hua, K., Faria, A. V., Mahmood, A., Woods, R., *et al.* (2008). Stereotaxic white matter atlas based on diffusion tensor imaging in an ICBM template. *Neuroimage*, **40**(2), 570–582.
- Moseley, M. E., Cohen, Y., Kucharczyk, J., Mintorovitch, J., Asgari, H. S., Wendland, M. F., Tsuruda, J., y Norman, D. (1990a). Diffusion-weighted MR imaging of anisotropic water diffusion in cat central nervous system. *Radiology*, **176**(2), 439.
- Moseley, M. E., Cohen, Y., Mintorovitch, J., Chileuitt, L., Shimizu, H., Kucharczyk, J., Wendland, M. F., y Weinstein, P. R. (1990b). Early detection of regional cerebral ischemia in cats: comparison of diffusion-and t2-weighted MRI and spectroscopy. *Magnetic resonance in medicine*, **14**(2), 330–346.

- Moseley, M. E., Wendland, M. F., y Kucharczyk, J. (1991). Magnetic resonance imaging of diffusion and perfusion. *Topics in Magnetic Resonance Imaging: TMRI*, **3**(3), 50–67. PMID: 2054198.
- Nair, G., Tanahashi, Y., Low, H. P., Billings-Gagliardi, S., Schwartz, W. J., y Duong, T. Q. (2005). Myelination and long diffusion times alter diffusion-tensor-imaging contrast in myelin-deficient shiverer mice. *Neuroimage*, **28**(1), 165–174.
- Nichols, T. E. y Holmes, A. P. (2002). Nonparametric permutation tests for functional neuroimaging: a primer with examples. *Human Brain Mapping*, **15**(1), 1–25. PMID: 11747097.
- Oldfield, R. C. (1971). The assessment and analysis of handedness: the edinburgh inventory. *Neuropsychologia*, **9**(1), 97–113.
- Ono, J., Harada, K., Takahashi, M., Maeda, M., Ikenaka, K., Sakurai, K., Sakai, N., Kagawa, T., Fritz-Zieroth, B., Nagai, T., *et al.* (1995). Differentiation between dysmyelination and demyelination using magnetic resonance diffusional anisotropy. *Brain research*, **671**(1), 141–148.
- Page, T. P., Jaboro, N. G., y Crossland, W. J. (1993). Retrograde transneuronal degeneration in a basal ganglia target, the lateral spiriform nucleus, induced by anterograde transneuronal degeneration following eye removal in the chicken. *Experimental Neurology*, **119**(1), 120–127. PMID: 8432345.
- Park, H. J., Kubicki, M., Shenton, M. E., Guimond, A., McCarley, R. W., Maier, S. E., Kikinis, R., Jolesz, F. A., y Westin, C. F. (2003). Spatial normalization of diffusion tensor MRI using multiple channels. *Neuroimage*, **20**(4), 1995–2009.
- Park, H. J., Westin, C. F., Kubicki, M., Maier, S. E., Niznikiewicz, M., Baer, A., Frumin, M., Kikinis, R., Jolesz, F. A., McCarley, R. W., *et al.* (2004). White matter hemisphere asymmetries in healthy subjects and in schizophrenia: a diffusion tensor MRI study. *Neuroimage*, **23**(1), 213–223.

- Partridge, S. C., Mukherjee, P., Berman, J. I., Henry, R. G., Miller, S. P., Lu, Y., Glenn, O. A., Ferriero, D. M., Barkovich, A. J., y Vigneron, D. B. (2005). Tractography-based quantitation of diffusion tensor imaging parameters in white matter tracts of preterm newborns. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, **22**(4), 467–474.
- Pasaye, E., Gutiérrez, R., Alcauter, S., Mercadillo, R., Aguilar-Castañeda, E., Iturbe, M., Romero-Romo, J., y Barrios, F. (2010). Event-Related functional magnetic resonance images during the perception of phantom limb. a brushing task. *The Neuroradiology Journal*, **23**(6), 665–670.
- Paulson, H. L. (2009). The spinocerebellar ataxias. *Journal of Neuro-Ophthalmology: The Official Journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*, **29**(3), 227–237. PMID: 19726947.
- Payne, B. R., Pearson, H. E., y Cornwell, P. (1984). Transneuronal degeneration of beta retinal ganglion cells in the cat. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character. Royal Society (Great Britain)*, **222**(1226), 15–32. PMID: 6147855.
- Penfield, W. y Boldrey, E. (1937). Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain*, **60**(4), 389.
- Pernet, U. y Hepp-Reymond, M. C. (1975). Retrograde degeneration of the pyramidal cells in the motor cortex of apes (Macaca fascicularis)]. *Acta anatomica*, **91**(4), 552.
- Pierpaoli, C. y Basser, P. J. (1996). Toward a quantitative assessment of diffusion anisotropy. *Magnetic Resonance in Medicine*, **36**(6), 893–906.
- Pierpaoli, C., Jezzard, P., Basser, P. J., Barnett, A., y Chiro, G. D. (1996). Diffusion tensor MR imaging of the human brain. *Radiology*, **201**(3), 637.
- Pons, T. P., Garraghty, P. E., Ommaya, A. K., Kaas, J. H., Taub, E., y Mishkin, M. (1991). Massive cortical reorganization after sensory deafferentation in adult macaques. *Science (New York, N.Y.)*, **252**(5014), 1857–1860. PMID: 1843843.

- Prayer, D., Roberts, T., Barkovich, A. J., Prayer, L., Kucharczyk, J., Moseley, M., y Arieff, A. (1997). Diffusion-weighted MRI of myelination in the rat brain following treatment with gonadal hormones. *Neuroradiology*, **39**(5), 320–325.
- Rausell, E., Bae, C. S., nuela, A. V., Huntley, G. W., y Jones, E. G. (1992a). Calbindin and parvalbumin cells in monkey VPL thalamic nucleus: distribution, laminar cortical projections, and relations to spinothalamic terminations. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **12**(10), 4088–4111. PMID: 1328563.
- Rausell, E., Cusick, C. G., Taub, E., y Jones, E. G. (1992b). Chronic deafferentation in monkeys differentially affects nociceptive and nonnociceptive pathways distinguished by specific calcium-binding proteins and down-regulates gamma-aminobutyric acid type a receptors at thalamic levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**(7), 2571–2575. PMID: 1313562.
- Rausell, E., Bickford, L., Manger, P. R., Woods, T. M., y Jones, E. G. (1998). Extensive divergence and convergence in the thalamocortical projection to monkey somatosensory cortex. *The Journal of Neuroscience*, **18**(11), 4216–4232.
- Rüb, U., Brunt, E. R., Gierga, K., Seidel, K., Schultz, C., Sch'ols, L., Auburger, G., Heinsen, H., Ippel, P. F., Glimmerveen, W. F., Wittebol-Post, D., Arai, K., Deller, T., y de Vos, R. A. I. (2005). Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): first report of a systematic neuropathological study of the brain of a patient with a very short expanded CAG-repeat. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, **15**(4), 287–295. PMID: 16389941.
- Rüb, U., Brunt, E. R., Seidel, K., Gierga, K., Mooy, C. M., Kettner, M., Broeckhoven, C. V., Bechmann, I., Spada, A. R. L., Sch'ols, L., den Dunnen, W., de Vos, R. A. I., y Deller, T. (2008). Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): widespread brain damage in an adult-onset patient with progressive visual impairments in comparison

- with an adult-onset patient without visual impairments. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **34**(2), 155–168. PMID: 17971076.
- Rueckert, D., Sonoda, L. I., Hayes, C., Hill, D. L., Leach, M. O., y Hawkes, D. J. (1999). Nonrigid registration using free-form deformations: application to breast MR images. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, **18**(8), 712–721. PMID: 10534053.
- Shibuya, K., Tajima, M., y Yamate, J. (1993). Unilateral atrophy of the optic nerve associated with retrograde and anterograde degenerations in the visual pathways in slc: Wistar rats. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, **55**(6), 905–912. PMID: 7509641.
- Simon, T. J., Ding, L., Bish, J. P., McDonald-McGinn, D. M., Zackai, E. H., y Gee, J. (2005). Volumetric, connective, and morphologic changes in the brains of children with chromosome 22q11. 2 deletion syndrome: an integrative study. *Neuroimage*, **25**(1), 169–180.
- Smith, S. M., Jenkinson, M., Woolrich, M. W., Beckmann, C. F., Behrens, T. E. J., Johansen-Berg, H., Bannister, P. R., Luca, M. D., Drobnjak, I., Flitney, D. E., Niazy, R. K., Saunders, J., Vickers, J., Zhang, Y., Stefano, N. D., Brady, J. M., y Matthews, P. M. (2004). Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *NeuroImage*, **23 Suppl 1**, S208–219. PMID: 15501092.
- Smith, S. M., Jenkinson, M., Johansen-Berg, H., Rueckert, D., Nichols, T. E., Mackay, C. E., Watkins, K. E., Ciccarelli, O., Cader, M. Z., Matthews, P. M., y Behrens, T. E. J. (2006). Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *NeuroImage*, **31**(4), 1487–1505. PMID: 16624579.
- Smith, S. M., Johansen-Berg, H., Jenkinson, M., Rueckert, D., Nichols, T. E., Miller, K. L., Robson, M. D., Jones, D. K., Klein, J. C., Bartsch, A. J., *et al.* (2007). Acquisition and voxelwise analysis of multi-subject diffusion data with tract-based spatial statistics. *Nature Protocols*, **2**(3), 499–503.

- Song, S. K., Sun, S. W., Ramsbottom, M. J., Chang, C., Russell, J., y Cross, A. H. (2002). Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *Neuroimage*, **17**(3), 1429–1436.
- Takahashi, M., Hackney, D. B., Zhang, G., Wehrli, S. L., Wright, A. C., O'Brien, W. T., Uematsu, H., Wehrli, F. W., y Selzer, M. E. (2002). Magnetic resonance microimaging of intraaxonal water diffusion in live excised lamprey spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(25), 16192.
- Tandon, S., Kambi, N., Lazar, L., Mohammed, H., y Jain, N. (2009). Large-scale expansion of the face representation in somatosensory areas of the lateral sulcus after spinal cord injuries in monkeys. *The Journal of Neuroscience*, **29**(38), 12009.
- Taylor, K. S., Anastakis, D. J., y Davis, K. D. (2009). Cutting your nerve changes your brain. *Brain: A Journal of Neurology*, **132**(Pt 11), 3122–3133. PMID: 19737843.
- Thomsen, C., Henriksen, O., y Ring, P. (1987). In vivo measurement of water self diffusion in the human brain by magnetic resonance imaging. *Acta Radiologica*, **28**(3), 353–361.
- Tower, S. S. (1940). Pyramidal lesion in the monkey. *Brain*, **63**(1), 36–90.
- Tyszka, J. M., Readhead, C., Bearer, E. L., Pautler, R. G., y Jacobs, R. E. (2006). Statistical diffusion tensor histology reveals regional dysmyelination effects in the shiverer mouse mutant. *Neuroimage*, **29**(4), 1058–1065.
- Wall, J. T., Cusick, C. G., Migani-Wall, S. A., y Wiley, R. G. (1988). Cortical organization after treatment of a peripheral nerve with ricin: an evaluation of the relationship between sensory neuron death and cortical adjustments after nerve injury. *The Journal of comparative neurology*, **277**(4), 578–592.
- Wannier, T., Schmidlin, E., Bloch, J., y Rouiller, E. M. (2005). A unilateral section of the corticospinal tract at cervical level in primate does not lead to measurable cell loss in motor cortex. *Journal of Neurotrauma*, **22**(6), 703–717. PMID: 15941378.

- Wimberger, D. M., Roberts, T. P., Barkovich, A. J., Prayer, L. M., Moseley, M. E., y Kucharczyk, J. (1995). Identification of "premyelination" by diffusion-weighted MRI. *Journal of computer assisted tomography*, **19**(1), 28.
- Woessner, D. E., Snowden, B. S., *et al.* (1970). Pulsed NMR study of the temperature hysteresis in the agar-water system. *Journal of Colloid and Interface Science*, **34**(2), 283–289.
- Woods, T. M., Cusick, C. G., Pons, T. P., Taub, E., y Jones, E. G. (2000). Progressive transneuronal changes in the brainstem and thalamus after {Long-Term} dorsal rhizotomies in adult macaque monkeys. *The Journal of Neuroscience*, **20**(10), 3884–3899.
- Wrigley, P. J., Gustin, S. M., Macey, P. M., Nash, P. G., Gandevia, S. C., Macefield, V. G., Siddall, P. J., y Henderson, L. A. (2009). Anatomical changes in human motor cortex and motor pathways following complete thoracic spinal cord injury. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, **19**(1), 224–232. PMID: 18483004.
- Zhang, Y., Brady, M., y Smith, S. (2001). Segmentation of brain MR images through a hidden markov random field model and the expectation-maximization algorithm. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, **20**(1), 45–57. PMID: 11293691.