



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS Y DE PERMEABILIDAD EN EL ESPACIO
SUBARACNOIDEO ESPINAL EN FUNCIÓN DE LA INTENSIDAD Y TIEMPO
TRANSCURRIDO DESPUÉS DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA
ESPINAL”**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA
M. EN C. HORACIO JOSÉ REYES ALVA**

**TUTOR:
DR. GABRIEL GUÍZAR SAHAGÚN
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
COMITÉ TUTORAL:**

**DRA. SARA DEL CARMEN CABALLERO CHACON. UNAM
DRA. EN C.Q. REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Antecedentes. La lesión traumática de la médula espinal (LTME) produce discapacidad permanente caracterizada por pérdida funcional extensa del sitio de la lesión hacia caudal, incluyendo: parálisis, pérdida de sensibilidad y alteraciones en el sistema nervioso autónomo. La capacidad de reparación espontánea después de una LTME es pobre. Los intentos de neuroprotección por tratamientos dirigidos a contrarrestar los mecanismos secundarios de lesión han dado pocos resultados en la práctica clínica. Es probable que existan mecanismos fisiopatológicos aún no identificados después de una LTME. Este podría ser el caso de las alteraciones en el espacio subaracnoideo (ESA), tomando en cuenta que en éste se alojan estructuras neurovasculares esenciales para la función neurológica y que es la vía principal para la circulación del líquido cefalorraquídeo (LCR). **Objetivos.** Caracterizar los cambios morfológicos y de permeabilidad en el ESA espinal en un modelo clínicamente relevante de LTME, en función de la intensidad y tiempo transcurrido después de la lesión. **Metodología.** Ratas anestesiadas fueron sometidas a contusión de médula espinal (ME) leve o severa en T9 y se evaluaron en las fases aguda (1 h y 1 d), subaguda (3 y 7 d) y crónica (1 y 3 meses) postlesión. Para la evaluación histológica y morfométrica del ESA se extirparon bloques de la columna vertebral conteniendo el sitio de la lesión y los segmentos adyacentes hacia craneal y caudal. Se realizaron cortes histológicos en cada nivel de los segmentos vertebrales descalcificados desde T7 hasta T12. Se midió la luz permeable del ESA, el área de la ME y el perímetro del saco dural; también se determinaron las características de los elementos neurovasculares y del sangrado subaracnoideo. Para estimar la permeabilidad del ESA *in vivo* se realizaron dos evaluaciones distintas: 1) Utilizando un nuevo método que diseño, basado en la cuantificación de partículas superparamagnéticas recuperadas en el ESA lumbar inmediatamente después de ser inyectadas en la cisterna magna. 2) De manera cualitativa, mediante la realización de mielografías. **Resultados:** En las fases aguda y subaguda, se observó una reducción de la luz y de la

permeabilidad del ESA después de lesiones leves y severas. En la etapa aguda, la oclusión del ESA después de lesión severa se asoció principalmente con la hinchazón de ME y con hematomas subaracnoideos extensos (sobre todo dorsales); en las lesiones leves se asoció con disminución del perímetro del saco dural. A los 7 días, la hinchazón de ME disminuyó en ambos casos, pero la constricción del saco dural aumentó en las lesiones severas. La histopatología reveló que en las primeras etapas existe compresión de elementos neurovasculares subaracnoideos, en el epicentro y alrededores, más intensa en lesiones severas que en leves. En la fase crónica, la luz del ESA y su permeabilidad se incrementaron notablemente; esto fue asociado sobre todo a la atrofia de la ME, a pesar de la constricción del saco dural. La aracnoiditis postraumática se produjo principalmente en animales con lesiones severas.

Conclusiones. La LTME por contusión se asocia a alteraciones en el ESA espinal, que son más intensas en lesiones severas y se modifican de acuerdo al tiempo transcurrido después de la lesión. Los cambios descritos aquí posiblemente producen alteraciones en la dinámica del LCR y en la perfusión sanguínea de la ME, contribuyendo así a la fisiopatología de la LTME. Podrían entonces convertirse en nuevos blancos para futuros tratamientos.

ABSTRACT

Background: Traumatic spinal cord injury (SCI) produces permanent disability characterized by extensive functional loss from the site of lesion downwards, including: paralysis, loss of sensitivity, and alterations to the autonomous nervous system. The capacity for spontaneous recovery after (SCI) is poor. Attempts for neuroprotection by treatments designed to counteract secondary mechanisms occurring after lesion have met with limited success in the clinical practice. It is possible that pathophysiological mechanisms exist that have not been identified after SCI. This could be the case for alterations in the subarachnoid space taking into account that it houses neovascular structures that are essential for neurological function as well as being the main pathway for cerebrospinal fluid circulation. **Objectives:** To characterize the morphological changes and permeability of the spinal subarachnoid space in a clinically relevant SCI model, as a function of the intensity and time elapsed after injury. **Methodology:** Anesthetized rats were subjected to mild or severe contusions to the spinal cord at T9 and were evaluated in the acute (1h and 1d), subacute (3 and 7d) and chronic (1 and 3 months) stages post-lesion. To histologically and morphometrically evaluate the subarachnoid space, blocks of the vertebral column were excised containing the site of lesion together with cranial and caudal segments adjacent to it. Histological sections were obtained at each level of the decalcified vertebral segments going from T7 to T12. For each section, the subarachnoid lumen, the area of the spinal cord, and the perimeter of the dural sac were measured morphometrically; characteristics of the subarachnoid neurovascular elements and bleeding were also documented. *In vivo* estimation of the permeability of the subarachnoid space was made by two different procedures: 1, utilizing a new method we designed, based on the measurement of superparamagnetic beads we recovered from the lumbar subarachnoid space immediately after being injected into the *cisterna magna*; 2, qualitatively, by myelography. **Results:** In the acute and subacute stages after mild and severe injuries, a reduction of the

subarachnoid space permeability was observed morphometrically and by *in vivo* estimation. In the acute phase, occlusion of this space after severe lesion was mainly associated with cord swelling and with extensive subarachnoid hematomas (mainly dorsal); mild lesions were associated with a reduction of the dural sac perimeter. At 7d post-injury, cord swelling was reduced for both mild and severe injuries, although constriction of the sac was increased for severe lesions. Histopathology revealed that in the first stages after injury there is compression of the subarachnoid neurovascular elements at the epicenter and adjacent segments which was more intense for severe lesions than mild ones. In the chronic stage, morphological measurements and *in vivo* tests showed subarachnoid space to be increased notably; this was associated to the atrophy of the spinal cord despite constriction of the dural sac. Post-traumatic arachnoiditis was apparent.

Conclusions: Traumatic lesions to the spinal cord by contusion are associated with alterations in the spinal subarachnoid space that are more intense in cases of severe lesions, and change as a function of time after injury. Changes described here possibly produce alterations in the dynamics of the cerebrospinal fluid and blood perfusion of the spinal cord, thereby contributing to the pathophysiology of this condition. These changes could become new targets for future treatment protocols.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
GENERALIDADES SOBRE LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL	1
ESTRUCTURA DE LAS MENINGES	2
Dura madre	2
Aracnoides	3
Piamadre	4
ESPACIOS DELIMITADOS POR LAS MENINGES ESPINALES	5
Espacio epidural	5
Espacio subdural	5
Espacio subaracnoideo	5
Espacio de Virchow-Robin	6
IRRIGACIÓN SANGUÍNEA DE LA MÉDULA ESPINAL	6
Región superior o cérvico-torácica	7
Región intermedia	7
Región inferior	8
GENERALIDADES SOBRE EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO	9
Producción	9
Flujo pulsátil	10
Circulación	11
Funciones	13
Respuesta de los plexos coroideos a procesos patológicos del sistema nervioso central	16
ARACNOIDITIS POSTRAUMÁTICA	17
JUSTIFICACIÓN	18
PREGUNTA CIENTÍFICA	19

OBJETIVOS	20
HIPÓTESIS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
Diseño experimental	22
Métodos de anestesia, lesión y cuidados	23
Estudio morfológico del espacio subaracnoideo	24
Estudio del sangrado en el espacio subaracnoideo	25
Estudio cualitativo de permeabilidad del espacio subaracnoideo	27
Estudio cuantitativo de permeabilidad del espacio subaracnoideo	28
Análisis estadístico	29
RESULTADOS	30
ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO DEL ESPACIO SUBARACNOIDEO	30
EVALUACIÓN DEL SANGRADO SUBARACNOIDEO ESPINAL	36
Observaciones macroscópicas	36
Presencia y magnitud del sangrado subaracnoideo	37
Evolución del sangrado subaracnoideo y tipo de células inflamatorias asociadas	37
Distribución cráneo-caudal del sangrado subaracnoideo	38
Localización circunferencial del sangrado subaracnoideo	39
ESTUDIO DE PERMEABILIDAD DEL ESPACIO SUBARACNOIDEO	41
Estudio cualitativo	41
Estudio cuantitativo	43
DISCUSIÓN	45
ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL ESPACIO SUBARACNOIDEO	45
Cambios tempranos en la luz permeable del espacio subaracnoideo espinal	45
Posibles implicaciones de los cambios tempranos del espacio	46

subaracnoideo espinal en el flujo del LCR y la circulación sanguínea en el tejido nervioso	
Cambios tardíos en el área de la luz permeable del espacio subaracnoideo	48
ESTUDIO DEL SANGRADO EN EL ESPACIO SUBARACNOIDEO	49
Incidencia y magnitud del sangrado subaracnoideo	49
Origen, ubicación y destino de la sangre subaracnoidea extravasada	50
Posibles implicaciones de la hemorragias subaracnoideas en la lesión traumática de la médula espinal	51
ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD DEL ESPACIO SUBARACNOIDEO	52
Desarrollo del estudio cuatitativo	52
Cambios tempranos en la permeabilidad del espacio subaracnoideo	54
Cambios tardíos en la permeabilidad del espacio subaracnoideo	55
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	55
INVESTIGACIONES FUTURAS	56
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Título	Pág.
1	Imágenes del flujo del líquido cefalorraquídeo obtenidas por resonancia magnética	10
2	Circulación del líquido cefalorraquídeo.	12
3	Separación de segmentos vertebrales torácicos	25
4	Imágenes representativas de la escala de puntuación histológica del sangrado subaracnoideo	27
5	Imágenes representativas del ESA en rata intacta, nivel T10	31
6	Especímenes del sitio de lesión (T10) en el estadio agudo	32
7	Especímenes del sitio de lesión (T10) del estadio subagudo	33
8	Especímenes del sitio de lesión (T10) del estadio crónico	34
9	Resultados de morfometría de T9 a T11	35
10	Imágenes macroscópicas representativas de la apariencia y evolución temporal del sangrado subaracnoideo espinal después de LTME	36
11	Ruptura de la piamadre en el sitio de la lesión	38
12	Incidencia de hemorragia subaracnoidea postraumática	39

13	Progresión y ubicación de la hemorragia subaracnoidea	40
14	Imágenes representativas de mielografías	42
15	Nanogramos de partículas superparamagnéticas recuperadas en L2 después de haber sido inyectadas en la cisterna magna	43
16	Volumen de LCR obtenido en L2 al momento de recuperar las partículas superparamagnéticas	44

ABREVIATURAS

ESA: espacio subaracnoideo

ME: médula espinal

LCR: líquido cefalorraquídeo

LTME: lesión traumática de la médula espinal

PC: plexo coroideo

PSPM: partículas superparamagnéticas

SNC: sistema nervioso central

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES SOBRE LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL

La lesión traumática de médula espinal (LTME) produce discapacidad permanente caracterizada por pérdida funcional extensa del sitio de la lesión en la médula espinal (ME) hacia abajo, incluyendo: parálisis, pérdida de sensibilidad y alteraciones en diversas funciones dependientes del sistema nervioso autónomo (Bracken et al., 1990; Hurlbert, 2006)

El impacto personal, familiar y socioeconómico que ocasiona la LTME es muy alto, debido a que la población más afectada es la de los jóvenes en etapa formativa o productiva, con una esperanza de vida similar a la de la población general. Además del tratamiento inicial que es muy complejo y costoso, existe la necesidad de rehabilitación prolongada y riesgo elevado de sufrir múltiples complicaciones de por vida (Hurlbert, 2006).

En la fisiopatología de la LTME aguda se han identificado dos mecanismos de lesión: la lesión primaria, que resulta del daño mecánico inicial (ruptura vascular, sangrado intraparenquimatoso, disrupción tisular directa, etc.) y la lesión secundaria, que resulta de múltiples mecanismos autodestructivos (trombosis, isquemia progresiva, inflamación aguda, estrés oxidativo, excitotoxicidad, apoptosis, etc.) desencadenados por la lesión primaria. Ambos mecanismos se han relacionados con la disfunción neurológica permanente (Bracken et al., 1990; Hurlbert, 2006; Eck et al., 2006).

La capacidad de reparación espontánea de la médula espinal después de una LTME es muy pobre. Se conocen alrededor de 25 mecanismos de lesión secundaria bien establecidos, las investigaciones han revelado la posibilidad de bloquearlos o contrarrestarlos, sin embargo aún no se ha logrado revertir el daño

neurológico ocasionado por traumatismo medular severo. Es probable que existan mecanismos fisiopatológicos aún no identificados después de una LTME (Bracken et al., 1990; Liverman et al., 2005; Hurlbert, 2006; Eck et al., 2006; Guly et al., 2008).

En 1990 se publicaron los resultados del segundo estudio nacional sobre lesión medular aguda donde se proponía el uso de metilprednisolona como neuroprotector para pacientes con LTME aguda. Estudios posteriores no pudieron reproducir tales beneficios. Ahora la mayor parte de médicos que tratan a estos pacientes no creen que la administración de esteroides sea benéfica y por tal motivo no lo aplican o lo usan con la idea de “es mejor algo que nada” o para evitar posibles demandas. En resumen, por ahora no existen alternativas terapéuticas de neuroprotección en humanos (Bracken et al., 1990; Hurlbert, 2006).

ESTRUCTURA DE LAS MENINGES

La ME se ubica en el centro del canal raquídeo, esta rodeada por tres capas concéntricas de tejido conjuntivo (meninges). La meninge más externa es la duramadre, a la que se conoce también como *paquimeninge* por ser una membrana gruesa, densa y resistente. La meninge intermedia, bajo la duramadre es la aracnoides y la piamadre es la membrana más interna, y se encuentra en íntimo contacto con la superficie de la médula espinal; estas dos últimas se conocen como *leptomeninges* ya que están formadas por tejido conjuntivo laxo (Reina et al., 1998; Reina et al., 2007; Reina et al., 2008)

Duramadre

Es una membrana gruesa formada de tejido conjuntivo denso compuesto fundamentalmente por fibroblastos y sus productos: colágena y fibras elásticas

inmersas en sustancia extracelular amorfa (4). Las fibras están orientadas en diferentes direcciones, aunque predominan las fibras longitudinales, lo que le confiere una gran fuerza a la tensión y rigidez en sentido longitudinal. La superficie interna de la dura madre raquídea está revestida por células planas y las fibras de colágeno que se orientan longitudinalmente (se observan menos fibras elásticas que en la duramadre cerebral), se encuentra a lo largo del canal vertebral en forma de vaina cilíndrica que de manera circunferencial rodea a la médula espinal, está desplazada hacia fuera por la presión del líquido cefalorraquídeo (LCR), pero restringida por la estructura ósea del canal vertebral (Patin et al., 1993; Reina et al., 2007)

Desde el punto de vista biomecánico, al flexionar anteriormente la columna vertebral en cualquiera de sus segmentos, el tejido dural posterior se tensiona y estira longitudinalmente, mientras que los movimientos de torsión solo inducen fuerzas significativas sobre la dura a nivel cervical (Patin et al., 1993).

Aracnoides

Es una capa avascular delgada y laxa, localizada en contacto con la porción interna de la duramadre. Está formada por dos capas de células que a nivel de microscopía electrónica se diferencian fácilmente ya que la capa más externa (en contacto con la duramadre) contiene células electrodensas agrupadas con espacio intercelular casi nulo, con muchas uniones estrechas y desmosomas, posee largas prolongaciones entretejidas y numerosas vacuolas. La capa interna está formada por células aracnoideas trabeculares, estas son fibroblastos modificados con largas prolongaciones con uniones apretadas tipo desmosoma que los adhieren entre sí y con las células de la capa externa, formando un entramado laxo que conforma ángulo recto con la capa externa y que atraviesa el espacio subaracnoideo. Ambas capas están en contacto íntimo, solo las separa una membrana basal simple. La capa superficial de la aracnoides es permeable

mientras que la capa profunda tiene una permeabilidad selectiva debido a lo apretado de las uniones intercelulares (Lopes y Mair, 1974; Sanan y Loveren, 1999; Reina et al.,2007).

Piamadre

Es una lámina fina de tejido conectivo formada por fibroblastos planos modificados que se adosan estrechamente a la superficie de la médula espinal. Contiene una red extensa de vasos sanguíneos, conocida como plexo vascular pial. Está formada por una capa externa longitudinal y una interna circular (cubierta por un epitelio simple plano). Entre las células de la piamadre y la ME existen pequeñas fibras de colágeno y elastina. Entre las células piales y la membrana basal glial de los vasos piales existen numerosos macrófagos, también se encuentran mastocitos y pequeñas agrupaciones de linfocitos (Cloyd y Low, 1974; Reina et al., 2008).

La capa externa de la piamadre tiene fenestraciones que en realidad son agujeros intracelulares, mientras que la capa interna consiste de tejido conjuntivo que forma una malla fibrosa que comunica con el espacio perivascular dentro del tejido nervioso, mejor conocido como espacio de Virchow-Robin (Cloyd y Low, 1974; Reina et al., 1998).

Los vasos del plexo pial poseen una profusa inervación simpática proveniente de los plexos vertebral y carotídeo.

ESPACIOS DELIMITADOS POR LAS MENINGES ESPINALES

Espacio epidural

Es amplio, está delimitado hacia fuera por el periostio y ligamentos del canal vertebral y hacia adentro por la capa externa de la duramadre. En condiciones normales este espacio está ocupado por tejido muy laxo (graso y conjuntivo) y por abundantes senos venosos que forman un extenso plexo. En este espacio se alojan también diversos ligamentos que unen a la duramadre con el tejido vertebral y es atravesado por las raíces nerviosas que entran a y salen de la médula espinal (Reina et al., 1998).

Espacio subdural

Espacio virtual ubicado entre la superficie interna de la duramadre y la capa externa de la aracnoides. Suele contener muy escasa cantidad de líquido viscoso que permite disminuir la fricción entre ambas membranas cuando se desplazan de manera diferencial (Reina et al., 1998).

Espacio subaracnoideo

Se localiza entre la capa interna de la aracnoides y la capa externa de la piamadre. En condiciones normales es un espacio muy amplio. Da cabida y vía para circular al LCR. Por este espacio atraviesan también las raíces nerviosas, vasos sanguíneos que nutren a la ME y trabéculas aracnoideas que van de la piamadre a la duramadre (ligamentos dentados, línea *splendis*, *septum posticum*, etc.) que dan soporte y mantienen en posición central a la ME. Las regiones en las cuales la aracnoides está bastante separada de la piamadre son denominadas *cisternas* y en ellas se observan pocas trabéculas aracnoideas (Reina et al., 2008).

Espacio de Virchow-Robin

Espacio intramedular trabeculado, delimitado por la porción exterior de los grandes vasos sanguíneos que ingresan al parénquima medular y la prolongación de la piamadre que acompaña a estos vasos. Estos espacios se comunican con el espacio subaracnoideo y permiten circular libremente al LCR (Johanson, 1998).

IRRIGACION SANGUÍNEA DE LA ME

El patrón básico de irrigación arterial de la ME involucra tres vasos que corren longitudinalmente a lo largo de ella: la arteria espinal anterior y dos arterias espinales posteriores

Arteria Espinal Anterior: Nace de la unión de dos ramas de la arteria vertebral que se unen a nivel de la decusación de las pirámides para luego descender por la superficie anterior de la ME dentro de la fisura mediana anterior. Irriga parte del bulbo raquídeo y los dos tercios anteriores de la ME.

Arterias Espinales Posteriores: Nacen directamente de las arterias vertebrales o indirectamente de las arterias cerebelosas postero-inferiores para luego descender por la superficie postero-lateral de la ME. Irrigan el tercio posterior de la ME. El sistema longitudinal es reforzado por una serie muy variable de vasos tributarios transversales que penetran al canal espinal por los agujeros intervertebrales junto a los nervios y raíces espinales. Las anastomosis entre los vasos longitudinales y los vasos segmentarios se producen en la superficie de la ME (Bradshaw, 1958; Fried, 1969; Lazorthes et al., 1971).

De los 31 pares de vasos segmentarios que penetran con los nervios raquídeos, la gran mayoría no termina en la ME. Entre ellos existen diferentes tipos:

- *Arterias radicales*: irrigan las raíces nerviosas y el ganglio raquídeos.
- *Arterias radículo - piales*: forman el plexo vascular pial.
- *Arterias radículo - medulares*: son un grupo de 8 a 10 arterias que irrigan la ME, anastomosándose con el sistema longitudinal. Generalmente ingresan por un solo lado de la ME y con frecuencia se dividen en dos ramas, una anterior y otra posterior, las que acompañan a las respectivas raíces nerviosas.

Con fines descriptivos, la ME se divide en tres regiones según la vascularización que reciben:

Región superior o cérvico-torácica

Comprende todos los segmentos medulares cervicales hasta el segundo o tercer segmento medular torácico. Dentro de la gran variabilidad de la irrigación de este segmento, es probable encontrar el siguiente patrón: la primera porción de la ME es irrigada sólo por el sistema de vasos longitudinales; existe una arteria radicular rama de la arteria vertebral que acompaña a la raíz C3, una rama de la arteria cervical profunda que penetra con la raíz C6, y una rama de la arteria intercostal superior que acompaña la raíz C8. Para asegurar la circulación de esta región se producen una serie de anastomosis entre los distintos vasos del cuello, principalmente a través de la arteria cervical profunda y arteria cervical ascendente. Por tanto, frente a una obstrucción en la región del engrosamiento cervical, el déficit puede ser suplido por alguna de las numerosas colaterales (Bradshaw, 1958; Fried, 1969; Lazorthes et al.,1971).

Región intermedia

Se extiende entre los segmentos medulares T4 y T8. Generalmente, existe una sola rama del sistema segmentario a nivel de T7 aproximadamente, la cual proviene de una arteria intercostal, rama de la aorta. Esta región es la más

pobremente irrigada, por tanto, es la más frágil de las tres regiones ante una obstrucción vascular. La arteria espinal anterior puede estar extremadamente disminuida a este nivel (Bradshaw, 1958; Fried, 1969; Lazorthes et al., 1971).

Región inferior

Inicia desde los últimos segmentos medulares torácicos hasta el cono medular. Depende en gran parte de una arteria radículo-medular llamada arteria radicular mayor (de Adamkiewicz) que es la de mayor diámetro de todas las arterias radículo-medulares. Es rama de las primeras lumbares provenientes de la aorta, llega a la ME con mayor frecuencia por una de las raíces del lado izquierdo entre los segmentos T12 y L4 (85% de los casos), y emite una rama radicular anterior gruesa y una radicular posterior menor que terminan por irrigar el engrosamiento lumbar y constituirse en el mayor aporte nutricional para los dos tercios inferiores de la ME. La cauda equina es irrigada por una o dos ramas de las arterias lumbares, iliolumbar y sacras lateral y media. Estas ramas también ascienden hasta el cono medular para formar una amplia red anastomótica llamada asa del cono medular al cual también contribuyen ramas de las tres arterias espinales y una rama descendente de calibre relativamente grueso que proviene de la arteria de Adamkiewicz.

Interesantemente la sangre arterial no es la única fuente de nutrientes y oxígeno para la ME. En gatos y primates a quienes se les obstruyó experimentalmente la arteria radicular (equivalente a la arteria de Adamkiewicz en humanos) no muestran daño funcional. Estas observaciones confirman la gran capacidad compensatoria del plexo vascular pial que cubre la superficie medular. También sugiere la importancia de una ruta suplementaria para aportar nutrientes y oxígeno al tejido nervioso, el flujo de LCR (Bradshaw, 1958; Fried, 1969; Lazorthes et al., 1971).

GENERALIDADES SOBRE EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El sistema nervioso central (SNC) se encuentra inmerso en un compartimiento lleno de LCR. Su composición, circulación y absorción juegan un papel muy importante en el desarrollo, nutrición, protección, homeostasis, señalización, daño y reparación del SNC desde la vida fetal hasta la edad adulta (Novak, et al., 2000).

Producción

Dos tercios del total de LCR es secretado continuamente por los plexos coroideos (PC) en los ventrículos cerebrales (laterales, tercero y cuarto), el tercio restante es secretado por fuentes extracoroideas que participan manteniendo el balance (Milhorat, 1987; Yoshizawa, 2002; Johanson et al., 2004 ; Kho et al., 2005).

Es producido por células especializadas que constituyen al PC epitelial. Se filtra como plasma a través del PC permeable, su filtración neta es proporcional al gradiente de presión hidrostática entre la sangre y el líquido intersticial coroideo (Pollay y Curl, 1967; Pollay et al., 1983; Johanson, 2008).

Su formación se lleva a cabo en dos etapas: filtración pasiva de fluido a través del endotelio capilar coroideo, seguida de una secreción regulada a través del epitelio simple. El movimiento de los solutos es por difusión simple, transporte facilitado y transporte activo (Rudick et al., 1982; Pollay et al., 1983).

Es secretado bajo control homeostático con su propia composición de electrolitos, moléculas pequeñas (péptidos, vitaminas, nucleótidos, etc.) y proteínas (hormonas, factores tróficos, y enzimas), que al viajar por el ESA y de Virchow-Robin a muchos blancos celulares dentro del tejido nervioso, con los que ocurre un intercambio bidireccional por difusión y otros mecanismos de transporte activo. Conforme va circulando, se va modificando químicamente, hasta que drena hacia la sangre venosa directamente por los sitios aracnoideos especializados o

indirectamente por vasos linfáticos extracraneales y paravertebrales (Johanson et al., 2004; Kho et al., 2005).

Se han realizado diversas investigaciones para comprender el proceso normal de formación del LCR, así como para comprender como es que las enfermedades afectan su tasa de producción (Johanson et al., 2004).

Flujo pulsátil

La resonancia magnética permite el estudio del flujo del LCR mediante técnicas de contraste de fase con apoyo electrocardiográfico e imágenes dinámicas en formato de cine de ciclo cerrado. Basauri y Cols, en 2005 describieron un flujo pulsátil bidireccional en forma de oleadas con movimientos anterógrados y retrógrados que se producen por la expansión y contracción arterial y cerebral, generadas durante la sístole y diástole cardiaca, en un espacio craneano rígido (Basauri et al., 2005).

El sentido del flujo del LCR es caudal en la sístole y craneal en la diástole; la señal convencional es hiper-intensa cuando el sentido es hacia caudal e hipo-intensa cuando el sentido es hacia craneal.

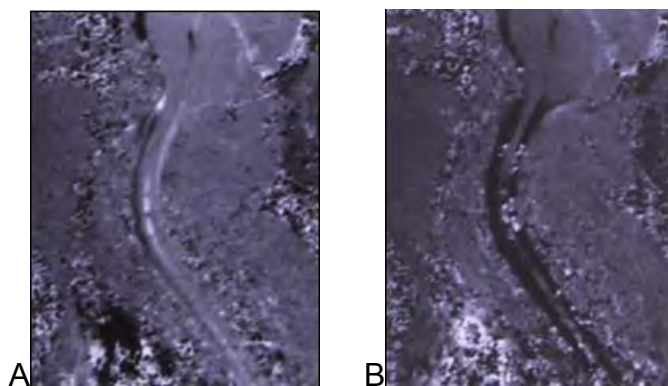


Figura 1. Imágenes del flujo del líquido cefalorraquídeo obtenidas por resonancia magnética, plano sagital. A: sístole (blanca). B: diástole (negra).

El flujo pulsátil es de menor intensidad en los ventrículos laterales que en el tercer ventrículo, el acueducto de Silvio y el cuarto ventrículo. A nivel de las cisternas, la intensidad del flujo también es variable, tendiendo a ser mayor en la cisterna Silvana y en el compartimiento espinal. En el ESA cervical, la onda sistólica del LCR es simultánea con la onda sistólica de la arteria carótida. La velocidad pico está entre 11-15 mm/s durante el ciclo cardiaco. El flujo pulsátil del LCR permite realizar a la ME movimientos en sentido longitudinal y transversal. Aparentemente estos movimientos son amplios a nivel la columna cervical y van disminuyendo gradualmente al descender en sentido caudal.

En condiciones patológicas la intensidad de flujo del LCR puede alterarse. Por ejemplo, puede disminuir o incluso desaparecer cuando hay una importante obstrucción al flujo del LCR (Basauri et al., 2005).

Circulación

El LCR formado en los ventrículos cerebrales avanza impulsado por cilios de las células del epéndimo desde los ventrículos laterales y a través del agujero de Monro hacia el tercer ventrículo y por el acueducto de Silvio hacia el cuarto ventrículo, desde allí se puede dirigir hacia el conducto ependimario o hacia el ESA de las cisternas cerebelo medular y pontina (por el foramen de Luschka y Magendie), recorriendo luego el espacio que rodea a la ME hacia caudal o hacia la convexidad de los hemisferios cerebrales (ver figura 2) (Oreskovic y Klarica, 2010).

Debido a que el ESA acompaña a los vasos sanguíneos cerebrales en trayectos largos dentro del parénquima cerebral (constituyendo los espacios de Virchow-Robin) existe un paso libre de solutos desde el tejido cerebral hasta el ESA y desde aquí a los ventrículos cerebrales (Oresković y Klarica, 2010).

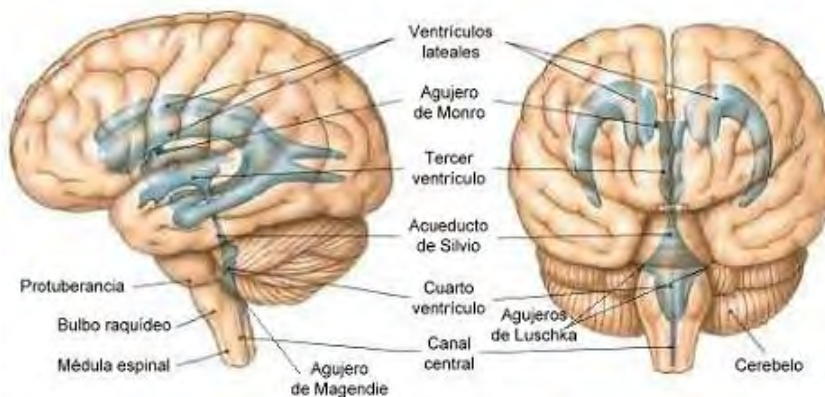


Figura 2. Esquema anatómico del sistema ventricular cerebral. En las imágenes lateral y rostral del cerebro se muestra en color azul el líquido cefalorraquídeo desde su sitio de producción en los ventriculos laterales hasta su llegada al cuarto ventrículo y canal central (Ferro y Makinistian, 2011).

La reabsorción del LCR se realiza en las granulaciones subaracnoideas que se encuentran en los senos venosos, especialmente en el seno sagital superior, de donde se reincorpora a la sangre (ver figura 2). La reabsorción se da como consecuencia de la diferencia de presión hidrostática entre el ESA y el seno venoso (Milhorat; 1987; Oresković y Klarica, 2010).

El volumen de absorción de LCR es directamente proporcional a la diferencia de presiones entre el líquido y los senos venosos duros y el flujo es unidireccional. La presión en que se produce la “apertura” de las vellosidades aracnoides es de 20-50 mm de agua. Cuando el gradiente de presión aumenta también aumenta el volumen de LCR reabsorbido, al menos en un rango de presiones que varía entre 100 y 300 mm de agua. El sistema es capaz de reabsorber diversos tamaños de partículas que van desde 0.2 a 7 micras. El mecanismo íntimo de transporte aunque no es bien conocido parece ser debido a un mecanismo de transporte de vesículas gigantes. Otros mecanismos de absorción desde el LCR hasta el torrente circulatorio incluyen a los plexos coroideos y la difusión entre los capilares

y el tejido cerebral cercano que son capaces de absorber el LCR que atraviesa el epéndimo (Milhorat, 1987; Johanson, 1998; Oresković y Klarica, 2010).

Funciones

No se han aclarado por completo las funciones del LCR, algunas conocidas son:

Soporte físico del encéfalo: es trascendente para el SNC porque su presencia permite la flotación del cerebro, reduciendo su peso efectivo de 1400 gramos a solo 50 gramos. El volumen de LCR fluctúa recíprocamente con las variaciones del volumen del encéfalo y de la sangre cuando el cráneo está intacto, siendo esta función de “amortiguación”, también importante tras los cambios de presión registrados del decúbito al ortostatismo, el ejercicio físico y las variaciones en la presión arterial y el pulso. Además evita choques de la masa encefálica con las estructuras óseas que le rodean, en caso de movimientos bruscos y rápidos. Es previsible que condiciones similares prevalezcan para el soporte físico de la médula espinal (Novak et al., 2000)

El ESA donde reside el LCR funciona como amortiguador dinámico para las fluctuaciones de presión causadas por cambios en el volumen en cualquiera de los tres compartimientos contenidos dentro de la estructura ósea: tejido nervioso, sangre y LCR. Cuando se incrementa el volumen en uno de ellos, el de los otros dos se disminuye. Este interesante fenómeno se conoce como regla de Monro-Kellie. Es importante porque por ejemplo, un incremento del LCR en el ESA obliga al tejido nervioso a disminuir su volumen, resultando entre otros en dilatación ventricular. El grado de dilatación depende de la presión efectiva del LCR la cual se contrarresta con la resistencia de los colectores venosos. La sangre en la porción venosa del tejido nervioso, en conjunto con el fluido extracelular, juegan un papel reversible en la restauración y reducción de la masa de tejido nervioso. Estos factores explican la razón de porque desde el punto de vista físico, se

considera que ME y cerebro son tejidos elásticos y esponjosos (Greitz et al., 1992; Novak et al., 2000).

Metabólica: mantiene constante el medio extracelular del SNC. El cerebro depende de la química del LCR que esta estabilizado dentro de límites tolerables, cumpliendo con un importante papel en la homeostasis del SNC.

Transporte y distribución de gases, nutrientes, hormonas, y células troncales: el epitelio ependimario y otras estructuras periventriculares se nutren a partir del LCR. Para mantener el cerebro, proporciona una gama completa de vitaminas, péptidos, nucleósidos y factores de crecimiento. Además transporta señales hormonales en el interior del SNC. También contribuye con el transporte hacia el encéfalo de determinadas sustancias. Además provee solutos orgánicos para nutrición y apoyo trófico, transporta moléculas que ajustan pH, osmolaridad, y moléculas para regular respuesta inmune. Por otro lado, la presión parcial de oxígeno en el LCR es significativamente más alta en comparación con la que se observa en la ME o en las raíces nerviosas, lo que apoya al aporte de oxígeno al tejido nervioso (Bloor, 1961; Johanson et al., 1998; Kho, 2005).

El LCR se ha estudiado históricamente en el contexto del adulto; ahora se sabe que es fundamental para el desarrollo del SNC. Las células troncales del SNC están dentro del LCR el cual contiene durante el desarrollo grandes cantidades de proteínas incluyendo factores tróficos sintetizados y secretados directamente por el PC, en contraste con solo trazas en el adulto. El LCR fetal tiene el potencial para mantener viabilidad y estimular proliferación de células germinales *in vitro*, de manera diferencial de acuerdo al tiempo en que es extraído del feto. En los casos donde el flujo de LCR es anormal, por ejemplo cuando esta ausente (en espina bífida) o bloqueado (en hidrocefalia), el SNC se desarrolla de manera anormal. Trabajos en modelos de rata con hidrocefalia apuntan a un papel crítico del LCR para mantener la proliferación normal de células troncales de la corteza cerebral

en desarrollo (Chodobski y Szmydynger-Chodobska, 2001; Miyan et al., 2003; Gato y Alonso 2004; Miyan et al., 2006).

Excretora: El SNC carece de capilares linfáticos por lo que los productos del metabolismo cerebral, sólo pueden ser eliminados por dos vías: por el flujo capilar o por el LCR. La circulación sanguínea cerebral es la vía más importante (flujo de 800 mL/minuto) pero en condiciones patológicas la vía del LCR (por ejemplo para la eliminación de metabolitos y toxinas) parece ser muy importante. El mantenimiento de la pureza de la composición del LCR es de importancia primordial y depende de mecanismos eficientes de remoción, siendo esencial para la función neuronal eficiente.

Existen los sistemas proximal y distal, que desempeñan un papel importante en la eliminación de sustancias nocivas. Esto ocurre de tres maneras:

a. Los transportadores de reabsorción en la membrana apical del epitelio coroideo, eliminan activamente aniones orgánicos y péptidos del LCR ventricular. Este espacio complementa la reabsorción activa de los metabolitos innecesarios en los capilares cerebrales.

b. El LCR recién elaborado fluye continuamente a través del interior del SNC donde actúa como un “receptor” de los metabolitos que por gradientes de concentración son difundidos hacia los ventrículos. Estas sustancias pasan a través del sistema de derivación ventrículo-subaracnoideo por el flujo a granel a los sitios de drenaje distal.

c. La eliminación de los metabolitos intermedios por fuera del sitio de flujo del LCR, en las interfaces aracnoideas-linfático-venosa. (Greitz et al., 1992; Novak et al., 2000).

Vehículo para agentes terapéuticos: existe una “barrera” para el movimiento de sustancias entre la sangre y el tejido del SNC (barrera hematoencefálica) y entre la sangre y el LCR (barrera hematoencefálica-LCR). Estas barreras limitan el acceso de múltiples compuestos incluyendo diversos fármacos, factores tróficos, etc. Estas barreras se han franqueado mediante inyección intratecal de muchas de estas sustancias, que utilizan al LCR como vehículo para que a través de su circulación en el espacio subaracnoideo alcancen los blancos nerviosos deseados (Brightman y Reese, 1969).

Recientemente se ha utilizado también al LCR como vehículo para transportar, a través del espacio subaracnoideo, células troncales implantadas con fines terapéuticos después de LTME (Ohta et al., 2004; Satake et al., 2004).

Respuesta de los PC a procesos patológicos del SNC

En las enfermedades y lesiones del sistema nervioso se generan metabolitos nocivos y citocinas que son transportadas al epéndimo, piamadre, *glia limitans*, aracnoides y epitelio del PC. Estas células manejan catabolitos y fragmentos de péptidos al trasladarlos al sistema circulatorio sistémico para que sean eliminados o secuestrados en lisosomas para su conversión metabólica, así las sustancias indeseables son removidas desde la interfase SNC-LCR (Nilsson et al. 1992, Strazielle y Gherzi-Egea, 2000).

El LCR también transporta moléculas de señalización desde las regiones alteradas del SNC hasta el PC donde se unen a receptores y estimulan diversas respuestas bioactivas. En el PC de los mamíferos existe una amplia variedad de sitios de unión para péptidos, proteínas y otras sustancias orgánicas (17). Como respuesta, sintetizan péptidos, factores de crecimiento y un abanico de moléculas destinadas a reponer la homeostasis y reparar el tejido nervioso dañado (Nilsson et al. 1992, Strazielle y Gherzi-Egea, 2000).

ARACNOIDITIS POSTRAUMÁTICA

La aracnoiditis es un proceso patológico complejo y poco estudiado que al principio tiene un componente inflamatorio y que evoluciona a un proceso cicatrizal-fibrótico permanente que atrapa tejido nervioso y vascular, y altera la dinámica de la circulación del LCR. De las diversas etiologías, la traumática parece ser la más frecuente.

El deterioro neurológico tardío en pacientes con LTME, en la mayor parte de casos resulta de complicaciones asociadas a aracnoiditis posttraumática. Destacan lesiones intramedulares como formación de cavidades (microquistes, quistes y siringomielia) y lesiones extramedulares tales como médula anclada y quistes aracnoideos. Estas alteraciones aparecen a veces de manera lenta e insidioso, pueden incluso pasar desapercibidas por el paciente. Solamente la cuarta parte de los pacientes muestran evidencia clínica de deterioro neurológico. Las opciones terapéuticas incluyen derivación subaracnoidea y lisis aracnoidea, con resultados poco satisfactorios. El desconocimiento de la fisiopatología de este problema evita desarrollar tratamientos más eficientes (Caplan et al., 1990; Backe et al., 1991; Klekamp et al., 1997; Batzdorf et al., 1998; Abel et al., 1999; Schaller et al., 1999).

Aún áreas pequeñas de cicatriz meníngea se asocian con alteraciones significativas en la regulación de la dinámica del LCR y presión en el espacio subaracnoideo; el flujo del LCR puede ser turbulento como resultado del anclaje local del remanente medular (epicentro de la lesión) a la cicatriz meníngea (Schaller et al., 1999; Schwartz et al., 1999; Klekamp et al., 2002; Brodbelt et al., 2003).

JUSTIFICACIÓN

La mayor parte de estudios sobre fisiopatología de la LTME se han realizado en el parénquima medular. Existe poca información sobre los cambios que se producen en las estructuras extramedulares y en los espacios que rodean a la médula espinal después de un traumatismo raquimedular.

Es probable que existan mecanismos fisiopatológicos aún no identificados después de una LTME. Este podría ser el caso de las alteraciones en el ESA espinal, tomando en cuenta que en este se alojan estructuras neurovasculares esenciales para la función neurológica y que es la vía principal para la circulación del LCR.

Los estudios efectuados sobre alteraciones en la dinámica del LCR asociados con LTME se refieren a la relación entre la aracnoiditis y el deterioro neurológico progresivo en la fase crónica. No hay informes sobre este tema en las primeras etapas de la lesión, justo cuando ocurren los mecanismos secundarios de lesión y los intentos de reparación endógena (Lopes y Mair, 1974; Cloyd y Low, 1974; Sanan y Loveren, 1999).

El sangrado subaracnoideo en el cerebro producido en modelos experimentales o en acontecimientos clínicos tales como ruptura de aneurismas y lesión cerebral traumática se ha asociado con deterioro neurológico grave e incluso como causa de muerte. En el contexto de LTME, a pesar de que se ha descrito la presencia de sangrado subaracnoideo, no existen estudios sistemáticos sobre este tema (Tjandra et al., 1989; Domenicucci et al., 2005; Jang et al., 2007; Ayer y Zhang, 2008; Schatlo et al., 2010).

El diseño del trabajo que presentamos aquí forma parte de una línea de investigación más amplia, encaminada a caracterizar posibles alteraciones

extramedulares asociadas a LTME. Dichas alteraciones podrían ser nuevos blancos terapéuticos.

PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Qué cambios histopatológicos y de permeabilidad se producen en el ESA espinal después de una LTME experimental en función de la intensidad y el tiempo transcurrido después de la lesión?

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los cambios morfológicos y de permeabilidad en el ESA espinal, en un modelo de lesión medular traumática, en función de la intensidad y tiempo transcurrido después de lesión

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar los cambios histopatológicos y la dimensión del ESA espinal a diferentes tiempos en ratas sometidas a LTME de intensidad variable.
- Caracterizar la magnitud, localización y evolución del sangrado en el ESA espinal en las primeras etapas después de LTME de diferente intensidad.
- Evaluar la permeabilidad del ESA espinal mediante estudios cualitativos y cuantitativos en ratas con LTME de intensidad variable, desde fase aguda hasta crónica.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

La lesión medular traumática producirá cambios morfológicos y de permeabilidad en el ESA espinal que variarán en función de la intensidad y tiempo transcurrido después de la lesión.

HIPÓTESIS PARTICULARES

1. La lesión medular inducirá cambios histopatológicos en las estructuras contenidas en el espacio subaracnoideo y variaciones en la dimensión de su luz, dependientes de la intensidad y tiempo transcurrido después de la lesión.
2. La contusión de la médula espinal debe ir acompañada por sangrado en el ESA, cuya magnitud, localización y evolución estarán en función de la intensidad y el tiempo transcurrido después de la lesión.
3. El traumatismo medular causará disminución de la permeabilidad del espacio subaracnoideo en fase temprana y se restituirá en la fase crónica. Los cambios serán más intensos en la lesión severa.

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación fue desarrollada en las instalaciones de Proyecto Camina A. C. y en el laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR).

Diseño experimental

Estudios estructurados para identificar en el espacio subaracnoideo:

1. Cambios anatómicos
2. Cambios en la permeabilidad

En función de la intensidad y tiempo transcurrido después de LTME.

Diseño del estudio: observacional

Finalidad: analítico

Secuencia temporal: longitudinal

Cronología: prospectivo

Intervención: observacional

Se utilizaron ratas Long-Evans, de 12 semanas de edad, hembras, con peso de 240 a 260 g al momento de someterse al trauma medular. Además se emplearon ratas íntegras (testigos de normalidad).

Se realizó observación estricta de lineamientos éticos y morales (NOM-062-ZOO-1999)

Cuadro 1. Diseño del estudio.

Tiempo postlesión	Estudio histopatológico, morfométrico del ESA	Estudio (cualitativo) permeabilidad del ESA	Estudio (cuantitativo) permeabilidad del ESA	Estudio macroscópico, microscópico o sangrado en ESA
1 hora	n = 8	n = 2	n = 8	n=3 n=8
1 día	n = 8	n = 2	n = 8	n=3 n=8
3 días	n = 8	n = 2	n = 8	n=3 n=8
7 días	n = 8	n = 2	n = 8	n=3 n=8
15 días			n = 8	
1 mes	n = 8	n = 2	n = 8	
3 meses	n = 8	n = 2	n = 8	

Fase aguda: 1 y 24 h postlesión. Fase subaguda: 3 y 7 días postlesión. Fase crónica: 30 y 90 días postlesión. Los animales se sometieron a contusión medular de intensidad leve a moderada (para ocasionar lesión clínicamente incompleta) y otros a contusión severa (para ocasionar lesión clínicamente completa). Ratas intactas fueron empleadas como control (n = 8). ESA: espacio subaracnoideo.

Métodos de anestesia, lesión y cuidados

Para los procedimientos de lesión medular, para la aplicación de un medio de contraste radiográfico y la aplicación de trazador, los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (80 mg/kg) y xylazina (8 mg/kg), aplicados por vía intramuscular.

La eutanasia se realizó mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal (IP).

Para producir la lesión, mediante técnica estéril se realizó una laminectomía a nivel T9 que permitió visualizar la porción dorsal de la médula espinal, manteniendo las meninges íntegras. Con el impactador diseñado por la U. de N.Y. se produjo una contusión dejando caer el pistón sobre la médula expuesta con las meninges intactas, desde una altura de 50 mm para lesión severa y de 12.5 mm para lesión leve a moderada. No se aceptaron errores superiores a 3% en altura y velocidad. Finalmente, la herida quirúrgica se suturó por planos, mediante sutura quirúrgica de nylon 4-0.

Después de producir la lesión, los animales se colocaron en jaulas individuales con aserrín estéril, en un ambiente de temperatura y humedad controladas y se les proporcionó agua y alimento a demanda. Aquellas ratas que sobrevivieron más de 1 día, recibieron analgésico y antibiótico durante una semana, para evitar dolor, autofagia e infecciones. Para el manejo de intestino y vejiga neurogénicos se realizó expresión manual hasta que se recuperó el automatismo (aproximadamente 2 semanas después de la lesión).

Estudio morfológico del ESA

Para la obtención de los tejidos, los animales se sacrificaron en los tiempos correspondientes. Bajo anestesia, se realizó perfusión intracardiaca con 200 ml de solución salina, seguida de 500 ml de paraformaldehído al 4%. Se extirpó la columna vertebral en bloque (de T-7 a T-12) y se colocó en el mismo fijador durante 4 días. Luego se cambió a EDTA al 12%, durante 10 días, para descalcificar las vértebras. Una vez descalcificadas se separaron e identificaron los segmentos vertebrales (individuales), haciendo un corte transversal a nivel de cada disco intervertebral (Figura 3). Se procesaron para realizar cortes

histológicos de 6 µm de espesor por congelación y se tiñeron con la técnica de tricrómica de Masson.

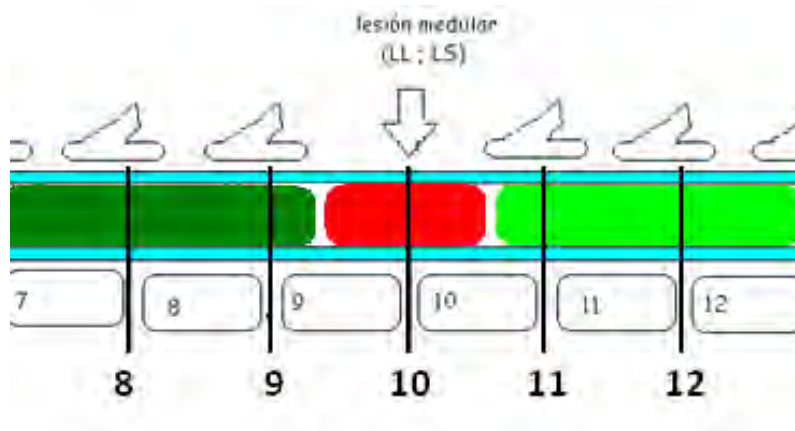


Figura 3. Separación de segmentos vertebrales torácicos. Se realizaron cortes transversales a nivel del disco intervertebral craneal a los cuerpos vertebrales 7, 8, 9, 10, 11 y 12. El epicentro se encontró en el nivel etiquetado como T10 (entre los cuerpos vertebrales T9 y T10).

Los cortes histológicos de cada nivel se fotografiaron con una cámara digital montada en un microscopio de campo claro. En una computadora personal con la ayuda del programa Image ProPlus, de Media Cybernetics, se midieron:

- Luz permeable del ESA
- área de la médula espinal
- perímetro del saco dural

Estudio del sangrado en el ESA

Para evaluar la incidencia, tamaño, evolución y localización del sangrado subaracnoideo asociado a la LTME se realizó un estudio histológico utilizando las mismas laminillas teñidas con la técnica de Masson (descritas en el rubro anterior) y cortes histológicos sin teñir o contrateñidos con yoduro de propidio para ser observados con microscopía de epifluorescencia, teniendo en cuenta que los

eritrocitos autofluorescen. Además del estudio histológico, se hicieron observaciones macroscópicas en especímenes de ratas sacrificadas a los mismos tiempos post lesión. También se grabó en video de alta definición el momento de la contusión para observar (a través de un microscopio quirúrgico) las características del sangrado subaracnoideo que se produce inmediatamente después de producir la lesión (de intensidad leve o severa).

Para el análisis histológico del sangrado, se incluyeron seis segmentos espinales (de T7 a T12). El corte transversal de cada segmento se dividió en 4 áreas: dorsal, lateral izquierda, lateral derecha y ventral. Las áreas se definieron por un plano en X, que en la mayoría de las ocasiones coincidió con la ubicación de las raíces nerviosas. Para las muestras de 1h, 1d y 3d después de la lesión, las zonas se clasificaron en función de la cantidad de sangre presente de la siguiente manera: 0, ausencia o muy pocos eritrocitos (no más de 5 por campo de 20X); 1 (leve), eritrocitos sueltos o muy pequeños coágulos libres en el ESA o adheridos a la piamadre, aracnoides, raíces o vasos sanguíneos; 2 (moderada), presencia de hematomas ocupando menos de la mitad del área de estudio, 3 (severa), grandes hematomas llenando más de la mitad del área de estudio (Figura 4). Para las muestras obtenidas 7d después de la lesión, la calificación del sangrado (0 - 3) se realizó en función de la ocupación del ESA por eritrocitos libres y hematomas en diferentes etapas de desintegración, macrófagos con eritrocitos fagocitados y bandas de colágeno. La evaluación se realizó por dos investigadores de forma independiente y a ciegas con respecto a la condición de lesión.

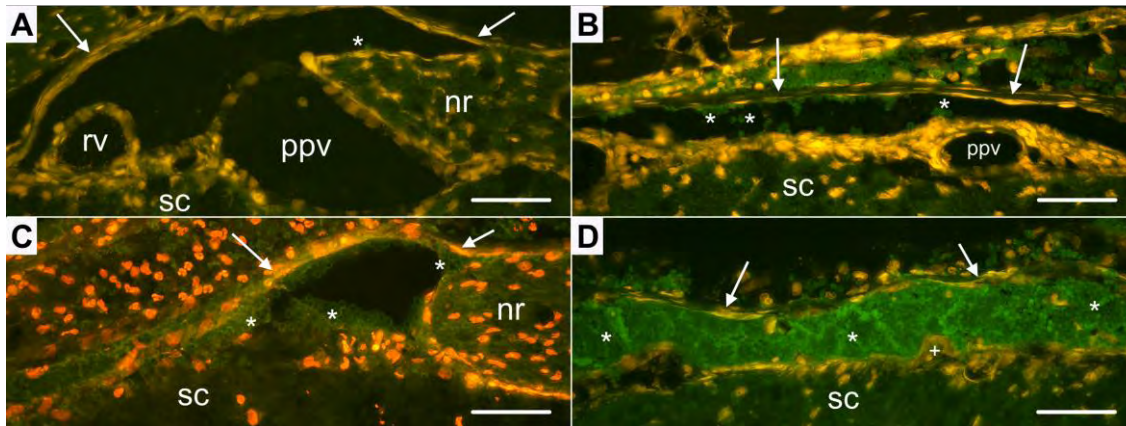


Figura 4. Imágenes representativas de la escala de puntuación histológica del sangrado subaracnoideo. A) Grado 0, en el ESA se observa solamente un eritrocito (*); B) Grado 1, se muestran eritrocitos libres y muy pequeños coágulos en el ESA (*); C) Grado 2, hematomas de tamaño medio (*) que ocupan menos de la mitad del área del ESA; D) Grado 3, gran hematoma (*) llenando toda el área del ESA. Flechas: saco dural; sc: médula espinal; nr: raíz nerviosa; rv: vaso radicular; ppv: vasos del plexo pial; +: vaso del plexo pial comprimido. Tinción de yoduro de propidio. Barras: 60 μ .

Estudio cualitativo de permeabilidad del ESA

Para estimar de manera cualitativa la permeabilidad del ESA en las diferentes condiciones experimentales, se realizaron estudios mielográficos. Los animales fueron anestesiados en los tiempos correspondientes, y se les sometió a una laminectomía completa a nivel de C2, exponiendo la médula espinal con las meninges íntegras. Se colocó al animal en un plano inclinado de 45° cabeza arriba y mediante punción subaracnoidea se extrajeron 150 μ L de LCR, después se administraron 150 μ L de Optiray 320 (Iodo 320 mg /mL). Se tomó estudio radiográfico digital 5 minutos después de la aplicación del medio de contraste radiográfico, obteniéndose una proyección latero-lateral izquierda-derecha y una ventrodorsal de la columna vertebral de la rata (desde C1 hasta L3).

Estudio cuantitativo de permeabilidad del ESA

Para evaluar *in vivo* y de manera cuantitativa la permeabilidad del ESA en las diferentes condiciones experimentales, se diseñó un nuevo método basado en la cuantificación de partículas superparamagnéticas que se recuperen en el ESA lumbar después de ser inyectadas en la cisterna magna. El procedimiento se desarrolló y validó inicialmente en ratas íntegras y con laminectomía (Franco-Bourland et al., 2013). Posteriormente se aplicó a ratas con lesión medular de intensidad leve o severa, a diferentes tiempos post lesión. Para realizar este estudio, al animal anestesiado se le practicó una laminectomía completa a nivel C1-C2 y L2-L3, exponiendo la médula espinal con las meninges íntegras. Se colocó en un plano inclinado (45° cabeza arriba) y mediante punción subaracnoidea a nivel de C1 se extrajeron 20 µl de LCR, después se aplicaron mediante la misma vía 20 µl de Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1 (partículas Superparamagnéticas en suspensión, cubiertas con estreptavidina, con diámetro de 1 µm) y fueron recuperadas inmediatamente junto con LCR a nivel L-2 mediante un capilar heparinizado que desembocó hacia un tubo Eppendorf. Se midieron el volumen de LCR y la cantidad de partículas recuperadas.

Para medir la cantidad de partículas, inicialmente el LCR recuperado se sometió a 4 ciclos de lavado en PBS. Durante los lavados, las partículas se mantuvieron separadas magnéticamente al colocar el Eppendorf que las contenía en un imán ad hoc (DynaMag™-Spin) para eliminar cualquier rastro de sangre que pudiera alterar la lectura espectrofotométrica final. Posteriormente las partículas se sometieron a una reacción enzimática al mezclarse con una solución de peroxidasa biotinilada (0.2 mg/ml en PBS) durante 30 minutos; se lavó con PBS el exceso de enzima en 3 ciclos (manteniendo las partículas en el campo magnético) y enseguida se incubaron durante 5 minutos en una solución de peróxido de hidrógeno y tetrametilbenzidina, luego la reacción se detuvo al agregar una solución de H₂SO₄. Dentro de los siguientes 30 minutos una muestra de la mezcla

de la reacción se analizó por espectrofotometría a 450 nm. El color fue directamente proporcional a la cantidad de enzima unida a las partículas y en consecuencia a la cantidad de partículas recuperadas.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la morfometría y el volumen del LCR en el estudio de permeabilidad se analizaron mediante la prueba de ANOVA de dos vías con el software InfoStat (V de 2012, de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Cada variable dependiente (área de la luz permeable del ESA, área de la ME, perímetro del saco dural y volumen del LCR) se analizó para determinar el efecto individual de la intensidad de la lesión y el tiempo transcurrido después de la lesión, así como para la interacción de ambas variables independientes. Posteriormente se realizó la prueba Tukey (contraste Post-hoc de comparaciones múltiples) para identificar grupos que fueron significativamente diferentes. Para el análisis morfométrico, la estadística se realizó por separado para cada nivel de la columna vertebral de T8 a T12. Los datos de la morfometría, se presentan gráficamente como el porcentaje de cambio respecto a la media de ratas intactas.

Los datos obtenidos de la evaluación histológica del sangrado subaracnoideo se colocaron en tablas de contingencia y fueron evaluados con la prueba de Chi-cuadrada. Los datos se presentan gráficamente de forma porcentual.

La cantidad de partículas y de LCR recuperados en el diseño del estudio cuantitativo de permeabilidad del ESA, los datos obtenidos se analizaron con una prueba no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis), debido a que los datos no tenían una distribución normal.

En todos los casos las diferencias se consideraron significativas cuando la p fue $<0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS DEL ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO DEL ESA

Uno de los hallazgos más sobresalientes de la evaluación microscópica del ESA en las fases aguda y subaguda (1 h - 7 d después de la lesión), fue la oclusión parcial y en algunos casos casi completa de la luz permeable del ESA, en comparación con los testigos intactos (Figuras 5, 6 y 7). Otro hallazgo importante en estos estadios tempranos post lesión fue la presencia de hematomas subaracnoideos, grado 3 estuvieron presentes en la mayoría de las muestras especialmente en especímenes con lesión severa (Figuras 6 y 7). El sangrado subaracnoideo que ocurre después de lesión se estudió por separado y los resultados se describen más adelante. Los vasos sanguíneos y raíces nerviosas contenidas en el ESA aparecieron con frecuencia comprimidas entre el saco dural y la ME. La compresión neuro-vascular pareció más intensa en lesiones severas en comparación con las leves (Figuras 6 y 7) y más cerca del sitio de la lesión que fuera de ella. En la fase aguda, el parénquima de la ME mostró hemorragias, inflamación e infartos (Figura 6); en la fase subaguda se observaron en la ME lesiones necróticas y hemorrágicas (Figura 7).

En la fase crónica (1m - 3m después de la lesión) la histopatología mostró la restitución de la luz permeable del ESA, atrofia de la ME con quistes intramedulares de varios tamaños, y aracnoiditis postraumática, caracterizada por anclaje de la médula (unión fibrosa de la ME con el saco dural), quistes subaracnoideos y raíces nerviosas atrapadas (Figura 8). Los signos de aracnoiditis fueron mucho más evidentes en lesiones severas en comparación con lesiones leves.

El análisis morfométrico reveló cambios en las dimensiones de la luz permeable del ESA, en el área de la ME (sección transversal) y en el perímetro del saco

dural. Estos cambios ocurrieron de acuerdo con el tiempo transcurrido después de la lesión, la severidad de la lesión y el nivel de la columna respecto a la zona de lesión. En general, los cambios mayores se observaron en lesiones severas, en el epicentro de la lesión y en los segmentos adyacentes. La descripción gráfica y significancia estadística de estos cambios se muestran en las figura 9.

En las fases aguda y subaguda después de la lesión, el área de la luz permeable del ESA se redujo después de lesiones leves y severas en relación con especímenes intactos, pero se incrementó en la etapa crónica en relación con las mediciones realizadas en las primeras etapas (Figura 9).

De 1 h a 3 d, el área de ME se observó aumentada con respecto a especímenes intactos; a los 7d fue similar el área medular medida en las ratas lesionadas al compararla con las intactas; en la fase crónica esta área se redujo significativamente en las ratas lesionadas. Los cambios en el perímetro del saco dural fueron menores en las fases aguda y subaguda; este parámetro se redujo significativamente en la etapa crónica de la lesión (Figura 9).



Figura 5. Imágenes representativas del ESA en rata intacta, nivel T10. Imagen panorámica (A, 4x) y detalles (B y C, 20x y 40x respectivamente). Flechas: saco dural; *: ESA amplio; &: vasos del plexo pial permeables; #: rama de arterias radicales; r: raíces nerviosas libres contenidas en el ESA; ed: espacio epidural. Tinción de Masson. Barras: A, 0.5 mm; B, 100 μ m; C, 50 μ m.



Figura 6. Especímenes del sitio de lesión (T10) en el estadio agudo. A, vista panorámica de espécimen con lesión leve de 1 día postlesión, en donde se muestra la luz del ESA (*) parcialmente reducido. B, detalle de A donde se muestra una raíz nerviosa libre (r) y un vaso del plexo pial permeable (&). C y D, vistas panorámicas de especímenes de ratas con lesión severa de 1 día postlesión, donde se muestra gran disminución de la luz del ESA (*), presencia de grandes hematomas subaracnoideos (+); el parénquima medular muestra zonas hemorrágicas e infartos de manera difusa, y ligera hinchazón. E y F son detalles de D; E muestra sangrado subaracnoideo (+) alrededor de estructuras neurovasculares y F muestra la compresión de una raíz nerviosa entre el saco dural y la médula espinal (flechas). Tinción de Masson. Barras: A, C y D, 0.5 mm; B, E y F, 100 μ m.

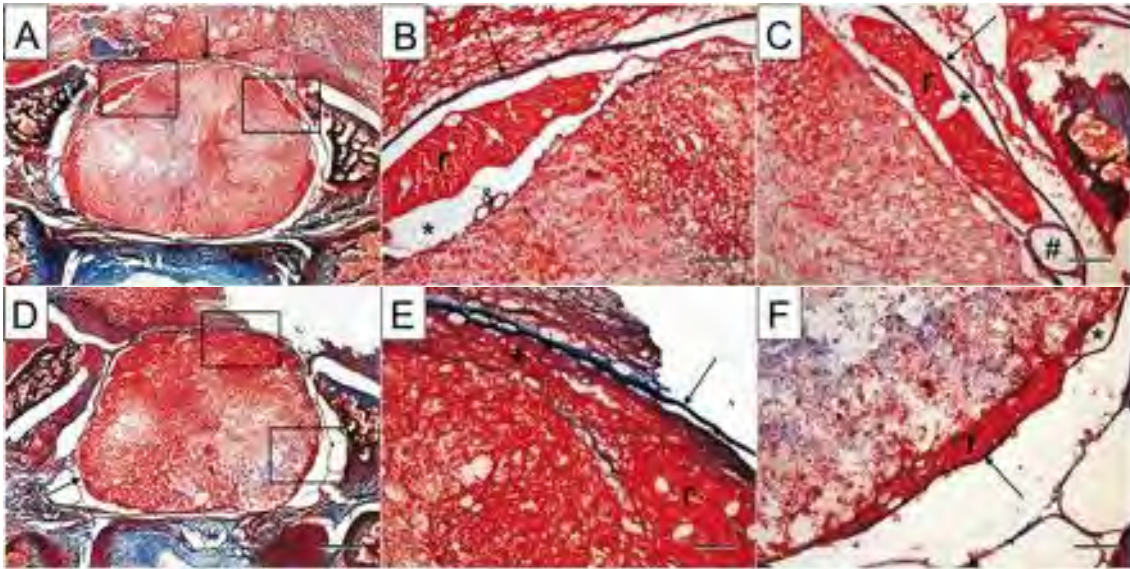


Figura 7. Especímenes del sitio de lesión (T10) del estadio subagudo. A-C son imágenes de lesión leve de 7 días, donde se muestra el ESA con discreta reducción (*), raíces nerviosas (r) no comprimidas y vasos sanguíneos piales (&) y ramas radiculares (#) permeables. La médula espinal muestra áreas necróticas y de hemorragia. D-F, imágenes de lesión severa de 7 días; muestran oclusión casi completa del ESA (*), compresión de raíces nerviosas (r), y de vasos sanguíneos radiculares y piales. Se observa la presencia de hematomas estructurados (+) entre el saco dural (flechas) y la médula espinal. El parénquima medular muestra abundante tejido desvitalizado. Tinción de Masson. Barras: A y D, 0.5 mm; B, C, E y F, 100 μ m.

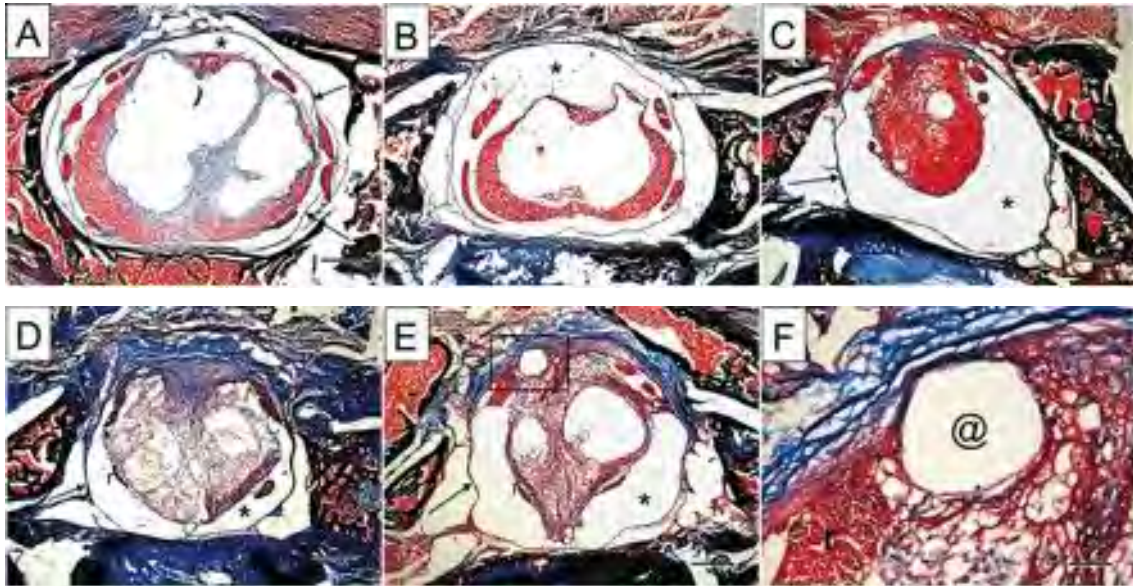


Figura 8. Especímenes del sitio de lesión (T10) del estadio crónico. A y B son imágenes de lesión leve de 1 mes y tres meses respectivamente, que muestran la atrofia de la médula espinal y restitución de la Luz permeable del ESA (*), las raíces nerviosas se encuentran libres en dicho espacio, y aparecen de un tamaño normal, no existe anclaje de la médula al saco dural. C-E son imágenes de 3 casos de lesión severa crónica, las flechas muestran la constricción del saco dural, se aprecia también severa atrofia de la médula espinal y restitución de la luz permeable del ESA (*); se observa anclaje de la porción dorsal de médula espinal a el saco dural, atrofia severa de raíces nerviosas (r) y superficie pial de forma irregular. F, detalle de E que muestra un quiste subaracnoideo. Tinción de Masson. Barras: A - E, 0.5 mm; F, 100 μ m.

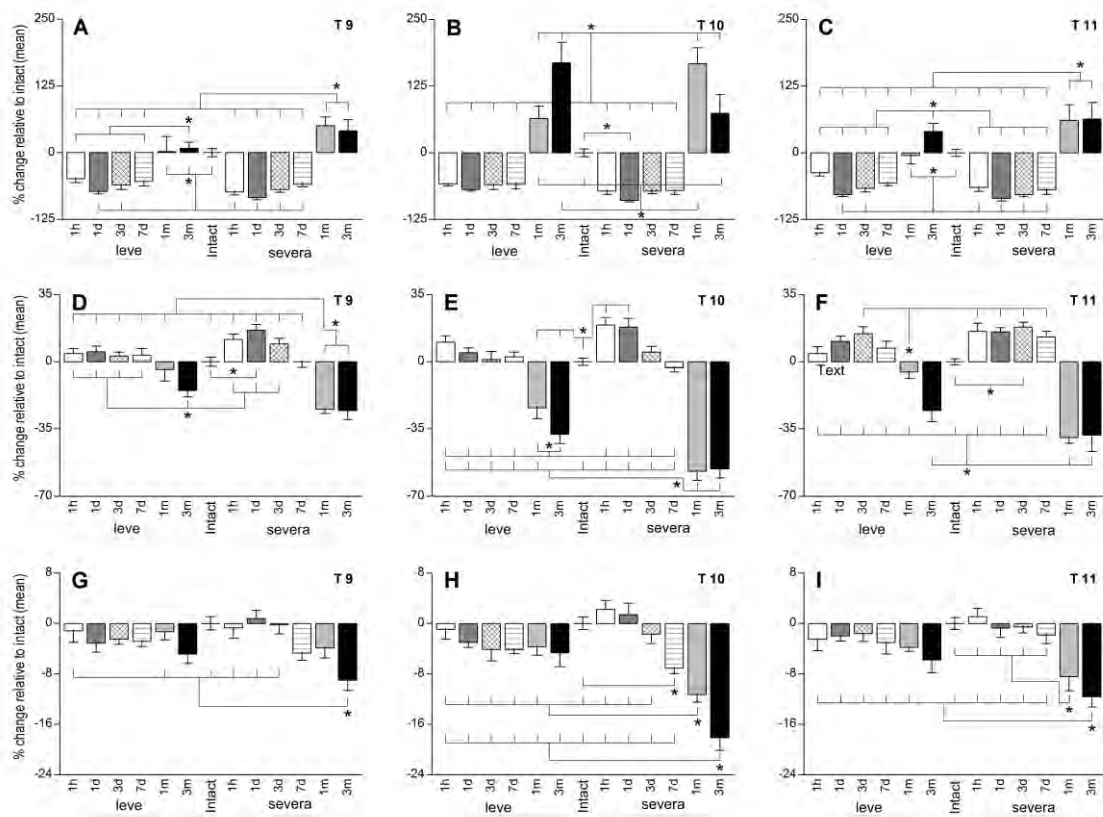


Figura 9. Resultados de morfometría de T9 a T11. A, B y C: área de la luz permeable del ESA. D, E y F: área de la ME. G, H e I: perímetro del saco dural. Las gráficas muestran la media \pm el error estándar del porcentaje de cambio respecto a la media de especímenes de rata intacta, en periodos de tiempo que van de 1 hora a 3 meses post lesión, tanto en lesiones leves como en severas. Los datos se analizaron mediante la prueba de ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey (contraste Post-hoc de comparaciones múltiples) para identificar grupos que fueron significativamente diferentes (* : P < 0,05).

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL SANGRADO SUBARACNOIDEO ESPINAL

Observaciones macroscópicas

El sangrado subaracnoideo fue mas extenso e intenso: a) en lesiones severas en comparación con lesiones leves, b) en el epicentro y segmentos adyacentes en comparación con segmentos distantes al sitio de lesión, c) en etapas tempranas en comparación con etapas tardías, y d) en la región dorsal en comparación con la ventral y laterales. Las áreas con sangrado más abundante mostraron un color marrón oscuro, mientras que en áreas de menor sangrado predominaron tonos de gris. El color se fue desvaneciendo paulatinamente entre especímenes con el paso del tiempo, y en un mismo espécimen, al alejarse de la zona de lesión (Figura 10).

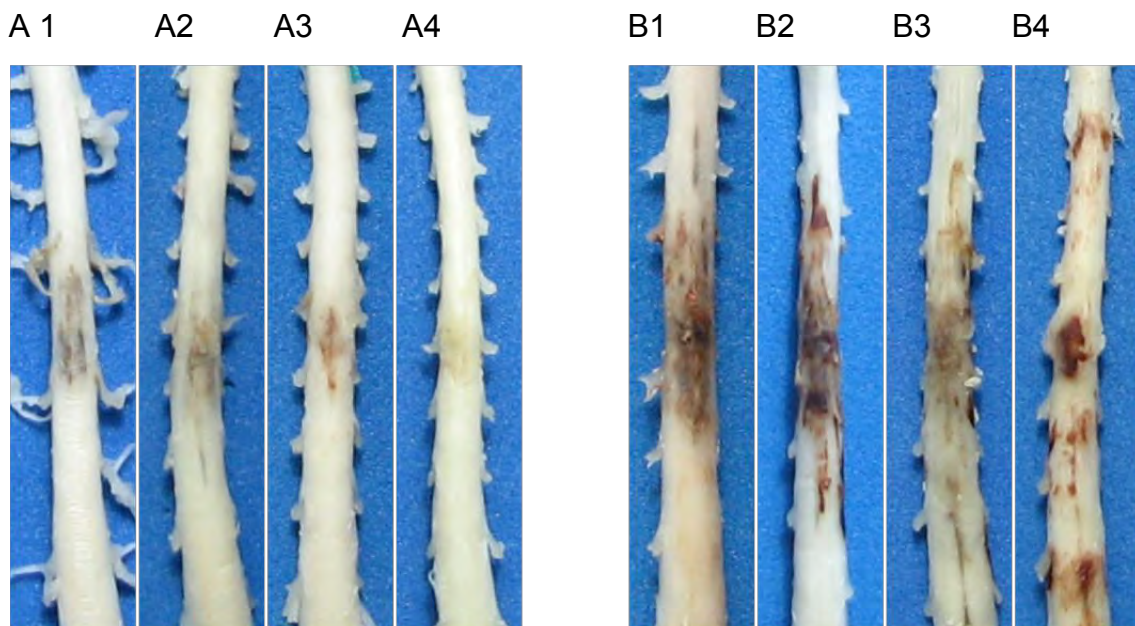


Figura 10. Imágenes macroscópicas representativas de la apariencia y evolución temporal del sangrado subaracnoideo espinal después de LTME. Fotografías de la superficie dorsal, con orientación céfalo-caudal de arriba hacia abajo. A, especímenes con lesión leve. A1 y A2: fase aguda post lesión (1h,1d); A3 y A4:

fase subaguda (3d, 7d). B, especímenes con lesión severa. B1 y B2: fase aguda (1h,1d); B3 y B4: fase subaguda (3d, 7d).

Presencia y magnitud del sangrado subaracnoideo

En la figura 11 A se muestra en resumen la presencia de sangrado subaracnoideo tomando en cuenta todas las áreas examinadas (para todos los segmentos vertebrales, en todos los tiempos experimentales). En lesiones leves se observó sangrado subaracnoideo en el 15% de las áreas examinadas (grado 1 en el 13% y grado 2 en el 2%) mientras que el resto no mostró sangrado (grado 0). En lesiones severas se observó sangrado en el 48% de las áreas analizadas (grado 1 en el 25%, grado 2 en el 17% y grado 3 en el 6%). La diferencia en la incidencia y magnitud del sangrado entre lesiones leves y severas mostró una significancia de $p < 0,0001$.

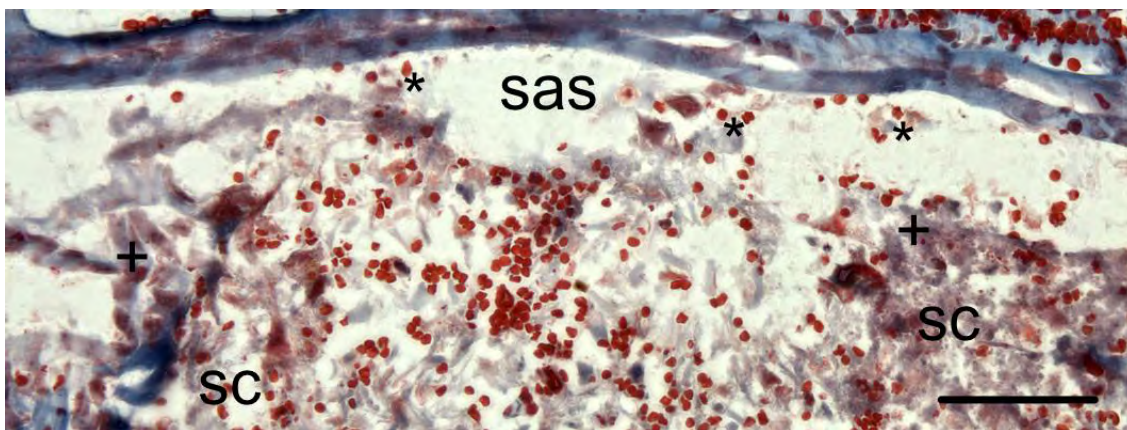
Evolución del sangrado subaracnoideo y tipo de células inflamatorias asociadas

La cantidad de sangre extravasada dentro del espacio subaracnoideo disminuyó significativamente con el tiempo, sobre todo después de lesiones severas donde pasó de 72% (a 1 hora post lesión) a 27% en el día 7 ($p < 0,0001$), y del 18% al 9%, respectivamente, en lesiones leves ($p = 0,0106$) (Figura 13).

En los registros que hicimos en video antes, durante y después de la lesión, observamos que el sangrado subaracnoideo comenzó inmediatamente después de la lesión. La mayor parte del sangrado en lesiones severas se originó de la ruptura de vasos grandes (por ejemplo de la vena vertebral posterior) aunque también se observaron pequeñas hemorragias originadas aparentemente de la ruptura de vasos piales y/o de vasos radicales de pequeño calibre; las hemorragias individuales confluyeron para formar hematomas grandes. En lesiones leves, el sangrado generalmente surgió de vasos pequeños; los

sangrados dispersos que resultaron, en general no se agruparon para formar hematomas.

Las células inflamatorias asociadas con la hemorragia subaracnoidea a 1 h, 1 d, y 3 d después de la lesión fueron leucocitos polimorfonucleares, mientras que en el día 7 después de la lesión, las células inflamatorias observadas fueron macrófagos (Figura 11).



La Figura 11. Ruptura de la piamadre en el sitio de la lesión. Micrografía de un espécimen de 3 d postlesión (lesión severa), que muestra eritrocitos (*) que aparentemente se difunden libremente desde la médula espinal (sc) en el espacio subaracnoideo (SAS) a través de la ruptura de la piamadre (+). Tinción de Masson. Barra de escala: 60 μ m.

Distribución cráneo-caudal del sangrado subaracnoideo

Al considerar todos los segmentos vertebrales evaluados (de T7 a T12) el mayor sangrado subaracnoideo se observó en el epicentro en T10 (Figura 12). A este nivel se observó algún grado de sangrado en el 68% de lesiones severas y en 24% de lesiones leves. En ambos casos disminuyó gradualmente al alejarse del sitio de lesión. El menor sangrado en ambos tipos de lesiones fue menor en T7,

31% en lesiones severas ($p < 0,0001$) y 5% en lesiones leves ($p = 0,0031$) (Figura 13).

Localización circunferencial del sangrado subaracnoideo

La mayor cantidad de sangrado subaracnoideo se encontró en la región dorsal de especímenes con ambas intensidades de lesión. En lesiones severas en el 72% de los casos, mientras que en lesiones leves en el 26%. La menor cantidad en lesiones severas se observó en la región ventral (35%, $p < 0,0001$) y en lesiones leves en la región lateral derecha (8%, $p < 0,0001$) (Figura 13).

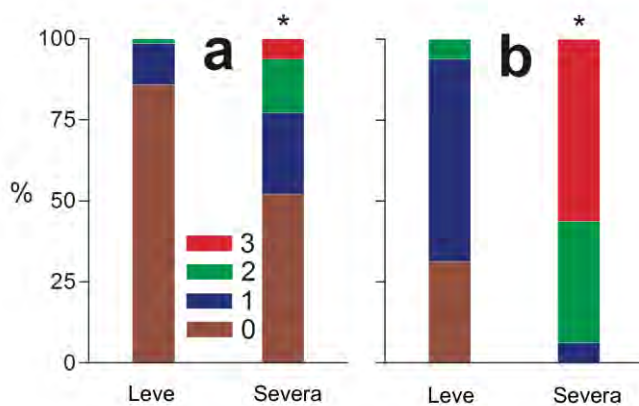


Figura 12. Incidencia de hemorragia subaracnoidea postraumática. a) Ocurrencia del sangrado en todas las áreas estudiadas (para todos los segmentos vertebrales y en todos los tiempos evaluados); b) mayor hemorragia (zona dorsal del epicentro de la lesión, 1h y 1d postlesión). Los datos se presentan gráficamente de forma porcentual. Clasificación del sangrado: escala de 0 a 3. (*), $P < 0,0001$ al comparar lesión leve vs severa.

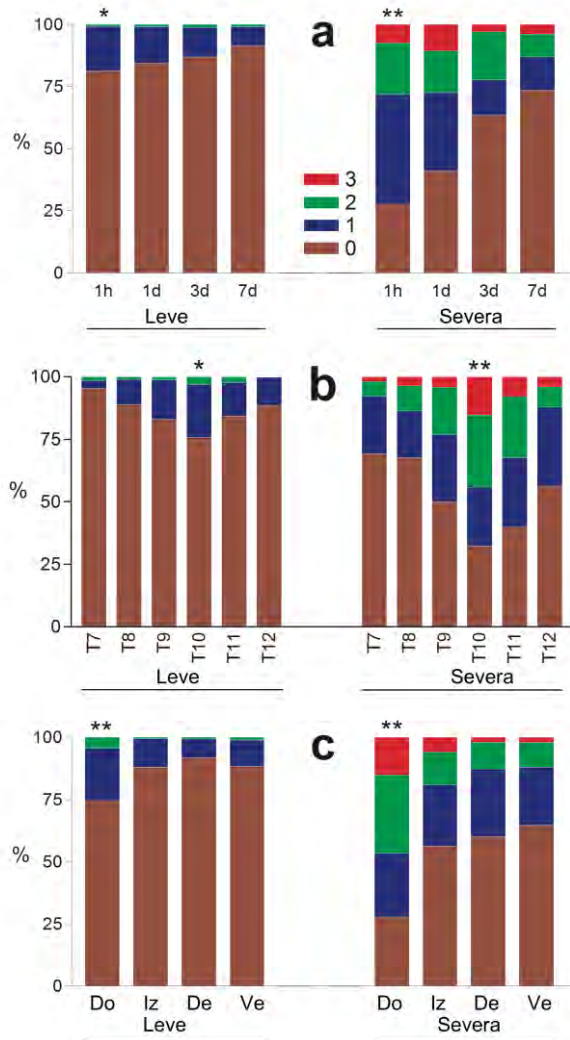


Figura 13. Progresión y ubicación de la hemorragia subaracnoidea. a) Progresión de la sangre extravasada de 1 h a 7 d después de la lesión (incluye las evaluaciones de las 4 zonas de cada uno de los 6 segmentos vertebrales estudiados); b) extensión cráneo-caudal de sangrado para cada segmento vertebral de T7-T12 (incluye la 4 áreas de cada segmento vertebral, en todos los tiempos evaluados); c) localización circunferencial de sangrado, zonas: dorsal (Do), lateral izquierdo (Iz), lateral derecha (De), ventral (Ve) (incluye los 6 segmentos vertebrales en todos los tiempos estudiados). Los datos se presentan gráficamente de forma porcentual. Clasificación del sangrado: escala de 0 a 3. (*),

significativo; (**) altamente significativo. Los datos se comparan para las lesiones leves y severas por separado.

RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD DEL ESA

Estudio cualitativo de la permeabilidad del ESA

El ESA se definió mejor en la proyección radiográfica latero-lateral izquierda derecha en comparación con la ventrodorsal de la columna vertebral de las ratas (C1 a L3). Las imágenes laterales mostraron un espesor no homogéneo del ESA, éste aparece más delgado a nivel de la región torácica central. Las columnas de medio de contraste no fueron simétricas, a veces aparecieron más intensas en la región dorsal y otras veces en la región ventral. En las ratas intactas y en las ratas con lesión crónica (leve y severa) el ESA fue permeable al medio de contraste. En las ratas con lesiones agudas (1 día: leve y severa) y con lesión severa subaguda (7 días) el flujo del medio de contraste fue bloqueado varios segmentos vertebrales craneales al sitio de lesión. En las ratas con lesiones leves subagudas la columna de medio de contraste alcanzó el sitio de lesión.(Figura 14).

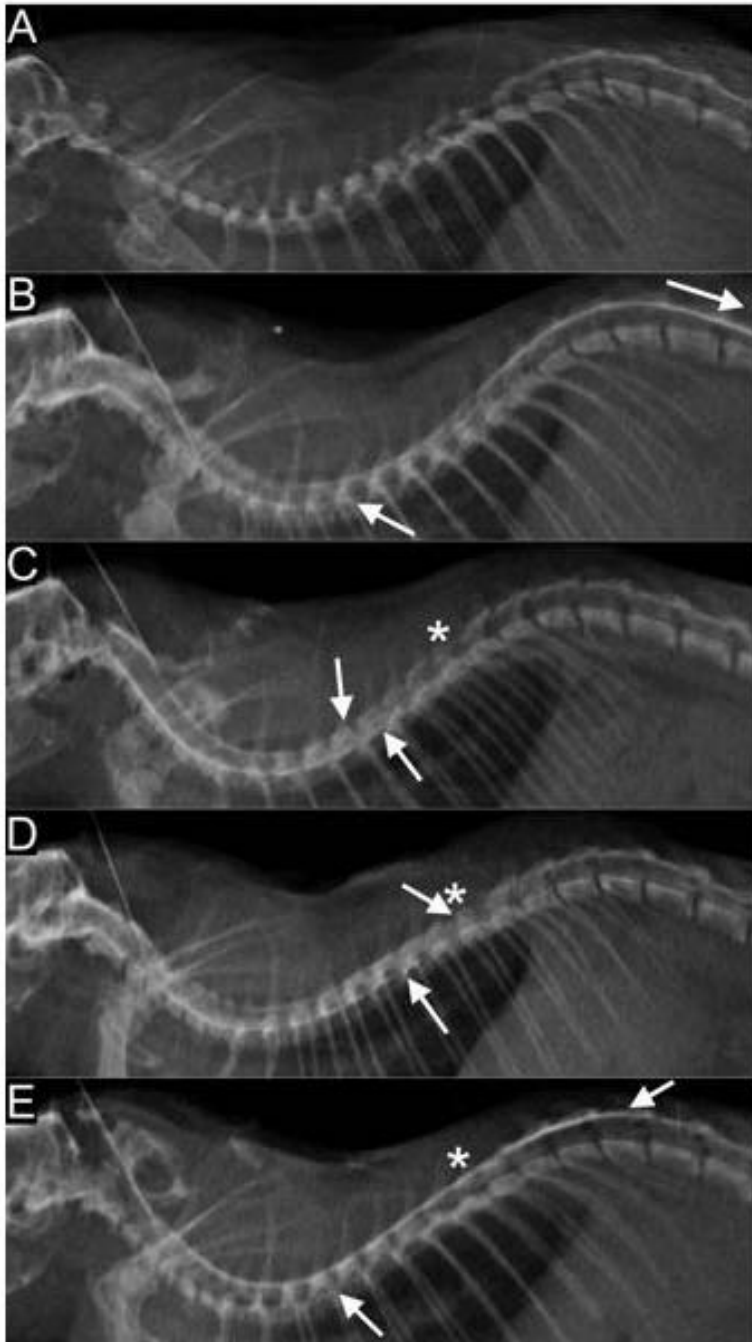


Figura 14. Imágenes representativas de mielografías. A, radiografía de control de una rata íntegra sin medio de contraste radiológico. B, mielografía que muestra la permeabilidad del ESA al medio de contraste radiológico en una rata intacta. C, mielograma que muestra que la columna de contraste es bloqueada algunos

segmentos vertebrales craneales al sitio de lesión, la imagen corresponde a una rata con lesión severa de 1 día. D, mielografía que muestra que la columna de contraste se detiene en el sitio de lesión en una rata con lesión leve de 7 días post lesión. E, mielograma que muestra la permeabilidad del ESA al medio de contraste más allá del sitio de lesión en una rata con lesión severa de 1 mes. (*), sitio de lesión; flechas, punto final de la columna de contraste dorsal y ventral. En la imagen B la flecha indica que el medio de contraste continuó en dirección caudal.

Estudio cuantitativo de la permeabilidad del ESA

La recuperación de PSPM en L2 (después de su inyección intracisternal) como indicador de la permeabilidad del ESA se muestra en la figura 13. Se observó una disminución de la permeabilidad del ESA en las fases tempranas de la lesión, que alcanzó el nivel más bajo entre 1 h y 3 d para lesiones severas y entre 1 h y 3 d para lesiones leves. La permeabilidad tiende a recuperarse a partir del día 7. Cabe mencionar que en las ratas que solo fueron sometidas a laminectomía y evaluadas 1 día después de tal procedimiento, se observó una disminución importante de la permeabilidad del ESA, similar a la observada a 1 h después de lesión leve. (Figura 15)

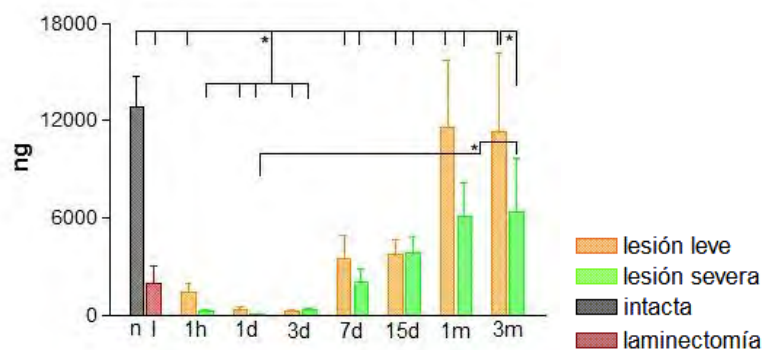


Figura 15. Nanogramos de partículas superparamagnéticas recuperadas en L2 después de haber sido inyectadas en la cisterna magna. Datos expresados como

media \pm error estándar y analizados mediante prueba de Kruskal-Wallis. *, $p < 0.05$

El volumen de LCR recuperado junto con las PSPM también mostró algunos cambios significativos que se muestran en la figura 14. Destaca el hecho que la menor cantidad de LCR se obtuvo entre 1 h y 3 d post lesión, de manera más acentuada en lesiones severas (Figura 16).

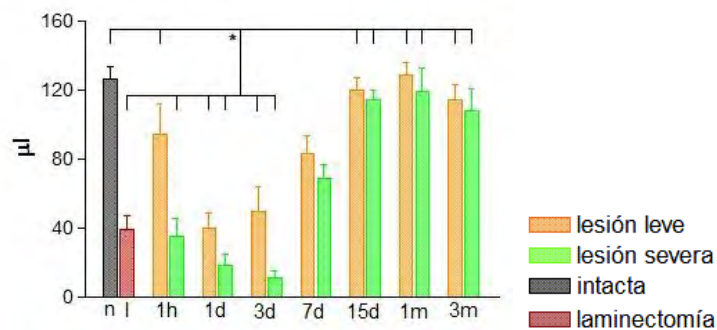


Figura 16. Volumen de LCR obtenido en L2 al momento de recuperar las partículas superparamagnéticas. Datos expresados como media \pm error estándar y analizados mediante ANOVA de 2 vías, seguida por la prueba de Tukey. *, $p < 0.05$

DISCUSIÓN

En el presente estudio observacional se muestran datos histológicos y de permeabilidad que confirman nuestra hipótesis de que en ratas sometidas a contusión experimental de ME, se producen cambios en el ESA que varían en función de la intensidad y tiempo transcurrido después de la lesión. Las alteraciones que ocurren en el ESA espinal después de LTME son potencialmente relevantes para la fisiopatología y terapéutica de la lesión medular.

ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL ESA

Cambios tempranos en la luz permeable del ESA

Durante la etapa temprana después de la lesión, la reducción del área de la luz permeable del ESA es el evento extramedular más destacado. Aunque este evento se observa en la primer semana después de la lesión, la magnitud, la causa aparente, y la extensión craneocaudal varían de acuerdo a la severidad y el tiempo transcurrido después de la lesión.

Para lesiones severas, la disminución del área de la luz permeable del ESA parece estar asociada con un aumento en el volumen de ME (hinchazón) de 1 hora a 3 días después de la lesión, mientras que a los 7 días, cuando desaparece la hinchazón de la ME, se asocia con una constricción del saco dural a juzgar por disminución de su perímetro. La presencia de hematomas subaracnoideos y en algunos casos el hinchazón de las raíces nerviosas también contribuyen a la reducción del área de la luz permeable del ESA.

En contraste, en las lesiones leves la hinchazón de la ME tiende a ser menor y la constricción del saco dural tiende a ser mayor en comparación con lesiones severas. Además, los hematomas subaracnoideos son más pequeños y menos

frecuentes. En estudios anteriores se han mencionado la obstrucción del ESA espinal en las primeras etapas de lesión completa e incompleta de ME, pero no se describe la causa y evolución a largo plazo de la permeabilidad del ESA (Kwon et al., 2009).

Aunque no relacionado con la disminución del área de la luz permeable del ESA, otros han descrito el edema en la médula espinal en respuesta a la lesión, al parecer en función de la severidad (Sharma et al., 1993; Farooque et al., 1996).

Posibles implicaciones de los cambios tempranos del ESA espinal en el flujo del LCR y la circulación sanguínea en el tejido nervioso

La reducción de la luz del ESA (la principal vía de flujo de LCR) que ocurre durante la primera semana después de la lesión debe obstaculizar o suprimir la circulación del LCR espinal. Como se sugiere en los mielogramas y en el estudio de permeabilidad cuantitativo. Es notable que los cambios en la dinámica del flujo de LCR en las etapas tempranas después de LTME han sido ignorados como parte de los mecanismos implicados en la fisiopatología de la lesión aguda, a pesar de que el LCR es esencial para la función normal del SNC y está implicado en múltiples condiciones neuropatológicas (Zapatero y Lehtinen, 2012).

El LCR entra en contacto íntimo con el tejido del SNC con el que intercambia materiales bidireccionalmente. Transporta numerosas sustancias que proporcionan nutrición, ajustan el microambiente (por ejemplo, el pH y osmolaridad), dan soporte trófico, regulan la respuesta inmune y están involucradas en diversos mecanismos de señalización. El LCR también suministra oxígeno al tejido nervioso. Además, el flujo del LCR juega un papel importante en la sustitución de los vasos linfáticos que están ausentes en la ME y las raíces nerviosas (Kazemi et al., 1968; Johanson et al., 2004; Johanson et al., 2011).

Uno puede especular que las alteraciones en la circulación del LCR pudieran interferir con los mecanismos auto-reparadores tales como la eliminación de sustancias dañinas generadas en el sitio de la lesión y el funcionamiento adecuado del sistema plexo coroideo-LCR, donde el plexo coroideo recibe información a través de la llegada de moléculas generadas en el sitio de la lesión y responde mediante la síntesis de una variedad de sustancias biológicamente activas (por ejemplo, factores tróficos, hormonas, y proteínas transportadoras) que viajan a través del LCR a las células blanco en los tejidos neuronales lesionados para apoyo de los procesos de reparación (Chodobski y Szmydynger-Chodobska, 2001; Johanson et al. 2011).

Como consecuencia de la oclusión de la luz del ESA, los vasos sanguíneos y las raíces nerviosas contenidas en el ESA son comprimidas con mayor intensidad en las lesiones severas que en las lesiones leves.

El suministro de sangre a la ME proviene de las arterias radicales y del plexo vascular pial, ambos elementos contenidos en el ESA. El plexo vascular pial tiene una alta capacidad compensatoria para proteger la médula espinal de insuficiencia circulatoria cuando las arterias radicales son obstruidas o destruidas. A pesar de que no se estudió la circulación sanguínea, es razonable especular que los eventos vasculares extramedulares que describimos aquí, contribuyen a la isquemia que se produce después de la LTME (Fried et al., 1969; Tator y Koyanagi, 1997; Yoshizawa, 2002; Fassbender et al. 2011).

Si además del daño de los vasos intramedulares (por ruptura, compresión, y trombosis) hay una obstrucción de la circulación de la sangre en los vasos contenidos en el ESA, se esperaría un mayor déficit en el aporte sanguíneo a la ME. Teniendo en cuenta que el SNC es extremadamente vulnerable a eventos hipóxico-isquémicos, las alteraciones extramedulares descritas aquí deben

contribuir de manera importante a la fisiopatología del daño secundario (Tator y Koyanagi, 1997; Fassbender et al. 2011).

La oclusión del ESA no sólo podría alterar el suministro de sangre a los tejidos neurales. Es presumible que también el drenaje venoso de las raíces nerviosas y de la ME estén alterados. (Yoshizawa, 2002)

Teniendo en cuenta que las raíces nerviosas se nutren de LCR, así como de sangre, el cierre temprano del ESA podría contribuir a la radiculopatía crónica reportado después de LTME (Rydevik et al., 1990; Berman et al., 1996; Curt et al., 1997).

Cambios tardíos en el área de la luz permeable del ESA

La recuperación de la luz permeable del ESA en la fase crónica de la lesión, está asociada principalmente a la atrofia de la médula espinal. Un hallazgo inesperado en esta última fase es la constricción sustancial del saco dural en ratas con lesión severa. Tanto la atrofia medular como la constricción del saco dural ocurren en el mismo lugar en la columna vertebral, tanto en las lesiones leves como en severas, aunque es mayor en el último caso.

La recuperación de la luz permeable del ESA sugiere que el flujo del LCR es restaurado, pero no nos atrevemos a mencionar que este flujo tenga características normales, teniendo en cuenta los cambios patológicos observados en el sitio de la lesión, sobre todo en lesiones severas, en donde se observan anclaje de la médula, superficie irregular de la médula por fibrosis pial y entrapamiento de raíces nerviosas (Brodbelt et al., 2003; Reis, 2006)

Estos cambios patológicos, definidos como aracnoiditis post-traumática, se han asociado con deterioro neurológico. Son el resultado de la evolución de la

inflamación meníngea aguda a cicatrización tardía. El sangrado intratecal da lugar a la formación de hematomas subaracnoideos, como los que observamos después de lesiones severas. La sangre libre en el ESA potencializa la irritación meníngea / inflamación aguda post-traumática que puede evolucionar a arachnoiditis crónica. (Kok et al., 2002; Aldrete, 2010)

ESTUDIO DEL SANGRADO EN EL ESA

Incidencia y magnitud del sangrado subaracnoideo

Nuestros resultados muestran que la incidencia y la magnitud de la hemorragia subaracnoidea asociada con LTME, dependen principalmente de la severidad de la lesión. Las diferencias en la incidencia y magnitud de sangrado entre lesiones leves y severas son altamente significativas tanto cuando se consideran todas las áreas examinadas en el estudio, como cuando únicamente se incluyen las áreas de mayor sangrado. Cabe hacer notar que los hematomas grandes (sangrado grado 3) sólo se presentan en los casos de lesiones severas.

Nuestros hallazgos coinciden con reportes previos respecto a que la magnitud de la hemorragia subaracnoidea está en función de la severidad de la lesión (Koenig y Dohrmann, 1977). Sin embargo, a diferencia de los reportes previos, en nuestro estudio se detallan los patrones de hemorragia subaracnoidea asociada a la intensidad de la LTME.

Un hematoma subaracnoideo espinal rara vez se produce por causas diferentes a la LTME. Se le ha asociado a eventos iatrogénicos tales como: punción lumbar o a trauma vertebral menor, ambos en pacientes con trastornos de coagulación. Se ha descrito que los síntomas comienzan de forma aguda y con frecuencia evolucionan a un deterioro neurológico rápido; la mortalidad asociada a esta

condición es de aproximadamente 9 % (Tjandra et al., 1989; Domenicucci et al., 2005; Jang et al., 2007).

Origen, ubicación y destino de la sangre subaracnoidea extravasada

En relación con su origen, es evidente que la hemorragia subaracnoidea comienza con la ruptura de vasos sanguíneos de diferentes calibres en el ESA al momento de contusión; entre más grave sea el golpe, mayor será el grado de ruptura de los vasos sanguíneos, tal y como lo observamos en los vídeos obtenidos al momento e inmediatamente después de la lesión. Además, sangre emanada de la ME podría difundir al ESA, particularmente en los sitios donde se rompió la pia, como se observó en algunas preparaciones de la zona de lesión (Figura 13).

En lo que respecta a la ubicación del sangrado, la mayor cantidad se presenta en la porción dorsal del epicentro, justo en el sitio del impacto, en donde se origina el sangrado. A partir de ahí, la sangre presumiblemente se difunde a través del ESA en diferentes direcciones, tanto de forma circunferencial, como en forma craneocaudal, y decrece gradualmente a medida que se va alejando del epicentro de lesión.

Para ambas lesiones de la ME (tanto leves como severas), la mayoría de la hemorragia subaracnoidea aparece dentro de la primera hora después del traumatismo. Podemos suponer que a partir de este momento, la sangre extravasada (principalmente eritrocitos sueltos o pequeños coágulos) podría ser desplazada o removida gradualmente por el LCR, dejando solo los hematomas que son demasiado grandes para ser movidos por este medio. Otros posibles mecanismos para remover la sangre subaracnoidea podrían incluir la hemólisis y la eliminación por células fagocíticas (principalmente macrófagos), tal como mostramos a los 7 días después de la lesión (Figura 11) y se ha descrito previamente (Malloy y Low, 1976).

Posibles implicaciones de la hemorragias subaracnoideas en la LTME

En este momento solo podemos especular sobre las posibles consecuencias (tempranas y tardías) que el sangrado subaracnoideo puede tener en el resultado de una LTME.

La hemorragia subaracnoidea en el cerebro de humanos y animales de experimentación, resultado de eventos tales como ruptura de aneurismas o traumatismo craneoencefálico, desencadenan mecanismos patológicos relacionados entre sí, parcialmente atribuibles a la liberación de subproductos tóxicos de degradación de la hemoglobina (Rollins et al., 2002; Echigo et al., 2012; Greenhalgh et al., 2012; Kamp et al., 2013), que conllevan a un daño cerebral irreversible e incluso a la muerte. El déficit neurológico isquémico tardío se reconoce como la complicación más prominente después de una hemorragia subaracnoidea a nivel del cerebro (Al-Tamimi et al., 2010; Edvinsson y Povlsen, 2011), y se le ha asociado a varios mecanismos que incluyen entre otros: espasmo vascular (Chaichana et al., 2010; Koide et al., 2013), alteraciones en la autorregulación del flujo sanguíneo (Budohoski et al., 2013), disrupción de la barrera hematoencefálica (Edvinsson y Povlsen, 2011) edema (Barry et al., 2011), microtrombosis (Sabri et al., 2012), inflamación (Greenhalgh et al., 2012; Provencio et al., 2010; Schneider et al., 2012) y estrés oxidativo (Echigo et al., 2012). Condiciones como éstas, pueden a su vez, dar lugar a alteraciones en el procesamiento y transmisión de las señales neuronales (Kamp et al., 2012) necrosis (Rollins et al., 2002 infartos (Schatlo et al., 2012) y gliosis Murakami et al., 2011).

Mecanismos similares de lesión se producen después de LTME (Martirosyan et al., 2012; Oyinbo et al., 2012). Por lo tanto, es razonable suponer que la sangre extravasada en el ESA que hemos caracterizado aquí, podría ser parte de la

fisiopatología de la LTME, aunque la contribución neta de dicha hemorragia al daño de la ME tiene aún que ser determinada.

Las posibles consecuencias de la hemorragia subaracnoidea no paran ahí. Los hematomas subaracnoideos espinales pueden contribuir al desarrollo de aracnoiditis postraumática. Nuestras observaciones al día 7 postlesión (el último punto incluido en nuestro estudio de sangrado) muestran bandas de colágena dentro de los hematomas que están en el proceso de disolución. Estas observaciones coinciden con los hallazgos de Sajanti et al., 2000, quienes encontraron un incremento en LCR de la concentración de propéptidos de procolágena en pacientes con hemorragia subaracnoidea reciente. De hecho, la aracnoiditis postraumática es reconocida como una de las complicaciones tardías más frecuentes en LTME (Aldrete, 2010; Reis, 2006). Desde los estudios pioneros de Bagley en 1928 que observó el desarrollo de aracnoiditis por inyección de sangre autóloga en la cisterna magna de los perros, se ha reportado que la sangre extravasada al ESA es causa de aracnoiditis espinal crónica (Tjandra et al., 1989; Kok et al., 2000; Sajanti et al., 2000). La aracnoiditis a su vez puede producir alteraciones en la dinámica de flujo del LCR, con la subsecuente formación de siringomielia (Reis, 2006; Seki y Fehlings, 2008; Falci et al., 2009) así como a dolor neuropático debido al atrapamiento de las raíces nerviosas (Lewis, et al., 2004; Gross et al., 2013).

ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD DEL ESA

Desarrollo del estudio cuantitativo

El procedimiento más simple y accesible para evaluar la permeabilidad del ESA espinal en la rata parecía ser el trazado con un colorante. En consecuencia, para estimar la permeabilidad del ESA en ratas vivas, originalmente probamos la utilidad de riboflavina y verde de indocianina como trazadores cuantitativos (por su

determinación colorimétrica y fluorescente, respectivamente) de la permeabilidad del ESA. Sin embargo, la contaminación hemática de las muestras de LCR (que contenían los colarentes) impidió que se consiguieran mediciones fiables.

En la búsqueda de un marcador de permeabilidad del ESA, que pudiera ser medido de forma confiable, independientemente de la presencia incidental y/o patológica de sangre en muestras de LCR, recurrimos a la tecnología de separación magnética de PSPM. Las PSPM pueden ser rápida y eficazmente separadas por atracción magnética de muestras de LCR contaminado con sangre, para posteriormente lavarlas para eliminar cualquier contaminante residual. La monocapa de estreptavidina acoplado covalentemente a la superficie de las partículas permite la medición colorimétrica del producto de la reacción enzimática que se produce al agregar a las partículas peroxidasa biotinilada, seguida de peróxido de hidrógeno-tetrametilbenzidina.

Las PSPM se han utilizado en una amplia variedad de aplicaciones, con frecuencia en la separación de materiales biológicos, e incluso se han inyectado en el ESA de ratas unidos a las células, para guiarlas a un objetivo deseado con un campo magnético (Vanecek et al., 2012). Sin embargo, en la medida de nuestro conocimiento, este es el primer estudio para evaluar la permeabilidad de un espacio corporal utilizando PSPM.

La permeabilidad del ESA en ratas ha sido evaluada de forma cualitativa *in vivo* mediante mielografía y con tecnología de imagen con fluorescencia cercana al infrarrojo (Sakatani et al., 1997). A diferencia de la mielografía que solo permite establecer si existe o no permeabilidad, nuestro método permite la estimación cuantitativa de la permeabilidad del ESA espinal, incluso en condiciones de permeabilidad restringida. También se han empleado métodos histológicos para trazar las vías anatómicas por donde circula el LCR, utilizando peroxidasa, azul de Evans, y lantano (Brodbelt y Stoodley, 2007; Kashiwaguchi et al., 1989). Por otro

lado, en humanos se usan métodos de imagen sofisticados basados en el uso de radioisótopos (Mason et al., 1998) y resonancia magnética (Yiallourou et al., 2012), pero éstos no se han usado en roedores para estudios del ESA. En contraste, nuestro método permite una estimación cuantitativa *in vivo* de la permeabilidad del ESA.

La marcada reducción de la permeabilidad de ESA observada en ratas laminectomizadas en comparación con los animales intactos fue un hallazgo inesperado. Buscando resultados similares en la literatura sólo encontramos un reporte en humanos que muestran compresión importante del saco dural dentro de los 4 días siguientes a laminectomía lumbar (Awwad y Smith, 1999). El efecto de la laminectomía en la permeabilidad del ESA y en la reducción del volumen de LCR recuperado, es un tema que no ha sido estudiado. Debido al hecho de que el saco dural es una estructura membranosa viscoelástica, es razonable suponer que el saco dural se comprime como resultado del proceso inflamatorio epidural ocasionado por la cirugía y/o por enjurgitación del plexo venoso epidural, como se ha demostrado en diversas condiciones clínicas y experimentales (Onuki et al., 2010; Fukushige et al., 1999; Higuchi et al., 2005).

Cambios tempranos en la permeabilidad del ESA

La disminución marcada de la permeabilidad del ESA espinal y la reducción drástica del volumen de LCR recuperado en las fases tempranas postlesión en ambas intensidades de lesión (de manera más acentuada en lesiones severas) coinciden con los resultados del estudio morfológico respecto a la drástica reducción de la luz del ESA observada durante la primera semana postlesión. Ambos resultados refuerzan la hipótesis de que la contusión medular se asocia con alteraciones extramedulares que deben obstaculizar y/o suprimir la circulación del LCR durante las fases tempranas de la lesión.

Las observaciones hechas en el estudio cuantitativo fueron validadas por el estudio cualitativo de permeabilidad (mielografías) en etapas tempranas postlesión, en donde las columnas de medio de contraste ubicadas en el ESA se interrumpieron abruptamente varios segmentos vertebrales craneales a la lesión (1 d: leve y severa; 7d severa) o bien fueron bloqueadas en el sitio de lesión (7d leve).

Cabe mencionar que en las ratas que solo fueron sometidas a laminectomía y las evaluadas 1 h después de lesión leve, mostraron una disminución similar de la permeabilidad del ESA, en la evaluación cuantitativa.

Cambios tardíos en la permeabilidad del ESA

La recuperación de la luz permeable del ESA observada en el estudio morfológico coincide con el restablecimiento de la permeabilidad del ESA en la fase tardía de la lesión, tanto en el estudio cualitativo como en el cuantitativo. En conjunto, estas observaciones nos permiten suponer que el flujo del LCR es restaurado en la fase tardía de la lesión.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Es evidente que nuestros hallazgos histológicos no representen exactamente la configuración del ESA *in vivo* debido a la falta de LCR y de la presión intratecal. Tratando de corregir este sesgo, elegimos medir la longitud del saco dural en lugar del área rodea por este, ya que la longitud se mantiene constante Independientemente de sus pliegues. Estudios *in vivo* deben ser útiles para profundizar en el conocimiento de este tema, aunque no proporcionarán detalles finos como los descritos en el estudio morfológico.

Al proceder de un estudio observacional basado en análisis morfológicos y de permeabilidad, nuestros datos no proporcionan información sobre los mecanismos por los cuales las alteraciones subaracnoideas identificadas puede contribuir a la fisiopatología de la LTME. Creemos, sin embargo, que nuestros hallazgos representan una base sólida para la formulación de nuevas hipótesis en cuanto a los riesgos patológicos de los eventos extramedulares descritos, así como de los posibles beneficios de su control.

En cuanto al nuevo método para estimar cuantitativamente la permeabilidad del ESA, aunque se realiza *in vivo*, no se pueden realizar mediciones en serie en el mismo animal. Se recomienda, aunque no es obligatorio, la eutanasia de los animales al final del estudio debido a la invasión y los posibles efectos adversos que pudieran tener las PSPM retenidas.

INVESTIGACIONES FUTURAS

Los resultados obtenidos estimulan la realización de estudios *in vivo* utilizando técnicas dinámicas (IRM, ultrasonido, estudios de flujo y presión del LCR, influencia de cambios en el ESA sobre flujo sanguíneo medular, etc.) que sin duda contribuirán a un mejor conocimiento de la importancia de las alteraciones extramedulares en la fisiopatología de la LTME. □

Vale la pena enfatizar sobre el hecho que la hemorragia subaracnoidea asociada a LTME ha sido un tema poco estudiado. El impacto sobre su fisiopatología ha sido subestimado y merece ser abordado. Es razonable prever que se tendrán que desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el control de la hemorragia subaracnoidea espinal en el contexto de LTME.

El método que diseñado para la estimación de la permeabilidad del ESA espinal *in vivo* deberá ser útil no sólo para determinar la magnitud de la obstrucción del ESA

en procesos patológicos espinales experimentales, sino también para evaluar estrategias terapéuticas encaminadas a restablecer su permeabilidad.

CONCLUSIONES

La LTME produce alteraciones del ESA que dependen de la intensidad y el tiempo transcurrido después de la lesión, así como del nivel de la columna vertebral involucrado. Los principales resultados de este trabajo son:

1. En las fases aguda y subaguda de la LTME se produce reducción de la luz permeable del ESA y reducción importante de su permeabilidad; los elementos neurovasculares contenidos dentro del ESA aparecen comprimidos.
2. La reducción de la luz permeable del ESA en lesiones severas se asocia principalmente a la hinchazón medular y al sangrado subaracnoideo.
3. En la fase crónica, independientemente de la importante constricción del saco dural, la luz del ESA se restaura debido a la atrofia de la médula espinal. La histopatología muestra alteraciones compatibles con aracnoiditis crónica. El ESA recupera la permeabilidad.
4. En general, los mayores cambios se observaron en lesiones severas, en el epicentro y los segmentos adyacentes.

Respecto a la hemorragia subaracnoidea, ésta se produce después de LTME experimental y depende principalmente de la severidad de la lesión, siendo significativamente mayor después de contusiones severas en comparación con lesiones leves. Los hematomas grandes se asocian únicamente con lesiones severas. La mayor cantidad de sangrado en el ESA, independientemente de la intensidad del traumatismo, se produce poco después de la lesión y se encuentra dorsalmente en el epicentro. Disminuye gradualmente con el paso de tiempo y conforme se va alejando del sitio de lesión.

Se cree que la descripción detallada de los patrones de alteraciones extramedulares que se ofrecen aquí, junto con estudios futuros sobre este tópico, mejorarán la comprensión de la fisiopatología de la LTME y ello conducirá al diseño de nuevas estrategias terapéuticas más eficaces.

BIBLIOGRAFÍA

- Abel R, Gerner HJ, Smit C, Meiners T. Residual deformity of the spinal canal in patients with traumatic paraplegia and secondary changes of the spinal cord. *Spinal Cord*. 1999; 37: 14-19.
-
- Aldrete, J.A. Arachnoiditis from trauma to the spine, in: *Arachnoiditis: the evidence revealed*. J. A. Aldrete (ed). Editorial Alfil: México D.F. 2010; 121-132.
- Al-Tamimi YZ, Orsi NM, Quinn AC, Homer-Vanniasinkam S, Ross SA. A review of delayed ischemic neurologic deficit following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: historical overview, current treatment, and pathophysiology. *World Neurosurg* 2010; 73: 654-667.
- Awwad EE, Smith KR Jr. MRI of marked dural sac compression by surgical in the postoperative period after uncomplicated lumbar laminectomy. *J Comput Assist Tomogr* 1999; 23: 969-975.
- Ayer RE, Zhang JH. The clinical significance of acute brain injury in subarachnoid hemorrhage and opportunity for intervention. *Acta Neurochir Suppl* 2008; 105: 179-184.
- Backe HA, Betz RR, Mesgarzadeh M, Beck T, Clancy M. Post-traumatic spinal cord cysts evaluated by magnetic resonance imaging. *Paraplegia*. 1991; 29: 607-612.
- Bagley C. Blood in the cerebrospinal fluid: resultant functional and organic alterations in the central nervous system A. Experimental data. *Arch Surg* 1928; 17: 18- 38.

- Barry CM, Helps SC, Den Heuvel Cv, Vink R. Characterizing the role of the neuropeptide substance P in experimental subarachnoid hemorrhage. *Brain Res* 2011; 10; 1389: 143-151.
- Basauri TL, Concha JE, Mena GF, Pardo BC, Otayza MF. Estudio del flujo del líquido cefalorraquídeo (LCR) con Cine Resonancia Magnética (CINE RM) *Rev. Med. Clin Condes* 2005; 16: 19-24
- Batzdorf U, Klekamp J, Johnson JP. A critical appraisal of syrinx cavity shunting procedures. *J Neurosurg* 1998; 89: 382-388.
- Berman SA, Young RR, Sarkarati M, Shefner JM. Injury zone denervation in traumatic quadriplegia in humans. *Muscle Nerve* 1996; 19: 701-706.
- Bloor BM. A study of cerebrospinal fluid oxygen tension. *Arch Neurol* 1961; 4: 37-46.
- Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 1990; 322: 1405-1411.
- Bradshaw P. Arteries of the spinal cord in the cat. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1958; 21: 284-289.
- Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 1969; 40: 648-677.

- Brodbelt AR, Stoodley MA, Watling AM. Fluid flow in an animal model of post-traumatic syringomyelia. *Eur Spine* 2003; 12: 300-306.
- Brodbelt AR, Stoodley MA, Watling AM, Tu J, Burke S, Jones NR. Altered subarachnoid space compliance and fluid flow in an animal model of posttraumatic syringomyelia. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003; 15; 28: 413-419.
- Budohoski KP, Czosnyka M, Kirkpatrick PJ, Smielewski P, Steiner LA, Pickard JD. Clinical relevance of cerebral autoregulation following subarachnoid haemorrhage. *Nat Rev Neurol* 2013; 9: 152-163.
- Caplan LR, Norohna AB, Amico LL. Syringomyelia and arachnoiditis. *J Neurol Neurosurg Psych* 1990; 53: 106-113.
- Chaichana KL, Pradilla G, Huang J, Tamargo RJ. Role of inflammation (leukocyte-endothelial cell interactions) in vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *World Neurosurg*. 2010; 73: 22-41.
- Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J. Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 65-82.
- Cloyd MW, Low FN. Scanning electron microscopy of the subarachnoid space in the dog: 1. Spinal cord levels. *J Comp Neurol* 1974; 153: 325-368.
- Curt A, Keck ME, Dietz V. Clinical value of F-wave recordings in traumatic cervical spinal cord injury. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1997; 105: 189-193.
- Domenicucci M, Ramieri A, Paolini S, Russo N, Occhiogrosso G, Di Biasi C, Delfini R. Spinal subarachnoid hematomas: our experience and literature

review. *Acta Neurochir (Wien)*. 2005; 147: 741-750.

- Echigo R, Shimohata N, Karatsu K, Yano F, Kayasuga-Kariya Y, Fujisawa A, Ohto T, Kita Y, Nakamura M, Suzuki S, Mochizuki M, Shimizu T, Chung UI, Sasaki N. Trehalose treatment suppresses inflammation, oxidative stress, and vasospasm induced by experimental subarachnoid hemorrhage. *J Transl Med* 2012; 30; 10: 80.
- Eck JC, Nachtigall D, Humphreys SC. Questionnaire survey of spine surgeons on the use of methylprednisolone for acute spinal cord injury. *Spine* 2006; 31: 250-253.
- Edvinsson L, Povlsen GK. Late cerebral ischaemia after subarachnoid haemorrhage: is cerebrovascular receptor upregulation the mechanism behind? *Acta Physiol (Oxf)*. 2011; 203: 209-224.
- Falci SP, Indeck C, Lammertse DP. Posttraumatic spinal cord tethering and syringomyelia: surgical treatment and long-term outcome. *J Neurosurg Spine* 2009; 11: 445-460.
- Farooque, M., Hillered, L., Holtz, A., and Olsson, Y. Changes of extracellular levels of amino acids after graded compression trauma to the spinal cord : an experimental study in the rat using microdialysis. *J. Neurotrauma* 1996; 13: 537-548.
- Fassbender JM, Whitemore SR, Hagg T. Targeting microvasculature for neuroprotection after SCI. *Neurotherapeutics* 2011; 8: 240-251.
- Ferro JR, Makinistian RL. El líquido cefalorraquídeo. Publicación digital de la 1ra Cátedra de Clínica Médica y Terapéutica y la Carrera de Posgrado de

especialización en Clínica Médica Facultad de Ciencias Médicas -
Universidad Nacional de Rosario. 2011

- Fried LC, DiChiro G, Dopman JL. Ligation of major thoracolumbar spinal cord arteries in monkeys. *J Neurosurg* 1969; 31: 608-614.
- Fukushige T, Kano T, Sano T, Irie M. Computed tomographic epidurography: an aid to understanding deformation of the lumbar dural sac by epidural injections. *Eur J Anaesthesiol* 1999; 16: 628-633.
- Gato A, Martin P, Alonso MI. Analysis of cerebro-spinal fluid protein composition in early developmental stages in chick embryos. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2004; 301: 280-289.
- Greenhalgh AD, Brough D, Robinson EM, Girard S, Rothwell NJ, Allan SM. Interleukin-1 receptor antagonist is beneficial after subarachnoid haemorrhage in rat by blocking haem-driven inflammatory pathology. *Dis Model Mech* 2012; 5: 823-833.
- Greitz D, Wirestam R, Franck A. Pulsatile brain movement and associated hydrodynamics studied by magnetic resonance phase imaging. The Monroe-Kellie doctrine revisited. *Neuroradiology* 1992; 34: 370-380.
- Gross R, Hamel O, Robert R, Perrouin-Verbe B. Perilesional myeloradiculopathy with tethered cord in post-traumatic spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2013; 51: 369-374.
- Guly HR, Bouamra O, Lecky FE. Trauma Audit and Research Network. The incidence of neurogenic shock in patients with isolated spinal cord injury in the emergency department. *Resuscitation*. 2008; 76: 57-62.

- Higuchi H, Adachi Y, Kazama T. Effects of epidural saline injection on cerebrospinal fluid volume and velocity waveform: a magnetic resonance Imaging study. *Anesthesiology*. 2005; 102: 285-292.
- Hurlbert RJ. Strategies of medical intervention in the management of acute spinal cord injury. *Spine* 2006; 31: 16-21.
- Johanson CE. Arachnoid membrane, subarachnoid CSF and pia-glia. In *An Introduction to the Blood-Brain Barrier: Methodology and Biology* Edited by: Pardridge W. Cambridge, UK: Cambridge University Press 1998; 259-269.
- Johanson C, Stopa E, Baird A, Sharma H. Traumatic brain injury and recovery mechanisms: peptide modulation of periventricular neurogenic regions by the choroid plexus-CSF nexus. *J Neural Transm* 2011; 118: 115-133
- Jang WY, Lee JK, Moon KS, Kwak HJ, Joo SP, Kim IY, Kim JH, Kim SH. Traumatic acute spinal subarachnoid hematoma. *J Clin Neurosci* 2007; 14: 71-73.
- Kamp MA, Dibué M, Etminan N, Steiger HJ, Schneider T, Hänggi D. Evidence for direct impairment of neuronal function by subarachnoid metabolites following SAH. *Acta Neurochir (Wien)* 2013; 155: 255-260.
- Kashiwaguchi S, Masaki K, Ikata T. Experimental studies on permeability of tracers into the spinal cord. *Paraplegia* 1989; 27: 372-381.
- Kazemi H, Klein RC, Turner FN, Strieder, DJ. Dynamics of oxygen transfer in the cerebrospinal fluid. *Respir Physiol* 1968; 4: 24-31.

- Klekamp J, Batzdorf U, Samii M. Treatment of syringomyelia associated with arachnoid scarring caused by arachnoiditis or trauma. *J Neurosurg* 1997; 86: 233-240
- Klekamp J. The pathophysiology of syringomyelia - historical overview and current concept. *Acta Neurochir (Wien)* 2002; 144: 649-664.
- Koenig G, Dohrmann GJ. Histopathological variability in 'standardised' spinal cord trauma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1977; 40: 1203-1210.
- Koh L, Zakharov A, Johnston M. Integration of the subarachnoid space and lymphatics: is it time to embrace a new concept of cerebrospinal fluid absorption? *Cerebrospinal Fluid Res* 2005; 20; 2:6.
- Koide M, Bonev AD, Nelson MT, Wellman GC. Subarachnoid blood converts neurally evoked vasodilation to vasoconstriction in rat brain cortex. *Acta Neurochir Suppl* 2013; 115: 167-171.
- Kok AJ, Verhagen WI, Bartels RH, Van Dijk R, Prick MJ. Spinal arachnoiditis following subarachnoid haemorrhage: report of two cases and review of the literature. *Acta Neurochir (Wien)* 2000;142: 795-798.
- Kwon BK, Curt A, Belanger LM, Bernardo A, Chan, D, Marquez JA, Gorelik, S., Slobogean, G.P., Umedaly, H., Giffin, M., Nikolakis, M.A., Street J, Boyd MC, Paquette S, Fisher CG, Dvorak MF. (Intrathecal pressure monitoring and cerebrospinal fluid drainage in acute spinal cord injury: a prospective randomized trial. *J Neurosurg Spine* 2009; 10 : 181-193.
- Lewis C. Physiotherapy and spinal nerve root adhesion: a caution. *Physiother Res Int* 2004; 9: 164-173.

- Liverman TC, Altevogt MB, Joy EJ, Johnson TR. Spinal cord injury: progress, promise, and priorities. National Academy of Sciences. N.W. 2005 Washington, DC.
- Lazorthes G, Gouaze A, Zadeh JO. Arterial vascularization of the spinal cord: recent studies of anatomic substitution pathways. *J Neurosurg* 1971; 35: 253-262.
- Lopes C A, Mair WG. Ultrastructure of the Arachnoid Membrane in Man. *Acta neuropath (Berl)* 1974; 28: 167-173.
- Malloy JJ, Low FN. Scanning electron microscopy of the subarachnoid space in the dog. IV. Subarachnoid macrophages. *J Comp Neurol.* 1976; 1; 167: 257-283.
- Martirosyan NL, Feuerstein JS, Theodore N, Cavalcanti DD, Spetzler RF, Preul MC. Blood supply and vascular reactivity of the spinal cord under normal and pathological conditions. *J Neurosurg Spine* 2011; 15: 238-251.
- Mason WP, Yeh SD, DeAngelis LM. ¹¹¹Indium-diethylenetriamine pentaacetic acid cerebrospinal fluid flow studies predict distribution of intrathecally administered chemotherapy and outcome in patients with leptomeningeal metastases. *Neurology* 1998; 50: 438-444.
- Milhorat TH. Physiology of the cerebrospinal fluid. In *Cerebrospinal Fluid and the Brain Edemas* New York: Neuroscience Society of New York; 1987; 39-73.
- Miyan JA, Nabiyouni M, Zendah M. Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81:317-328.

- Miyan JA, Zendah M, Mashayekhi F. Cerebrospinal fluid supports viability and proliferation of cortical cells in vitro, mirroring in vivo development. *Cerebrospinal Fluid Res* 2006; 3: 2.
- Murakami K, Koide M, Dumont TM, Russell SR, Tranmer BI, Wellman GC. Subarachnoid Hemorrhage Induces Gliosis and Increased Expression of the Pro-inflammatory Cytokine High Mobility Group Box 1 Protein. *Transl Stroke Res* 2011; 1; 2: 72-79.
- Novak Z, Krupa P, Zlatos J. The function of the cerebrospinal fluid space and its expansion. *Bratisl Lek Listy* 2000; 101: 594-597.
- Nilsson C, Lindvall-Axelsson M, Owman C. Neuroendocrine regulatory mechanisms in the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Brain Res Brain Res Rev* 1992; 17: 109-138.
- Oresković D, Klarica M. The formation of cerebrospinal fluid: nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain Res Rev.* 2010; 24; 64: 241-262.
- Ohta M, Suzuki Y, Noda T. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp Neurol* 2004; 187: 266-278.
- Onuki E, Higuchi H, Takagi S, Nishijima K, Fujita N, Matsuura T, Ozaki M. Gestation-related reduction in lumbar cerebrospinal fluid volume and dural sac surface area. *Anesth Analg* 2010; 110: 148-153.
- Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2011; 71: 281-

299.

- Patin DJ, Eckstein EC, Harum K, Pallares VS. Anatomic and biomechanical properties of human lumbar dura mater. *Anesth Analg* 1993; 76: 535-540.
- Pollay M, Curl F. Secretion of cerebrospinal fluid by the ventricular ependyma of the rabbit. *Am J Physiol* 1967; 213: 1031-1038.
- Pollay M, Stevens FA, Roberts PA. Alteration in choroid-plexus blood flow and cerebrospinal-fluid formation by increased ventricular pressure. In *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid Volume 2*. Edited by: Wood JH. New York: Raven Press 1983; 687-695.
- Provencio JJ, Fu X, Siu A, Rasmussen PA, Hazen SL, Ransohoff RM. CSF neutrophils are implicated in the development of vasospasm subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care* 2010; 12: 244-251.
- Reina MA, De León Casasola OA, López A, De Andrés JA, Mora M, Fernández A. The origin of the spinal subdural space. Ultrastructure finding. *Anesth Analg* 2002; 94: 991-995.
- Reina MA, López A, Valente G, De Andrés JA. Espaço epidural e ligamentos meníngeos vertebrais. *Rev Anest Reg Terap Dor (Lisboa)* 1998; 15: 7-12
- Reina MA, López A, De Andrés JA, Villanueva MC, Cortés L. ¿Existe el Espacio Subdural? *Rev Esp anestesiología Reanim* 1998; 45: 367-376.
- Reina MA, López A, De Andrés JA. Perforaciones naturales en la pia madre humana *Rev Esp Anestesiología Reanim* 1998; 45: 4-7.

- Reina MA, Pulido P, López A. El saco dural humano. *Rev Arg Anesthesiol* 2007; 65: 167-184.
- Reina MA, Villanueva MC, López A. Aracnoides trabecular, piamadre espinal humana y anestesia subaracnoidea. *Rev Arg Anesthesiol* 2008; 66: 111-133.
- Reis AJ. New surgical approach for late complications from spinal cord injury. *BMC Surg* 2006; 23; 6: 12.
- Rollins S, Perkins E, Mandybur G, Zhang JH. Oxyhemoglobin produces necrosis, not apoptosis, in astrocytes. *Brain Res* 2002; 945: 41-49.
- Rudick RA, Zirretta DK, Herndon RM. Clearance of albumin from mouse subarachnoid space: a measure of CSF bulk flow. *J Neurosci Methods* 1982; 6: 253-259
- Rydevik B, Holm S, Brown MD, Lundborg G. Diffusion from the cerebrospinal fluid as a nutritional pathway for spinal nerve roots. *Acta Physiol Scand* 1990; 138: 247-248.
- Sabri M, Ai J, Lakovic K, D'abbondanza J, Ilodigwe D, Macdonald RL. Mechanisms of microthrombi formation after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neuroscience* 2012. 8; 224: 26-37.
- Sajanti J, Heikkinen E, Majamaa K. Transient increase in procollagen propeptides in the CSF after subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 2000; 8; 55: 359-363.
- Sakatani K, Kashiwasake-Jibu M, Taka Y, Wang S, Zuo H, Yamamoto K,

Shimizu K. Noninvasive optical imaging of the subarachnoid space and cerebrospinal fluid pathways based on near-infrared fluorescence. *J Neurosurg.* 1997; 87: 738-745.

- Sanan A, van Loveren HR. The arachnoid and the myth of Arachne. *Neurosurgery* 1999; 45: 152-157.
- Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine* 2004; 29: 1971-1979
- Schaller B, Mindermann T, Gratzl O. Treatment of syringomyelia after posttraumatic paraparesis or tetraparesis. *J Spinal Disord* 1999; 12: 485-488.
- Schatlo B, Dreier JP, Gläsker S, Fathi AR, Moncrief T, Oldfield EH, Vortmeyer AO, Pluta RM. Report of selective cortical infarcts in the primate clot model of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 2010; 67: 721-728.
- Schwartz ED, Falcone SF, Quencer RM. Posttraumatic syringomyelia: pathogenesis, imaging, and treatment. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 173: 487-492.
- Seki T, Fehlings MG. Mechanistic insights into posttraumatic syringomyelia based on a novel in vivo animal model. Laboratory investigation. *J Neurosurg Spine* 2008; 8: 365-375.
- Sharma HS, Olson Y, Nyberg F, Dey PK. Prostaglandins modulate alterations of microvascular permeability, blood flow, edema and serotonin levels following spinal cord injury, an experimental study in the rat.

Neuroscience 1993; 57: 443-449.

- Simon CM, Sharif S, Tan RP, La Placa MC. Spinal cord contusion causes acute plasma membrane damage. *J Neurotrauma* 2009; 26: 563-574.
- Schneider UC, Schiffler J, Hakiy N, Horn P, Vajkoczy P. Functional analysis of Pro-inflammatory properties within the cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage in vivo and in vitro. *J Neuroinflammation* 2012; 8; 9: 28.
- Strazielle N, Gherzi-Egea JF. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 561-574
- Tator CH, Koyanagi I. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *J Neurosurg* 1997; 86: 483-92.
- Tjandra JJ, Varma TR, Weeks RD: Spinal arachnoiditis following subarachnoid haemorrhage. *Aust N Z J Surg* 1989; 59: 84-87.
- Vaněček V, Zablotskii V, Forostyak S, Růžička J, Herynek V, Babič M, Jendelová P, Kubinová S, Dejneka A, Syková E. Highly efficient magnetic targeting of mesenchymal stem cells in spinal cord injury. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 3719-3730.
- Yoshizawa H. Presidential address: pathomechanism of myelopathy and radiculopathy from the viewpoint of blood flow and cerebrospinal fluid flow including a short historical review. *Spine (Phila Pa 1976)* 2002; 15; 27: 1255-63.
- Yiallourou TI, Kröger JR, Stergiopoulos N, Maintz D, Martin BA, Bunck AC.

Comparison of 4D phase-contrast MRI flow measurements to computational fluid dynamics simulations of cerebrospinal fluid motion in the cervical spine. PLoS One 2012; 7: 52284.

- Zappaterra MW, and Lehtinen MK. The cerebrospinal fluid : regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. Cell Mol Life Sci 2012; 69: 2863-2878.