



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**RELACIÓN DE ANORMALIDADES EN SUSTANCIA BLANCA Y
ACUMULACIONES DE ALFA-SINUCLEÍNA EN BIOPSIAS DE PIEL DE
PACIENTES CON PARKINSON**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

GABRIELA CASTILLO LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. LUIS CONCHA LOYOLA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA ROSA ÁVILA COSTA
FES IZTACALA

DR. ILDEFONSO RODRÍGUEZ LEYVA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

QUERÉTARO, MAYO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por seguir siendo mi segundo hogar y por ser el espacio que más me ha enriquecido en todos los aspectos. Es un placer y un gran orgullo formar parte de esta magnífica institución que siempre me ha brindado conocimientos, experiencias inolvidables y grandes maestros y amigos. Gracias al Instituto de Neurobiología (INB) y al programa de maestría (Neurobiología) de la UNAM por cultivarme y por ser más que una comunidad científica, una gran familia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) porque sin su apoyo, muchos renunciaríamos a la ciencia.

Al Laboratorio de Conectividad Cerebral del INB, dirigido por el Dr. Luis Concha, por incluirme y por cada momento vivido. Mi aprendizaje fue más allá de lo académico; aprendí de mis debilidades y me fortalecí como persona. Gracias Doctor por su apoyo y cordialidad. Gracias a todos mis compañeros, los que ya no están en el laboratorio y los que siguen ahí: Bety, Josefina, Vicente, Lau, Arafat, Raúl, Poncho, Omar, Luis, Hiram, Gil, Ana y, en especial, a Lupita, Itza y Penélope por su amistad. Tengo recuerdos muy especiales con cada uno de ustedes.

A los miembros de mi comité tutor: Dra. María Rosa Ávila Costa y Dr. Ildelfonso Rodríguez Leyva. Gracias por su confianza, retroalimentación y disposición.

Al Hospital Central de San Luis Potosí y sus pacientes por participar en el proyecto. Esto no habría sido posible sin ustedes.

A la Unidad de Resonancia Magnética del INB por su invaluable colaboración.

A los miembros del jurado del examen de grado: Dr. Juan Fernández, Dr. Luis Concha, Dr. Eduardo Garza, Dra. María Rosa Ávila y Dr. Sarael Alcauter. Gracias por sus aportaciones y comentarios.

A la Unidad de Enseñanza del INB: Carmen, Lupita, Leo y Nuri, por su paciencia y guía en todos los trámites.

Al Laboratorio vecino (C-12) porque casi somos uno mismo, en especial a Polo, Vic, Ana, Sebas, Gina y mi roomie por todo lo compartido.

A la Dra. Marta Bianciardi y la Dra. Catherine Lebel por abrirme las puertas de sus

laboratorios. Gracias por hacerme sentir como en casa y por brindarme tanto de ustedes y sus familias. Gracias a mis amigos extranjeros por las inolvidables experiencias, en particular a Clemens, Merlín y Sohyun por ser Boston paraíso.

A mis padres y hermanos por estar a mi lado en cada paso que doy, sin importar lo descabellado que sea. Sé que siempre podré contar con su apoyo y que nunca estaré sola esté donde esté. Son lo más hermoso que tengo en mi vida y a cada uno lo admiro de una forma muy particular. Ma, admiro tu fortaleza y la hermosa persona que eres; Pa, admiro tu forma de ver la vida y que creas en mí; hermano, eres un increíble ser humano, lleno de cualidades, gracias a ti y a Dani por Franco; y hermana, admiro lo inteligente y perseverante que eres, nunca dejes de perseguir tus sueños. Gracias también al resto de mi familia por su cariño y apoyo incondicional.

A Ariel Bastida y su familia por adoptarme, por quererme como parte de su hermosa familia y por cada uno de los hermosos recuerdos que tengo con ustedes. Gracias Poli y Lety por todas las atenciones que tienen conmigo. Gracias mi cuyito y mi currucucú por ser las mejores cus del mundo. Gracias a Reno por traer tanta felicidad. Y gracias amor por creer en mí, incluso más que yo misma, y por estar siempre en las buenas y en las malas. Mi vida está llena de alegrías e ilusiones a tú lado.

A Marysol, Sofi, Dani y Bety por ser mis mejores amigas, por nunca alejarse y por siempre estar al pendiente de mí. Las admiro y las quiero muchísimo.

A Pam y Mario por cada uno alentarme a su manera. Gracias por tus aportaciones y por enseñarme tú pasión por la ciencia, Pam. Gracias Mario porque coincidimos en esta vida y sin darte cuenta me has ayudado a creer en mí misma.

A Lupita por se el ángel más grande en mi vida. Gracias por cada palabra, risa y lágrima. Gracias por enseñarme una amistad tan genuina y hermosa. Eres la persona que más lecciones de vida me ha dado. Agradezco a la vida por ponerte en mi camino y deseo que esta amistad crezca cada día más. ¡Te quiero mucho mi Lupis hermosa!

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
LISTA DE ABREVIATURAS	6
I. INTRODUCCIÓN	8
II. ANTECEDENTES	10
1. Enfermedad de Parkinson y núcleos basales.....	10
2. Enfermedad de Parkinson y alfa-sinucleína.....	13
3. Fenómeno de resonancia magnética.....	14
4. Fenómeno de difusión y tractografía.....	16
5. Enfermedad de Parkinson y anomalías en sustancia blanca.....	19
III. JUSTIFICACIÓN	22
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
1. Objetivo general.....	23
2. Objetivos particulares.....	23
3. Hipótesis.....	23
V. MÉTODO	24
1. Participantes.....	24
2. Cuantificación de alfa-sinucleína.....	24
3. Adquisición de imágenes.....	25
4. Procesamiento y análisis de imágenes.....	25
5. Análisis estadísticos.....	30
VI. RESULTADOS	31
VII. DISCUSIÓN	37
VIII. LIMITACIONES Y FUTURAS INVESTIGACIONES	45
IX. CONCLUSIONES GENERALES	47
X. REFERENCIAS	48

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por movimientos reducidos, temblor en estado de reposo, rigidez muscular e inestabilidad postural. Mediante biomarcadores de imágenes cerebrales y tejidos periféricos es posible favorecer su diagnóstico temprano y adecuado seguimiento. Desde una perspectiva clásica, sus síntomas motores se originan a partir de un déficit de dopamina en la vía nigroestriatal, relacionado con un proceso degenerativo (muerte y atrofia neuronal) de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, que se asocia con la presencia de cuerpos de Lewy en dicha estructura, en etapas tardías del padecimiento. Los cuerpos de Lewy son acúmulos que contienen varias proteínas, especialmente acumulaciones anormales de alfa-sinucleína; éstas también se han identificado en la EP en tejidos periféricos como la piel. Asimismo, hay estudios de neuroimagen que muestran anomalías en parámetros de difusión en estructuras de sustancia gris (SG) y sustancia blanca (SB) en la EP. Aunque las imágenes de difusión no son de utilidad para identificar características moleculares (p.e., la concentración de dopamina), sí permiten resolver las características microestructurales de los tractos de SB, revelando degeneración axonal secundaria a la pérdida neuronal. Pocos estudios han intentado reconstruir las fibras nigroestriatales, sin embargo, el estudio de este fascículo es importante para entender la patogénesis del padecimiento. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar estructuras de SG y SB, incluyendo las fibras nigroestriatales, para buscar biomarcadores de imágenes cerebrales en la EP y su relación con acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en la piel. Se reclutaron 22 pacientes, 14 con EP y 8 controles. Se obtuvo una biopsia de piel de todos los participantes para cuantificar el porcentaje celular de acumulaciones anormales de alfa-sinucleína. Las imágenes se adquirieron en un resonador de 3 Teslas. Se analizaron las imágenes T1 (TR/TE=8.16/3.73 ms, tamaño de voxel=1 mm³) y las imágenes T2-FLAIR (TR/TE/TI=4800/273.52/1650 ms, tamaño de voxel=1 mm³) para segmentar las estructuras cerebrales. Las imágenes de difusión consistieron en 96 volúmenes b=2000, 32 b=1000 y 4 b=0 s/mm² (TR/TE=11816/70 ms, tamaño de voxel=2x2x2 mm³). Las imágenes de difusión se analizaron mediante el tensor de difusión (DT) para obtener la fracción de anisotropía (FA) y la difusión media (ADC); y a través del modelo de deconvolución esférica restringida (CSD) para derivar la tractografía probabilística. Se obtuvo la media de FA y ADC de todas las estructuras cerebrales segmentadas y los tractos reconstruidos. Los datos muestran que es posible reconstruir la conectividad anatómica de la vía nigroestriatal mediante el modelo CSD. También confirman que el porcentaje de alfa-sinucleína en piel es mayor en la EP y que existen diferencias entre grupos en parámetros de difusión de estructuras de SG y SB. Se encontró una relación de las anomalías en parámetros de difusión de estructuras de SG y SB con el progreso de la EP y el porcentaje de acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel, respectivamente. Tales hallazgos revelan que el porcentaje de alfa-sinucleína en piel y las anomalías en parámetros de difusión son biomarcadores que pueden contribuir a un diagnóstico más temprano y un seguimiento adecuado de la EP.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by reduced movement, tremor, rigidity and postural instability. Its earlier diagnosis and proper follow-up are likely to benefit from imaging and peripheral biomarkers. From a classical perspective, its motor symptoms result from a dopamine deficiency in the nigrostriatal pathway, related to a degenerative process (neuronal death and atrophy) of the dopaminergic neurons of the substantia nigra, which is associated to the presence of Lewy bodies in this structure, in late stages of the disease. Lewy bodies are accumulations of several proteins, especially abnormal aggregates of alpha-synuclein; they have also been identified in PD in peripheral tissues such as the skin. Neuroimaging studies have also shown gray (GM) and white matter (WM) diffusion abnormalities in PD. While diffusion imaging is unable to query molecular characteristics (e.g., dopamine concentration), it can resolve the microstructural features of WM bundles, revealing axonal degeneration secondary to neuronal loss. Few studies have attempted to reconstruct the nigrostriatal fibers, yet the study of this fascicle may provide insight into the pathogenesis of the disease. This work aimed to characterize GM and WM structures, including nigrostriatal fibers, to search for brain imaging biomarkers in PD and their relationship with abnormal accumulations of alpha-synuclein in the skin. 22 patients were recruited, 14 had PD while 8 served as controls. A skin biopsy was obtained from all participants to quantify the percentage of cellular abnormal accumulations of alpha-synuclein. Imaging was performed on a 3T scanner. T1 images (TR/TE=8.16/3.73 ms, voxel size=1 mm³) were analyzed to segment brain structures along with T2-FLAIR images (TR/TE/TI=4800/273.52/1650 ms, voxel size=1 mm³). Diffusion images consisted of 96 volumes b=2000, 32 b=1000 and 4 b=0 s/mm² (TR/TE=11816/70 ms, voxel size=2x2x2 mm³). Diffusion images were analyzed through diffusion tensor (DT) imaging, which provided diffusion metrics: fractional anisotropy (FA) and mean diffusivity (ADC); and through constrained spherical deconvolution (CSD), from which probabilistic tractography of nigrostriatal fibers was derived. All segmented brain structures and reconstructed tracts were queried for FA and ADC. Data shows that it is possible to reconstruct the anatomical connectivity of the nigrostriatal pathway through CSD. It also confirms that the percentage of alpha-synuclein in the skin is greater in PD and that there were differences between groups in diffusion parameters of GM and WM structures. A relationship between diffusion abnormalities of GM and WM structures and PD progress and the percentage of abnormal accumulations of alpha-synuclein in the skin was found, respectively. These findings reveal that the percentage of alpha-synuclein in the skin and diffusion abnormalities are biomarkers that may contribute to an earlier diagnosis and a proper follow-up of the disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

- A** Amígdala
- Acc** Núcleo accumbens
- ADC** *Apparent diffusion coefficient* (Coeficiente de difusión aparente o difusión media)
- C** Núcleo caudado
- CE** Cuerpo estriado
- CSD** *Constrained spherical deconvolution* (Deconvolución esférica restringida)
- DT** *Diffusion tensor* (Tensor de difusión)
- DWIs** *Diffusion-weighted images* (Imágenes sensibles a difusión)
- EP** Enfermedad de Parkinson
- FA** *Fractional anisotropy* (Fracción de anisotropía)
- FOD** *Fiber orientation distribution* (Distribución de la orientación de fibras)
- GP** Globo pálido
- H** Hipocampo
- HARDI** *High angular resolution diffusion imaging* (Imágenes de difusión con alta resolución angular)
- MDS** *Movement Disorder Society* (Sociedad de los Desórdenes del Movimiento)
- MNI** *Montreal Neurologic Institute* (Instituto Neurológico de Montreal)
- NODDI** *Neurite orientation dispersion and density imaging* (Imágenes de la dispersión y densidad de la orientación neurítica)
- NST** Núcleo subtalámico
- P** Putamen
- PCA** *Principal component analysis* (Análisis de componentes principales)
- ROIs** *Regions of interest* (Regiones de interés)
- SB** Sustancia blanca
- SG** Sustancia gris
- SN** Sustancia nigra

- T** Tálamo
- TCE** Tracto córticoespinal
- TF** Tracto frontal
- TNE** Tracto nigrostriatal
- UPDRS** *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (Escala Unificada de Clasificación de la Enfermedad de Parkinson)

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por los siguientes síntomas motores: bradicinesia (lentitud en el movimiento), temblor en estado de reposo (3 a 7 Hz), rigidez muscular e inestabilidad postural (Hughes, Ben-Shlomo, Daniel, & Lees, 1992; Langston, 2006). Por ser una de las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes, su estudio se ha extendido para desarrollar estrategias diagnósticas y terapéuticas más eficientes, con el fin de prevenir su progreso degenerativo.

Desde una perspectiva clásica, los síntomas motores de la EP se originan por un déficit de dopamina en la vía nigroestriatal relacionado con un proceso neuronal degenerativo (atrofia y muerte neuronal) de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (SN) (Braak et al., 2003; Langston, 2006), lo cual se asocia con la presencia de cuerpos de Lewy (acúmulos que contienen varias proteínas, especialmente alfa-sinucleína) circunscritos a las neuronas dopaminérgicas en etapas tardías de la enfermedad (Stefanis, 2012)

En este sentido, dos biomarcadores que pueden ser útiles para informar sobre el proceso degenerativo de la EP son: las acumulaciones anormales de alfa-sinucleína, que pueden ser identificadas en la piel (Miki et al., 2010; Rodríguez-Leyva et al., 2014) y en otros tejidos fuera del sistema nervioso central (Djaldetti, Lev, & Melamed, 2009); y las anomalías en sustancia blanca (SB) (Hall et al., 2016; Sterling et al., 2017), específicamente aquéllas en las fibras nigroestriatales (Andica et al., 2018; Theisen et al., 2017; Tan et al., 2015; Zhang et al., 2015). Éstas pueden identificarse indirectamente mediante imágenes de resonancia magnética sensibles a difusión (DWIs, *Diffusion Weighted Images*). Ambos biomarcadores presentan las siguientes ventajas: se pueden identificar en etapas tempranas de la enfermedad, son mínimamente invasivos y más accesibles que otros procedimientos y, sobretodo, se pueden observar *in vivo*.

El presente proyecto tuvo como objetivo principal relacionar ambos biomarcadores, con el fin de aportar conocimiento sobre parámetros útiles para evaluar el proceso

degenerativo de la EP y contribuir con su caracterización en beneficio de diagnósticos más tempranos y seguimientos adecuados.

Para lograr lo anterior, se reconstruyó la trayectoria de las fibras nigroestriatales de SB mediante tractografía probabilística derivada de DWIs. Se diseñó un estudio retrospectivo relacional y comparativo de casos (grupo con diagnóstico de EP) y controles (grupo control). Se analizó la relación entre los biomarcadores y el efecto comparativo de cada uno de ellos. La cuantificación de acumulaciones anormales de la proteína alfa-sinucleína se realizó mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia y las anormalidades en SB se identificaron de manera indirecta mediante parámetros derivados de DWIs.

Primero se expondrán los antecedentes más relevantes del proyecto. Se describirán los núcleos basales y cómo la alteración en su circuito explica los síntomas motores característicos de la EP. Se hará referencia a la acumulación anormal de la proteína alfa-sinucleína en la enfermedad, tanto en el cerebro como en la piel. Se explicará el fenómeno de resonancia magnética y de difusión para entender la técnica de tractografía y los parámetros derivados de las DWIs. Finalmente, se detallarán los estudios relevantes sobre anormalidades en parámetros de difusión en la EP.

Posteriormente se justificará el estudio y se plantearán sus objetivos e hipótesis. Se describirá minuciosamente el método y las técnicas empleadas, haciendo énfasis en el procesamiento y análisis de las imágenes por resonancia magnética.

Siguiendo los objetivos propuestos, se expondrán los resultados de los análisis descriptivos, comparativos y relacionales, los cuales se discutirán en el mismo orden. Se relatarán las limitaciones y futuras investigaciones y, por último, se realizarán las conclusiones generales del proyecto.

II. ANTECEDENTES

1. Enfermedad de Parkinson y núcleos basales

La EP es una de las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes y estudiadas (posiblemente sólo superada por la enfermedad de Alzheimer). Se relaciona con la edad y se caracteriza por cuatro síntomas motores principales: bradicinesia (menor amplitud y velocidad del movimiento), temblor en estado de reposo (3 a 7 Hz), rigidez muscular e inestabilidad postural (Hughes et al., 1992; Langston, 2006). Sin embargo, también se puede presentar escasez de movimientos espontáneos, acinesia, postura flexionada, equilibrio inestable y marcha con arrastre de pies (DeLong, 2000), así como algunos síntomas no motores: alteraciones cognitivas, perturbaciones del ciclo vigilia-sueño, trastornos del estado de ánimo, disfunciones autonómicas y alucinaciones visuales (Chaudhuri, Healy, & Schapira, 2006).

En la enfermedad se encuentra afectado el sistema motor extrapiramidal (fuera de la vía córticoespinal) compuesto por los núcleos basales, estructuras subcorticales conformadas por conglomerados neuronales implicados en el control del movimiento voluntario y automático. Los núcleos no se conectan directamente con la médula espinal; forman circuitos subcorticales que reciben señales de la corteza cerebral y las envían hacia los núcleos del tronco encefálico y, a través del tálamo, de nuevo a la corteza, específicamente a las cortezas prefrontal, premotora y motora primaria (DeLong, 2000). Funcional y anatómicamente, estos circuitos se han subdividido en: motor, asociativo y límbico, de acuerdo con el tipo de información que procesan (Alexander & Crutcher, 1990).

Los núcleos basales constan de cuatro estructuras principales (ver figura 1): el cuerpo estriado (CE), el globo pálido (GP), la SN y el núcleo subtalámico (NST). El CE se subdivide en el núcleo caudado (C), el putamen (P) y el estriado ventral, que incluye al núcleo accumbens (Acc); el GP se subdivide en externo e interno; y la SN se subdivide en compacta y reticular. El CE es la vía de entrada de las señales; mientras que el GP interno y la SN reticular son las vías de salida. Los dos últimos

están conformados por células gabaérgicas inhibitorias; mientras que el NST está conformado por células glutamatérgicas excitatorias. Las células de la SN compacta contienen dopamina y neuromelanina, sustancia que le confiere el color oscuro que la caracteriza (DeLong, 2000).

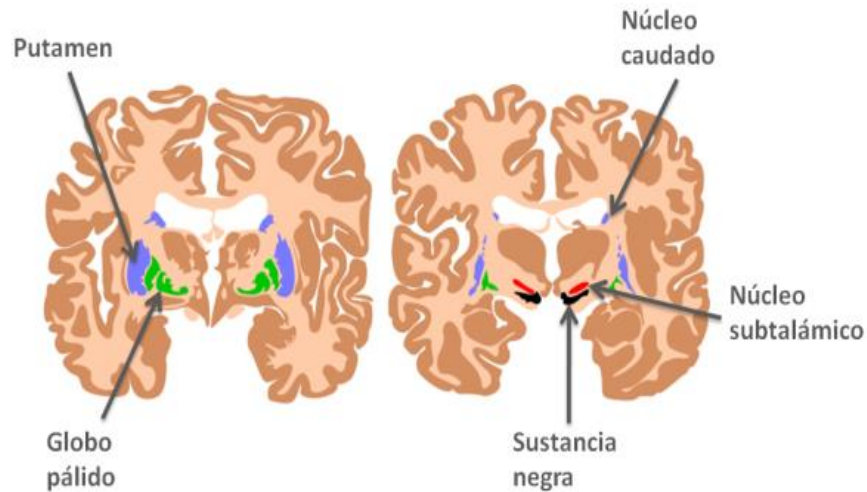


Figura 1. Dibujo esquemático de las estructuras principales de los núcleos basales (Tomado de Hospital Sant Joan de Déu, 2014).

Existen dos vías paralelas principales (ver figura 2) que regulan los circuitos neuronales de los núcleos basales: la vía directa y la vía indirecta. Ambas se dirigen del CE hasta los núcleos de salida, pero tienen efectos opuestos. La vía directa es modulada por el sistema de receptores de dopamina D1, que promueven la transmisión sináptica, para facilitar la actividad tálamo-cortical y, por lo tanto, el movimiento. Por su parte, la vía indirecta es modulada por el sistema de receptores de dopamina D2, que reducen la transmisión sináptica, para inhibir la actividad tálamo-cortical y restringir el movimiento (Alexander & Crutcher, 1990; DeLong, 2000). Sin embargo, también se ha descrito una tercera vía hiperdirecta (ver figura 2) que conecta regiones corticales y subtalámicas, sin pasar por el CE, que participa en sinergia con las vías anteriores para el adecuado control del movimiento voluntario (Nambu, Tokuno, & Takada, 2002). Esta tercera vía, por ser la más directa hacia el NST, inicialmente inhibe amplias proyecciones tálamo-corticales, suprimiendo diversos programas motores. Posteriormente, la vía directa desinhibe las proyecciones tálamo-corticales relacionadas con el programa motor

seleccionado; mientras que la vía indirecta inhibe las proyecciones tálamo-corticales de programas motores no requeridos (Nambu, 2004).

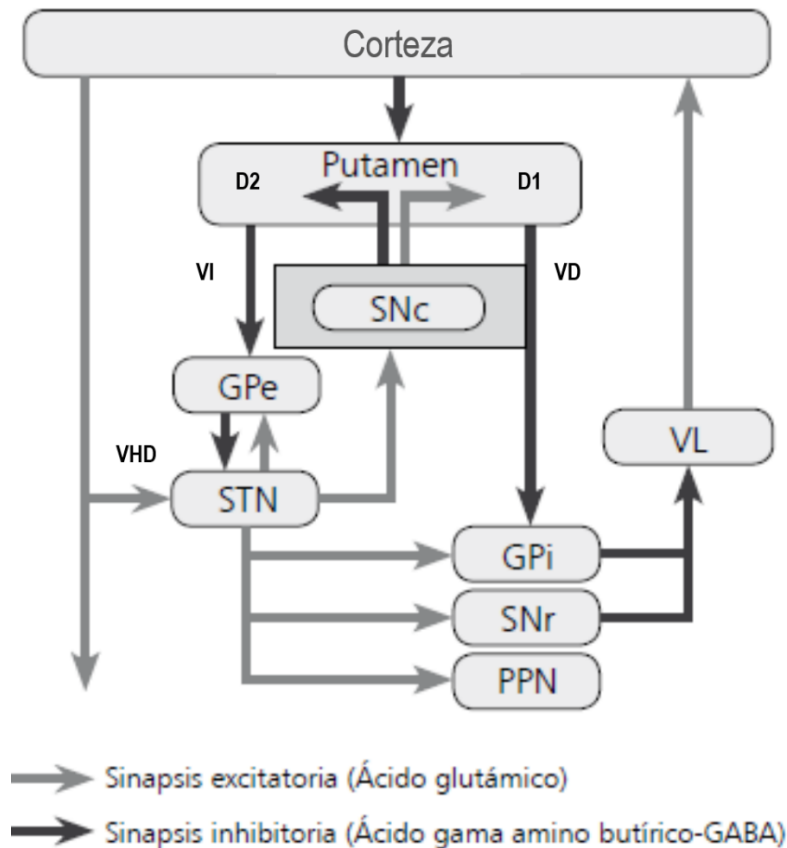


Figura 2. Diagrama esquemático de las vías que regulan los circuitos neuronales de los núcleos basales en condiciones normales. D1: receptores de dopamina D1, D2: receptores de dopamina D2, VD: vía directa de los núcleos basales, VI: vía indirecta de los núcleos basales, VHD: vía hiperdirecta de los núcleos basales, SNc: sustancia nigra compacta, SNr: sustancia nigra reticular, GPe: globo pálido externo, GPi: globo pálido interno, STN: núcleo subtalámico, VL: núcleo ventral lateral del tálamo, PPN: núcleo pedúnculo pontino (Modificado de Méndez-Herrera, 2011).

Desde una perspectiva clásica, los síntomas motores de la EP se originan por un déficit de dopamina en la vía nigroestriatal (Braak et al., 2003; Langston, 2006), lo cual ocasiona un desequilibrio entre las vías directa e indirecta de los núcleos basales; la primera está inhibida, mientras que la segunda está facilitada. Sin la acción de la dopamina en el estriado, aumentan las eferencias indirectas inhibitorias, lo que provoca una sobre inhibición de centros motores tálamo-corticales y del tallo cerebral y, por lo tanto, las dificultades para iniciar y controlar el movimiento voluntario (Albin, Young, & Penney, 1989; DeLong, 2000).

2. Enfermedad de Parkinson y alfa-sinucleína

En las enfermedades neurodegenerativas hay una acumulación anormal de agregados de proteínas que provocan cambios intracelulares que pueden ocasionar disfunción y muerte celular (Wakabayashi, Tanju, & Mori, 2009). La acumulación anormal de la proteína alfa-sinucleína es la característica molecular que marca la EP y condiciones neurodegenerativas similares: atrofia de múltiples sistemas, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Alzheimer, neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro tipo I, falla autonómica pura y un subtipo de temblor esencial. Por su característica común, estas patologías se han denominado en conjunto sinucleinopatías, sin embargo, en cada condición, la distribución celular y regional de la proteína es distinta. En la EP, la mayor acumulación anormal de alfa-sinucleína se da en el encéfalo. Se extiende a varias regiones cerebrales y no está confinada únicamente al cuerpo celular neuronal; también es prominente en procesos neuríticos. Los depósitos ocurren desde etapas muy tempranas de la enfermedad y se expresan como cuerpos y neuritas de Lewy en etapas más tardías de la misma (Stefanis, 2012).

Aunque su mayor acumulación anormal sucede en el tejido cerebral, actualmente se ha confirmado su presencia en otros tejidos fuera del sistema nervioso central (Djaldeh et al., 2009), incluyendo las terminaciones nerviosas de la piel (Miki et al., 2010) y las células de la epidermis, dermis y anexos cutáneos (Rodríguez-Leyva et al., 2014). Rodríguez-Leyva et al. (2014) reportan que cerca del 60% de las células de la piel de pacientes con Parkinson presentan acumulaciones anormales de alfa-sinucleína. Por lo tanto, la proteína puede funcionar como un biomarcador útil en el diagnóstico y progreso de la EP. Su relación con el padecimiento es bastante sólida (Recchia et al., 2008; Spinelli et al., 2014; Zhang et al., 2017b) y también existe evidencia de la asociación de la enfermedad con el gen SNCA que codifica para alfa-sinucleína (Stefanis, 2012).

El gen SNCA codifica 140 aminoácidos para conformar la proteína alfa-sinucleína. En solución acuosa no presenta una estructura definida, pero tiene la capacidad de formar estructuras al unirse a otras moléculas cargadas negativamente. Está

compuesta por 3 regiones: un terminal amino, que le confiere la capacidad de formar una estructura helicoidal al unirse a los fosfolípidos de las membranas; una región central hidrofóbica llamada NAC, que le confiere la capacidad de formar una estructura de hojas beta; y un terminal carboxilo, negativamente cargada, que no le confiere la capacidad de formar ninguna estructura. Pertenece a la familia de proteínas sinucleínas, que incluyen la beta-sinucleína y la gama-sinucleína. Éstas difieren estructuralmente de la alfa-sinucleína en la región NAC, pero todas son proteínas que predominan en las terminales neuronales presinápticas. La alfa-sinucleína se expresa de manera abundante en el sistema nervioso, próxima a las vesículas de las terminales presinápticas, por lo que se ha sugerido que modula la liberación de neurotransmisores en la transmisión sináptica. Su expresión se induce durante el desarrollo de las estructuras sinápticas y la modulación de su expresión puede generar plasticidad o degeneración. En los cuerpos y las neuritas de Lewy presenta una conformación de hojas beta. Al principio de la formación de estas hojas, la proteína tiene una forma oligomérica soluble, pero a través del proceso se desarrollan estructuras intermedias, llamadas protofibrillas, que gradualmente se vuelven insolubles y se juntan en fibras. A este proceso se le conoce como agregación, la principal característica patogénica de la proteína (Stefanis, 2012).

3. Fenómeno de resonancia magnética

La resonancia magnética brinda imágenes detalladas que pueden reflejar cualquier tejido biológico, incluyendo el tejido cerebral. Por ello, es una herramienta útil en el diagnóstico y progreso de enfermedades neurológicas como la EP. Resulta de un fenómeno físico de transmisión de energía.

Toda la materia está compuesta por átomos, los cuales están conformados por partículas neutras (neutrones) y positivas (protones) dentro de un núcleo, y partículas negativas (electrones) alrededor del mismo. En el ser humano y, por lo tanto, en el tejido cerebral, el átomo más abundante es el hidrógeno. Cuando el número de protones y neutrones de un átomo es impar, como en el caso del hidrógeno, el núcleo se comporta como un pequeño imán, ya que se produce un campo magnético derivado de la corriente eléctrica generada por la propiedad que

adquiere la partícula de rotar sobre su propio eje, movimiento conocido como *spin*. Esta capacidad de los *spins* de comportarse como pequeños imanes permite que se alineen en sentido paralelo o antiparalelo a un campo magnético potente, existiendo una preferencia por el sentido paralelo por ser el que requiere menor energía. La diferencia de los *spins* alineados entre estos dos sentidos producirá una magnetización longitudinal en la dirección del campo magnético principal, lo que permitirá la obtención de la señal del resonador. Además, los *spins* también producen un movimiento de precesión alrededor del campo magnético al que están sometidos. La velocidad y frecuencia de este movimiento dependerá de la intensidad del campo magnético. La frecuencia de precesión también se denomina frecuencia de resonancia o frecuencia de Larmour, ya que se calcula mediante la ecuación de Larmour (Rivera, Puentes, & Caballero, 2011).

Mediante la aplicación de distintos pulsos de radiofrecuencia, dentro de la frecuencia de Larmour, se puede perturbar un sistema de *spins* y su magnetización longitudinal, logrando que ésta se disminuya mientras que aumenta la magnetización transversal. Al interrumpir el pulso de radiofrecuencia, se liberará energía, la cual será captada mediante antenas del resonador y aportará información sobre el contraste magnético del tejido. La relajación longitudinal y transversal ocurren sincrónicamente. A la primera se le denomina T1 y sucede cuando se ha recuperado el 63% de la magnetización longitudinal original; mientras que a la segunda se le denomina T2 y sucede cuando la magnetización transversal inicial ha decrecido a un 37%. Estos tiempos de relajación dependen de cada tejido y muestran información sobre su propia composición. Por ello, variando las secuencias de pulsos de radiofrecuencia es posible obtener señal modulada por los distintos tiempos de relajación y el contraste de los tejidos de interés. Finalmente, las señales obtenidas de cada voxel (región volumétrica de la imagen que corresponde a la localización específica del tejido) se reconstruirán y digitalizarán en una imagen interpretable en escala de grises, donde cada tono reflejará una intensidad distinta de la señal y representará estructuras específicas del tejido (Rivera et al., 2011).

4. Fenómeno de difusión y tractografía

Las moléculas de agua (con átomos de hidrógeno que capta el resonador) están en continuo movimiento aleatorio o Browniano en un medio libre. Por lo tanto, si varias moléculas se concentran en un punto, al cabo de un tiempo, se desplazarán alrededor de ese punto inicial asumiendo una distribución Gaussiana separada de dicho punto con una variación de la concentración inicial. Tal desplazamiento permite la obtención de un coeficiente de difusión que indica la distancia que recorren las moléculas de agua en el tiempo (Gili, 1993). Entonces, en un medio libre, las moléculas tienen un movimiento equidistante hacia cualquier dirección, lo que se conoce como difusión isotrópica y se puede representar volumétricamente como una esfera. No obstante, en tejidos biológicos, la difusión es más compleja porque se encuentra restringida por barreras del propio tejido, lo que les confiere una dirección preferencial a las moléculas. Este tipo de difusión se conoce como difusión anisotrópica y se puede representar volumétricamente como un elipsoide que revela información espacial sobre la estructura del tejido (Urriola & Wenger, 2013). Tal es el caso de tejidos altamente organizados y coherentes en su microestructura, como los axones del tejido cerebral, donde las membranas celulares forman las principales barreras que dirigen a las moléculas de agua en una difusión anisotrópica (Concha, 2014). Debido a este anisotropismo, en el tejido biológico no es posible calcular un coeficiente de difusión real, pero si se puede obtener un coeficiente de difusión aparente (*ADC, Apparent Diffusion Coefficient*) (Gili, 1993).

La señal de resonancia magnética es sensible al fenómeno de difusión, ya que los desplazamientos de las moléculas de agua afectan la relajación T2. En 1965, Stejskal y Tanner propusieron una secuencia para obtener DWIs, cuyo fundamento es que la aplicación de un gradiente magnético bipolar provoque un mayor desfase de los *spins* en movimiento, lo que atenúa la señal del resonador y refleja el proceso de difusión de manera aislada. Los distintos parámetros del gradiente permiten calcular el factor de difusión b , con unidades de tiempo sobre distancia, el cual representa la difusión de los *spins* en la dirección del gradiente. Mediante la

modificación de este factor es posible controlar la señal que brinda el resonador (Gili, 1993).

En este sentido, las DWIs son una herramienta muy poderosa para evaluar indirectamente la microarquitectura del tejido cerebral *in vivo* y de manera no invasiva. La tractografía, por ejemplo, se beneficia de estas imágenes para reconstruir la trayectoria tridimensional de los tractos cerebrales de SB (Concha, 2014). Es una técnica que permite obtener mapas sobre la conectividad anatómica cerebral mediante algoritmos matemáticos que modelan la orientación de las fibras cerebrales (Hagmann et al., 2006). El modelo más ampliamente utilizado es el modelo del tensor de difusión (DT, *Diffusion Tensor*) sin embargo, la tecnología actual ha permitido el desarrollo de otros modelos que intentan resolver las limitantes de éste. Uno de ellos es el modelo de deconvolución esférica restringida (CSD, *Constrained Spherical Deconvolution*) que utiliza DWIs de alta resolución angular (HARDI, *High Angular Resolution Diffusion Imaging*). A continuación, se describirán dichos modelos con mayor detalle.

El modelo DT describe la difusión aparente en función de sus ejes de dirección (x, y, z). Consiste en un conjunto de 9 valores que corresponden a las direcciones de medida de la difusión relacionadas con los ejes ortogonales de los gradientes del resonador. Estos valores suelen representarse de forma matricial:

$$\begin{bmatrix} \text{ADC}_{xx} & \text{ADC}_{xy} & \text{ADC}_{xz} \\ \text{ADC}_{yx} & \text{ADC}_{yy} & \text{ADC}_{yz} \\ \text{ADC}_{zx} & \text{ADC}_{zy} & \text{ADC}_{zz} \end{bmatrix}$$

Los elementos de la diagonal de la matriz (ADC_{xx} , ADC_{yy} , ADC_{zz}) describen la difusión independiente en las direcciones x, y, z de los gradientes correspondientes. Los elementos fuera de la diagonal describen la interrelación entre dos ejes y, como los elementos perpendiculares a la diagonal son equivalentes, para calcular el tensor sólo se requieren 6 mediciones independientes. El promedio de los valores de cada uno de los elementos de la diagonal representa la difusión media (ADC); mientras que la desviación del valor de la difusión dependiente de la dirección

permite calcular el anisotropismo o fracción de anisotropía (FA, *Fractional Anisotropy*) (Gili, 1993).

A partir de los 6 componentes principales del tensor, se pueden calcular coeficientes de difusión en 3 direcciones principales (*eigenvectors*), cada una con un valor asociado, es decir 3 valores principales (*eigenvalues*). Estos se representan gráficamente mediante un elipsoide. El vector asociado con el valor más grande define el eje más largo del elipsoide, lo que se interpreta como mayor difusión en esa dirección (mayor anisotropismo) y, en tejidos cerebrales, refleja una orientación paralela a las fibras de SB. El resto de los vectores y sus valores asociados definen los ejes perpendiculares al eje principal del elipsoide y, por lo tanto, perpendicular a las fibras de SB, donde la difusión es menos anisotrópica. En este sentido, el modelo DT es de gran utilidad para representar la orientación de las fibras cerebrales de SB (Basser, Mattiello, & Le Bihan, 1994). Sin embargo, en regiones donde existen más de una población de fibras orientadas coherentemente, el modelo no es capaz de distinguir aquéllas que se cruzan, ya que sólo puede calcular una única orientación principal y, por lo tanto, en estos casos asume que la difusión es isotrópica. Así, el modelo DT resulta ineficiente para la reconstrucción tractográfica de la SB en regiones de entrecruzamiento.

El modelo CSD-HARDI intenta resolver la inexactitud del modelo DT para representar adecuadamente las fibras cerebrales en regiones de entrecruzamiento y lograr reconstrucciones tractográficas más confiables. Este modelo logra una mayor resolución angular de las fibras cerebrales y las representa mediante una función de la distribución de orientación de las fibras (FOD, *Fiber Orientation Distribution*), en lugar del elipsoide del modelo DT. La FOD modela la señal atenuada de la difusión (axial o paralela a las fibras) mediante lóbulos que se forman a partir de la deconvolución de una señal inicial que gráficamente corresponde a una esfera que representa la difusión en varias direcciones. La señal inicial se denomina función de respuesta e integra la señal no atenuada de la difusión (radial o perpendicular a las fibras) de una población de fibras de acuerdo con su fracción volumétrica y orientación. A partir de esta función de respuesta, el modelo estima la

FOD, subyacente a la señal atenuada, que representa la fracción volumétrica de las fibras que se alinean en la orientación de mayor anisotropía. El radio de los lóbulos indica la probabilidad de difusión en esa orientación. El modelo CSD-HARDI ofrece estimaciones confiables de la FOD porque restringe su estimación con valores positivos y resuelve la orientación de fibras en ángulos más agudos (Tournier et al., 2004, 2008; Tournier, Calamante, & Connelly, 2007).

En este sentido, a partir de dichos modelos matemáticos es posible reconstruir las trayectorias de las fibras de SB y derivar mapas cuantitativos que brindan parámetros (Basser et al., 1994; Raffelt et al., 2012) para informar sobre el estado del tejido cerebral que se está estudiando.

5. Enfermedad de Parkinson y anomalías en sustancia blanca

Los biomarcadores son características cuantitativas que se usan como indicadores de estados biológicos o patológicos. En neuroimagen, los biomarcadores son mediciones derivadas de las imágenes que reflejan estados biológicos o patológicos del tejido cerebral. Son de utilidad para realizar diagnósticos y pronósticos, o para monitorear respuestas a intervenciones terapéuticas. Varias técnicas de imagen por resonancia magnética se han utilizado como biomarcadores del estado patológico del tejido cerebral en la EP (Pyatigorskaya et al., 2014). Los parámetros de atrofia neuronal y de cambios en la sustancia gris (SG) de estructuras cerebrales como los núcleos basales, el hipocampo, la amígdala, el tálamo y la corteza han sido biomarcadores comunes detectados por imágenes estructurales en la EP (Sterling, Lewis, Du, & Huang, 2016). En la actualidad se ha propuesto un biomarcador muy prometedor para la patología: los parámetros derivados de DWIs que reflejan anomalías en SB de manera indirecta (Pyatigorskaya et al., 2014). Estas técnicas no invasivas permiten realizar descripciones muy completas y adecuadas de la microarquitectura de la SB *in vivo*, ya sea durante el desarrollo cerebral normal, en su patología, o en su recuperación y plasticidad (Concha, 2014).

La revisión de Hall et al. (2016) recopila 47 artículos que determinan una asociación consistente entre anomalías en parámetros de difusión y síntomas motores y

no motores en la EP. Los hallazgos más concluyentes de la revisión sugieren que las alteraciones en el funcionamiento cognitivo presentes en la enfermedad se relacionan con anomalías en la difusión de áreas frontales, parietales, cuerpo calloso y otras fibras mayores que conectan el cerebro medio y las estructuras subcorticales con la neocorteza. Particularmente, Vaillancourt et al. (2009), mediante el modelo DT, describen un índice de anisotropía reducido en estructuras subcorticales en la EP, así como una relación específica entre la reducción anisotrópica de la SN compacta y el incremento de la severidad de los síntomas motores.

También se ha propuesto que la degeneración axonal podría ser una característica temprana de la EP. La revisión actual de Burke & O'Malley (2013) reúne gran evidencia de estudios *postmortem*, con neuroimagen funcional, y de modelos genéticos y con neurotoxinas que destacan la detección temprana de la EP a niveles axonales y no a nivel del soma de las neuronas como se había propuesto inicialmente.

La propuesta inicial consistía en que la característica principal y más temprana de la EP era la degeneración del cuerpo de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, sin embargo, existe evidencia que contradice dicha propuesta. De acuerdo con los estudios de neuroimagen funcional revisados por Burke & O'Malley (2013), hay una pérdida neuronal inversa en la vía nigroestriatal; es decir, la pérdida de neuronas estriatales es proporcionalmente mayor que la pérdida de neuronas de la SN cuando aparecen los síntomas motores de la EP. Hallazgos *postmortem* recopilados por esta misma revisión (Burke & O'Malley, 2013), demuestran que la proteína alfa-sinucleína, que se expresa en los cuerpos y neuritas de Lewy característicos de la patología, es abundante en las terminales axónicas presinápticas, lo cual indica un efecto retrógrado de la patogénesis; primero degeneran las terminales axónicas y luego el soma de las neuronas. Finalmente, la revisión (Burke & O'Malley, 2013) también muestra evidencia de modelos genéticos y con neurotoxinas que respalda la degeneración axonal como característica primaria de la EP; en estos modelos, la muerte de las neuronas estriatales también

excede proporcionalmente a la de las neuronas dopaminérgicas de la SN, antecediendo la degeneración axónica a la del cuerpo neuronal. En suma, esto sugiere que podría existir degeneración walleriana en la EP.

La degeneración walleriana fue descrita en 1850 por Augustus Waller en un modelo animal donde seccionaron los nervios periféricos. Consiste en la degeneración neuronal secundaria a la lesión o atrofia axonal que provoca la interrupción del axón y el cuerpo celular. Los cambios derivados de esto pueden ser retrógrados o anterógrados. Los primeros se producen desde la región axonal afectada hacia el cuerpo neuronal; mientras que los segundos se originan desde la región axonal afectada hacia el mismo axón, alterando incluso a la neurona postsináptica. Dicha degeneración puede ocurrir a lo largo de los tractos cerebrales de SB, por lo que puede identificarse de manera indirecta mediante técnicas de neuroimagen (Kuhn, Johnson, & Davis, 1988; Yamada et al., 1998).

Pierpaoli et al. (2001) mostraron que las DWIs permiten identificar la degeneración walleriana. Mediante anomalías en parámetros de difusión (específicamente la reducción de la difusión anisotrópica paralela a las fibras de SB) derivados del modelo DT, identificaron degeneración en regiones de fibras de SB de vías motoras descendentes, secundaria a infartos lacunares en la cápsula interna. Un estudio más reciente de Sharma, Sheriff, Maudsley, & Govind, (2013) también sugiere la posibilidad de identificar degeneración walleriana, mediante anomalías en parámetros de difusión, en enfermedades neurodegenerativas. Sus resultados muestran una reducción de FA y un incremento de ADC en los núcleos basales y el tálamo de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica, lo que indica degeneración neuronal de estas estructuras.

En este sentido, la evidencia científica refuerza la promesa de los parámetros derivados de DWIs como biomarcadores importantes para caracterizar la EP.

III. JUSTIFICACIÓN

Se ha confirmado que existen acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en la piel de pacientes con EP (Miki et al., 2010; Rodríguez-Leyva et al., 2014). También se ha demostrado de manera indirecta, mediante parámetros de difusión, que existen anomalías en la SG y SB en dicha enfermedad (Hall et al., 2016; Vaillancourt et al., 2009). Incluso se ha desarrollado una nueva propuesta que sugiere que la característica primaria de la patología es la degeneración axonal dopaminérgica, y no la del cuerpo de las neuronas dopaminérgicas como se proponía inicialmente (Burke & O'Malley, 2013).

Tal evidencia nos sugiere dos biomarcadores que pueden ser identificados en etapas tempranas de la EP, que son mínimamente invasivos y más accesibles que otros procedimientos y, sobretodo, que pueden observarse *in vivo*: la acumulación anormal de alfa-sinucleína en la piel y los parámetros de difusión que miden anomalías de SB de manera indirecta.

Establecer una relación entre ambos biomarcadores puede ser una estrategia muy importante para lograr diagnósticos más tempranos y seguimientos adecuados de la enfermedad, así como para reenfocar los esfuerzos terapéuticos hacia el mantenimiento de las conexiones cerebrales, con el fin de prevenir el progreso degenerativo de la patología.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. Objetivo general

Estudiar las anomalías de SG y SB en pacientes con EP, en el marco del modelo clásico de su fisiopatología, así como su posible relación con acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel y el progreso del padecimiento, con el fin de caracterizar mejor la EP en beneficio de diagnósticos más tempranos y seguimientos adecuados.

2. Objetivos particulares

- a) Desarrollar un procedimiento estándar para reconstruir, mediante tractografía probabilística, la trayectoria de las fibras nigroestriatales de SB.
- b) Estudiar las anomalías volumétricas y en parámetros de difusión de estructuras de SG y SB (particularmente las fibras nigroestriatales) en la EP.
- c) Determinar si existe relación entre las anomalías volumétricas y en parámetros de difusión de estructuras de SG y SB (particularmente las fibras nigroestriatales) y el progreso de la EP y las acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel.

3. Hipótesis

- a) El modelo CSD permitirá reconstruir, de manera confiable (en la mayoría de los participantes), la trayectoria de las fibras nigroestriatales de SB.
- b) Habrá diferencias entre grupos en el volumen y en parámetros de difusión de estructuras de SG y SB (fibras nigroestriatales).
- c) Habrá una relación entre las anomalías de volumen y en parámetros de difusión de estructuras de SG y SB (fibras nigroestriatales) y el progreso de la EP y el porcentaje de acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel.

V. MÉTODO

1. Participantes

El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Central de San Luis Potosí y por el del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla, Querétaro. Se retomaron los datos de 23 participantes reclutados del Hospital Central de San Luis Potosí, uno fue excluido por artefactos de imagen que no pudieron ser corregidos. Todos los sujetos fueron invitados a participar voluntariamente y firmaron un consentimiento informado. En la tabla 1 se observa la distribución de la muestra. Se conformó un grupo control con 8 participantes del Servicio de Dermatología sin aparente enfermedad neurodegenerativa, y un grupo de 14 pacientes con diagnóstico de EP de la clínica de los trastornos del movimiento del Servicio de Neurología. Los participantes del grupo control fueron pareados en sexo y edad con los participantes del grupo con EP. El grupo control incluyó pacientes con bajo porcentaje en piel de acumulaciones anormales de alfa-sinucleína; mientras que el grupo con EP incluyó pacientes con el diagnóstico de la enfermedad y un alto porcentaje en piel de acumulaciones anormales de alfa-sinucleína. El diagnóstico de EP fue realizado con la escala clínica UPDRS (*Unified Parkinson's Disease Rating Scale*) de la Sociedad de Desórdenes del Movimiento (MDS, *Movement Disorder Society*).

Tabla 1 Distribución de la muestra

n=22	Parkinson	Control	Total
Hombres	8 (36.36%)	2 (9.09%)	10 (45.45%)
Mujeres	6 (27.27%)	6 (27.27%)	12 (54.54%)
Total	14 (63.63%)	8 (36.36%)	22 (100%)

2. Cuantificación de alfa-sinucleína

A todos los participantes se les realizó una biopsia de piel por *punch* de 4 milímetros en el área retroauricular de ambos oídos en el Servicio de Dermatología del Hospital Central de SLP. Mediante la técnica de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se cuantificó el porcentaje celular de los agregados anormales de alfa-sinucleína. Para más detalles sobre el procedimiento, se puede consultar el estudio original (Rodríguez-Leyva et al., 2014) del cual se retomaron los datos para este proyecto.

3. Adquisición de imágenes

Se adquirieron imágenes cerebrales de todos los participantes en la Unidad de Resonancia Magnética del Instituto de Neurobiología, campus Juriquilla, Querétaro. Se usó un resonador Philips Achieva TX de 3T con una bobina SENSE de 32 canales. Se adquirieron DWIs en 60 rebanadas mediante una secuencia Eco de Gradiente con Imágenes Eco Planares (EPI, *Echo Planar Images*). Los parámetros de la secuencia fueron los siguientes: 96 volúmenes de difusión $b=2000$ s/mm², 32 $b=1000$ s/mm², y 4 $b=0$ s/mm² no sensibles a difusión; tiempo de repetición (TR) de 11,816 ms; tiempo de eco (TE) de 70 ms; FOV (*Field Of View*) de 256x256 mm²; matriz de reconstrucción de 128x128; tamaño del voxel de 2x2x2 mm³; y grosor de rebanada de 2 mm. Adicionalmente se obtuvieron imágenes 3D de alta resolución con contraste T1 (TR/TE:8.165/3.73 ms, voxel:1 mm³) y T2-FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*), con supresión de líquido cerebrospinal (TR/TE/Tiempo de Inversión(TI):4,800/273.52/1650 ms, voxel: 0.56x1.042x1.042 mm³), para el registro y segmentación de las regiones neuroanatómicas de interés (ROIs, *Regions Of Interest*). El tiempo total de adquisición fue de aproximadamente 25 minutos por cada participante (ver figura 3).

4. Procesamiento y análisis de imágenes

A. Preprocesamiento de imágenes

Para poder trabajar con las imágenes adquiridas en el resonador se les realizó un preproceso. Primero se convirtieron a formatos compatibles con distintos programas de neuroimagen [.nii (NIFTI, *Neuroimaging Informatics Technology Initiative*) y .mif (MIF, *Mapinfo Interchange Format*)]. Después se les extrajo virtualmente el encéfalo, mediante la herramienta *BET* (*Brain Extraction Tool*) (Smith, 2002) del programa FSL (*FMRIB Software Library*, v5.0, <https://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki>). A las imágenes T1 se les removió el ruido para incrementar su calidad (Coupé et al., 2008) y las DWIs se corrigieron mediante el script *dwipreproc* del programa MRtrix versión 3.0 (Tournier, Calamante, & Connelly, 2012, <http://www.mrtrix.org/>), que usa herramientas de FSL (Smith et al., 2004) para corregir artefactos de movimiento

(Andersson & Sotiropoulos, 2015) y distorsiones de campo magnético (Andersson, Skare, & Ashburner, 2003) y geométricas (Skare & Bammer, 2010) (ver figura 3).

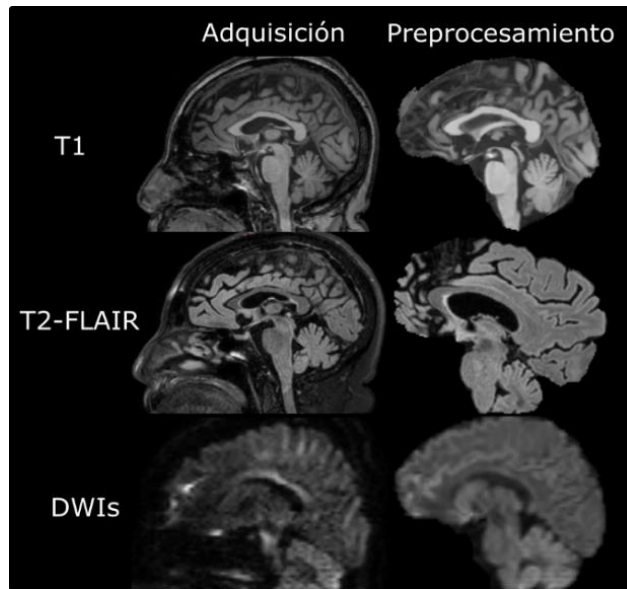


Figura 3. Imágenes adquiridas y preprocesadas de un sujeto en el plano sagital. En el lado izquierdo se muestran las imágenes T1, T2-FLAIR y DWIs adquiridas. En el lado derecho se observan las mismas imágenes ya preprocesadas y corregidas.

B. Registro de imágenes y segmentación de ROIs

El registro es una herramienta que permite fusionar dos o más imágenes. Es decir, permite la coincidencia espacial de imágenes en distintos espacios con la misma u otra resolución espacial. Permite mejorar la visualización de una imagen con pobre resolución espacial, así como trabajar con varias imágenes a la vez preservando el espacio nativo. En el caso de las DWIs, que tienen una pobre resolución espacial, es necesario el registro a imágenes de mayor resolución para lograr identificar y delimitar (segmentar) con precisión las ROIs.

En este trabajo, mediante el sistema automático de volBrain (Manjón & Coupé, 2016, <http://volbrain.upv.es/>), se segmentaron en las imágenes T1 de cada sujeto las siguientes estructuras neuroanatómicas subcorticales bilaterales: C, P, tálamo (T), GP, hipocampo (H), amígdala (A) y Acc. Se registraron linealmente, con la herramienta *FLIRT* (*FMRIB's Linear Image Registration Tool*) de FSL (Jenkinson & Smith, 2001), las imágenes T1, T2-FLAIR y DWIs para segmentar dichas estructuras en las DWIs de cada sujeto (ver figura 4.1). El registro de las imágenes

T2-FLAIR se usó posteriormente para la segmentación de la SN y el NST.

A través de la parcelación cortical automática de FreeSurfer (Desikan et al., 2006, <https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/fswiki/CorticalParcellation>) se segmentaron en las imágenes T1 de cada sujeto los giros bilaterales de la corteza frontal. Se registraron linealmente, con la herramienta *FLIRT*, las imágenes T1 y DWIs para parcelar los mismos giros en las DWIs de cada sujeto (ver figura 4.2).

En el caso de la segmentación bilateral de la SN y el NST en las DWIs, se usó un atlas de núcleos basales (Keuken et al., 2014, <https://www.nitrc.org/projects/ataq>), estandarizado al espacio MNI (*Montreal Neurologic Institute*) y normalizado para edades avanzadas. Las imágenes que conforman este atlas se adquirieron en un resonador de 7 Teslas con secuencias que permiten la obtención de mejores contrastes, lo cual precisa la segmentación de las ROIs. En cada sujeto se registró el atlas a las DWIs usando herramientas de ANTs (*Advanced Normalization Tools*, <http://stnava.github.io/ANTs/>) (ver figura 4.3). Sin embargo, debido a que el registro no fue exacto, fue necesario corregir manualmente la segmentación bilateral de estas estructuras en cada sujeto. Para ello, se usó el registro de las imágenes T2-FLAIR a las DWIs, debido a que su contraste ayuda en la identificación de la SN y el NST.

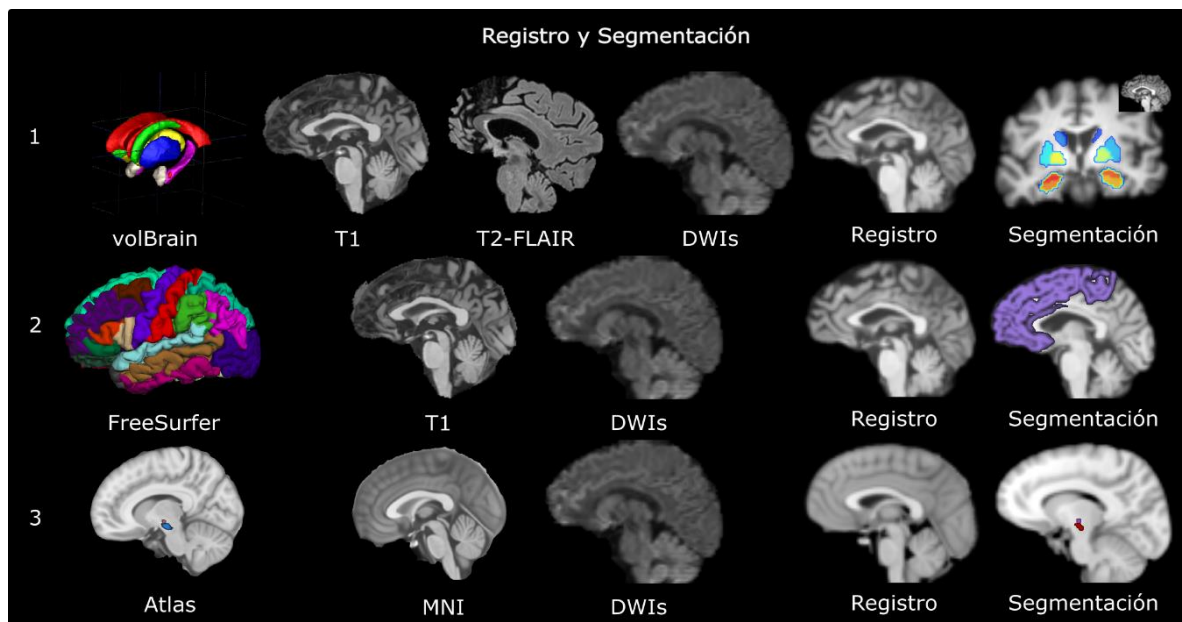


Figura 4. Registro y segmentación de ROIs en un sujeto en el plano sagital. 1) Registro y segmentación de estructuras neuroanatómicas subcorticales bilaterales mediante el sistema automático de volBrain. 2) Registro y segmentación de los giros de la corteza frontal bilateral a través de la parcelación cortical de FreeSurfer. 3) Registro y segmentación bilateral de la SN y el NST usando un atlas de núcleos basales estandarizado al espacio MNI.

C. Procesamiento de imágenes y tractografía probabilística

En cada sujeto se procesaron, con la herramienta *dwi2tensor* de MRtrix versión 3.0 (Tournier et al., 2012, <http://www.mrtrix.org/>), las DWIs mediante el modelo DT para analizar la difusión de las ROIs con los mapas cuantitativos de FA y ADC (ver figura 5).

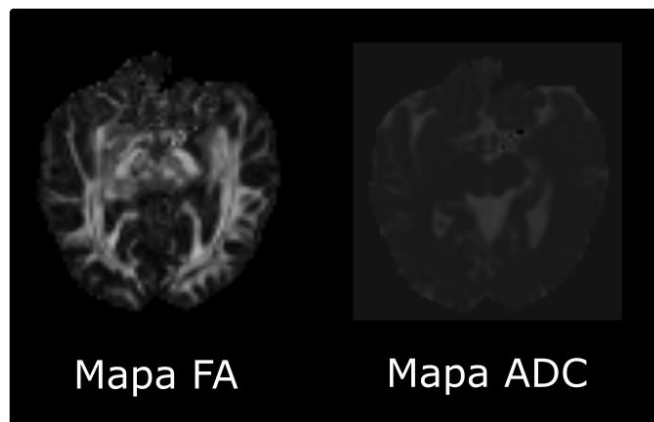


Figura 5. Mapas cuantitativos, derivados del modelo DT, de un sujeto en el plano axial.

También se procesaron, con las herramientas *dwi2response* y *dwi2fod* de MRtrix versión 3.0 (Tournier et al., 2012, <http://www.mrtrix.org/>), las DWIs para realizar la tractografía probabilística (ver figura 6). A partir del mapa de las FODs derivadas del modelo CSD, se reconstruyeron los siguientes tractos bilaterales en cada sujeto: el tracto frontal (TF: el ensamble de las trayectorias que proyectan a la corteza frontal), el tracto córticoespinal (TCE) y el tracto nigroestriatal (TNE). El TF y el TCE se usaron como tractos control y para excluir voxeles sobrepuestos con la SN. Para reconstruir el TF se sembraron 1000 *streamlines* en el tallo cerebral y se usó la corteza frontal como región de inclusión. En el TCE se sembraron 2000 *streamlines* en la corteza motora primaria y se usaron el brazo posterior de la cápsula interna y el tallo cerebral como regiones de inclusión. Finalmente, para reconstruir el TNE de interés se sustrajeron los voxeles sobrepuestos de la SN con el TF y el TCE; se sembraron 2000 *streamlines* en los voxeles no sobrepuestos de la SN; se usó el CE

(incluyendo al C y P) como región de inclusión; y se usaron la corteza frontal y el TCE como regiones de exclusión. En la reconstrucción de todos los tractos se excluyó el hemisferio contralateral. Con el mismo programa (MRtrix versión 3.0), se obtuvo un mapa probabilístico de cada tracto usando un umbral de 10 *streamlines* por pixel con base en un análisis observacional exploratorio; y se segmentó una máscara para cada mapa. A la máscara del TNE también se le sustrajo el volumen parcial de SG de la SN y el CE para analizar sólo la SB.

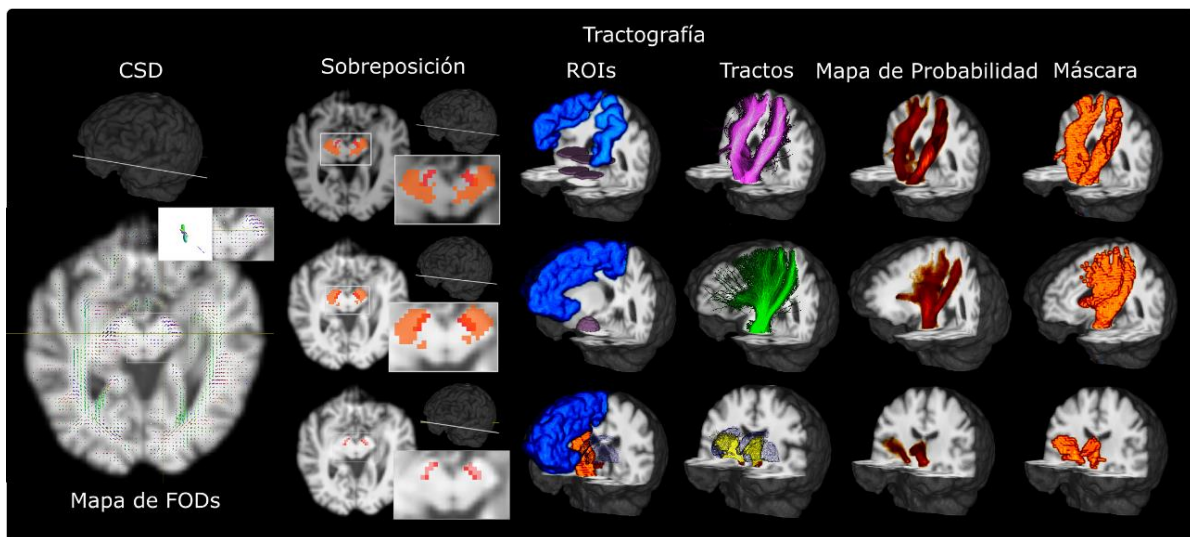


Figura 6. Tractografía probabilística de un sujeto. En la primera columna se muestra el mapa de las FODs derivadas del modelo CSD en el plano axial; se amplifica la FOD de un voxel de la SN izquierda, que representa el perfil de difusión en ese voxel. En las siguientes tres columnas se ejemplifica la reconstrucción de los tractos a partir de las FODs correspondientes. En la primera fila se observa el TCE bilateral (rosa) reconstruido (cuarta columna) a partir de las FODs de las regiones (ROIs, tercera columna) bilaterales de siembra (corteza motora primaria en azul) e inclusión (brazo posterior de la cápsula interna y tallo cerebral en morado); también se observa la amplificación de la sobreposición bilateral (segunda columna) del TCE (naranja) y la SN (rojo) en el plano axial. En la segunda fila se aprecia el TF derecho (verde) reconstruido (cuarta columna) a partir de las FODs de las regiones (ROIs, tercera columna) derechas de siembra (tallo cerebral en morado) e inclusión (corteza frontal en azul); también se aprecia la amplificación de la sobreposición bilateral (segunda columna) del TF (naranja) y la SN (rojo) en el plano axial. En la tercera fila se muestra el TNE bilateral (amarillo) reconstruido (cuarta columna) a partir de las FODs de las regiones (ROIs, tercera columna) bilaterales de siembra (SN no sobrepuesta en rojo) e inclusión (CE en azul oscuro), y excluyendo las FODs de la corteza frontal (azul claro) y el TCE (naranja) bilaterales; también se muestra la amplificación (segunda columna) de los voxeles de la SN sobrepuestos (rojo oscuro) con el TCE y TF en el plano axial. Finalmente, en las últimas dos columnas se encuentran los mapas probabilísticos de los tractos correspondientes y la segmentación de sus máscaras.

En cada participante se cuantificó la media de FA y ADC, así como el volumen de todas las estructuras segmentadas bilateralmente (C, P, T, GP, H, A, Acc, SN, NST, TF, TCE y TNE).

5. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa RStudio versión 1.0.153. Se corrieron análisis descriptivos para conocer la distribución y características de la muestra; así como análisis comparativos y relacionales para cubrir los objetivos del estudio. Debido al tamaño y distribución de la muestra se utilizaron pruebas no paramétricas. Para los análisis comparativos se usó la prueba *U Mann-Whitney* para muestras independientes. Para los análisis relacionales se usó la prueba de *Spearman*. Para todos los análisis se estableció un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ no corregido para evitar perder los efectos significativos.

VI. RESULTADOS

En la tabla 2 se detallan las características descriptivas de la muestra. No se encontraron diferencias significativas entre grupos ni en sexo ni en edad. De acuerdo con el estudio (Rodríguez-Leyva et al., 2014) del cual se retomaron los datos para este proyecto, el grupo con EP presenta un porcentaje más elevado de acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel, lo cual confirma una mayor presencia de tales acumulaciones en la EP (ver figura 7).

Tabla 2 Características descriptivas de la muestra

n=22	Parkinson M (DE)	Control M (DE)	Rango	P
Sexo (H/M%)	36.36/27.27	9.09/27.27	-	0.2043
Edad (años)	69.29 (10.40)	71.13 (11.49)	51-83	0.7320
Alfa-sinucleína (%)	2.57 (1.58)	0.32 (0.32)	0.01-6.53	0.0001**
UPDRS (total)	54.07 (38.46)	-	10-130	-
Evolución (años)	8.43 (6.68)	-	1-20	-

M= media; DE= desviación estándar; **p≤0.01

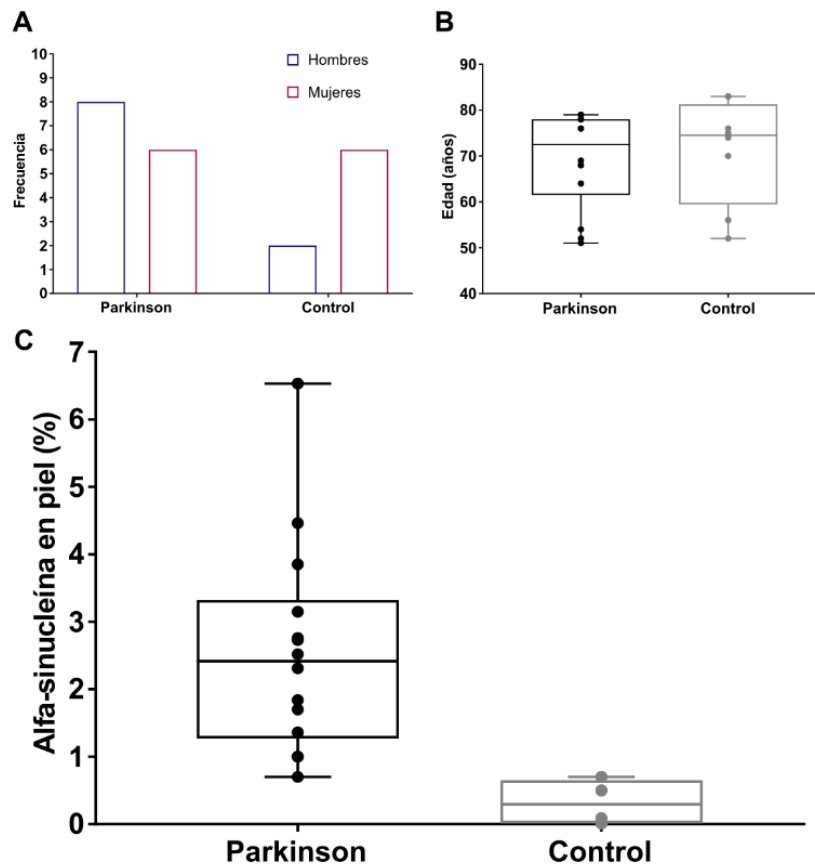


Figura 7. Gráficas que muestran las diferencias entre grupos en características descriptivas de la muestra. A) Sexo. B) Edad. C) Porcentaje de acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel.

Con respecto al objetivo de desarrollar un procedimiento estandarizado para reconstruir la trayectoria de las fibras nigroestriatales de SB mediante tractografía probabilística, se logró una reconstrucción confiable del TNE a partir del modelo CSD. A través del procedimiento descrito en el apartado V.4.C, se reconstruyó el TNE bilateral en el 95% de los participantes (ver figura 8).

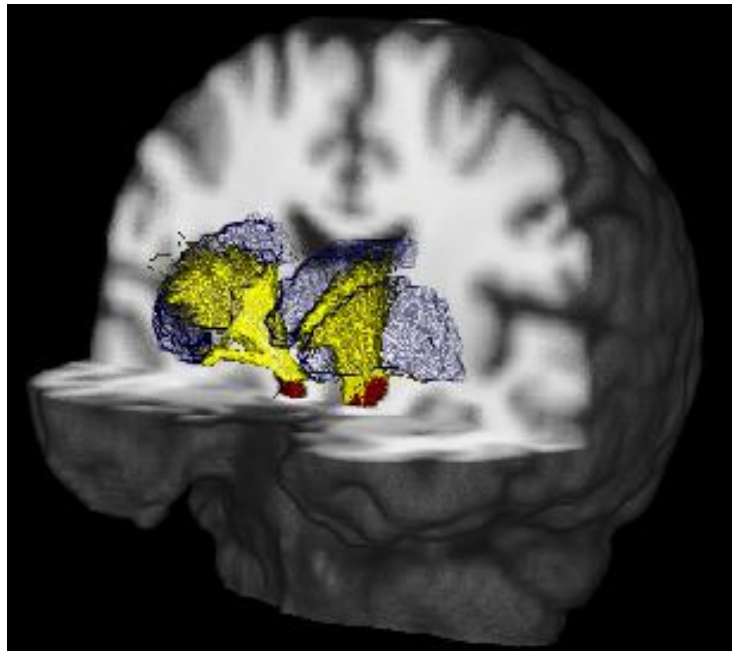


Figura 8. Reconstrucción del TNE bilateral (amarillo), a partir del modelo CSD, en un participante. En rojo se muestra la SN y en azul oscuro el CE.

En relación con los análisis comparativos, los objetivos consistían en estudiar las anomalías volumétricas y en parámetros de difusión (FA y ADC) de estructuras de SG (C, P, T, GP, H, A, Acc, SN y NST) y SB (TF, TCE y TNE) en la EP. En contraste con lo esperado, no se encontraron diferencias significativas entre grupos ni en el volumen ni en el FA de estructuras de SG y SB. De acuerdo con lo hipotetizado, se hallaron diferencias significativas entre grupos en el ADC de estructuras de SG (H y A izquierdos) y SB (TNE izquierdo). El ADC es mayor en el H izquierdo, y menor en la A y el TNE izquierdos en el grupo con EP (ver tabla 3 y figura 9). Esto confirma que en la patología existen anomalías específicas en la difusión, tanto en estructuras de SG como de SB. En la SB, particularmente se observaron anomalías en las fibras nigroestriatales y no en fibras frontales ni córticoespinales.

Tabla 3 Diferencias significativas entre grupos en el ADC ($\times 10^{-3}$ mm²/s)

n=22	ROIs	Parkinson M (DE)	Control M (DE)	P
SG	Hipocampo izquierdo	1.01 (0.17)	0.84 (0.09)	0.0168*
	Amígdala izquierda	0.62 (0.09)	0.66 (0.05)	0.0407*
SB	Tracto nigroestriatal izquierdo	0.59 (0.04)	0.63 (0.03)	0.0389*

SG= sustancia gris; SB= sustancia blanca; ROIs= regiones neuroanatómicas de interés; M= media; DE= desviación estándar; * $p \leq 0.05$

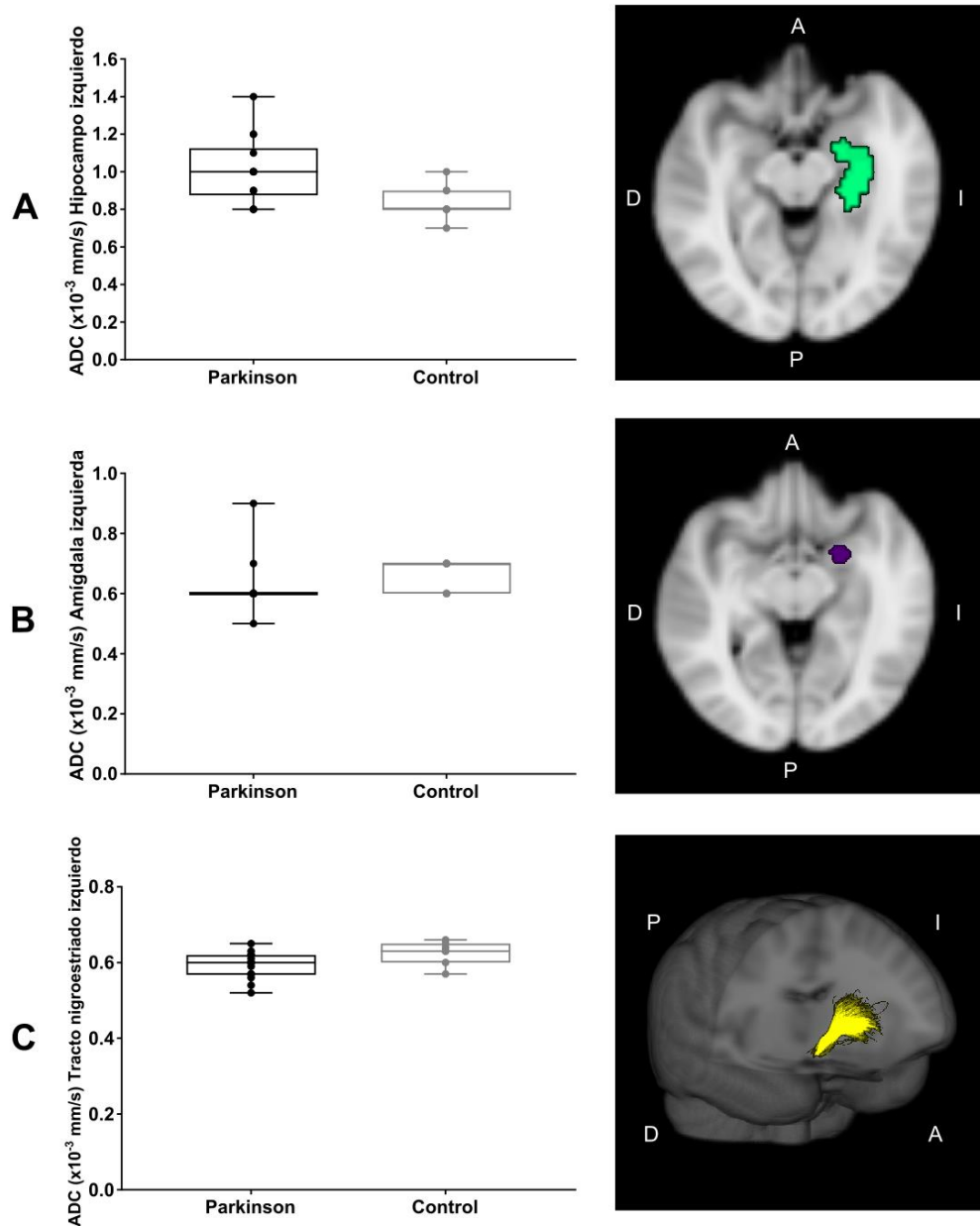


Figura 9. Gráficas que muestran las diferencias significativas entre grupos en el ADC ($\times 10^{-3}$ mm²/s). A) Hipocampo izquierdo (verde en el plano axial). B) Amígdala izquierda (morada en el plano axial). C) Tracto nigroestriatal izquierdo (amarillo en el plano tridimensional). En los planos axial y tridimensional, A= anterior, P= posterior, D= derecha e I= izquierda.

Finalmente, el objetivo de los análisis relacionales era determinar si existía una relación entre las anomalías de volumen y en parámetros de difusión (FA y ADC) de estructuras de SG (C, P, T, GP, H, A, Acc, SN y NST) y SB (TF, TCE y TNE) y el progreso de la EP y las acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel. En discordancia con lo esperado, no se encontraron relaciones significativas con el volumen de estructuras de SG y SB. Sin embargo, en concordancia con lo hipotetizado, sí se hallaron relaciones significativas con los parámetros de difusión de estructuras de SG y SB. Tales efectos no alcanzaron la significancia estadística al incluir la edad en los análisis, por lo que no se controló dicha covariable.

Se observó una relación positiva alta ($\rho=0.72$, $p=0.0040$, $n=14$) entre el puntaje total UPDRS y los años de evolución de la EP (ver figura 10), lo que sugiere que el puntaje total UPDRS es un buen indicador del progreso de la enfermedad. Se apreció una relación negativa moderada de este indicador con el FA de la SN derecha ($\rho=-0.56$, $p=0.0384$, $n=14$) (ver figura 11); así como relaciones positivas moderadas del mismo indicador con el ADC del P derecho ($\rho=0.54$, $p=0.0460$, $n=14$), la A izquierda ($\rho=0.54$, $p=0.0486$, $n=14$) y el Acc izquierdo ($\rho=0.61$, $p=0.0212$, $n=14$) (ver figura 12). Así, parece que FA es menor y ADC mayor, en estructuras de SG, cuando el progreso de la EP es mayor.

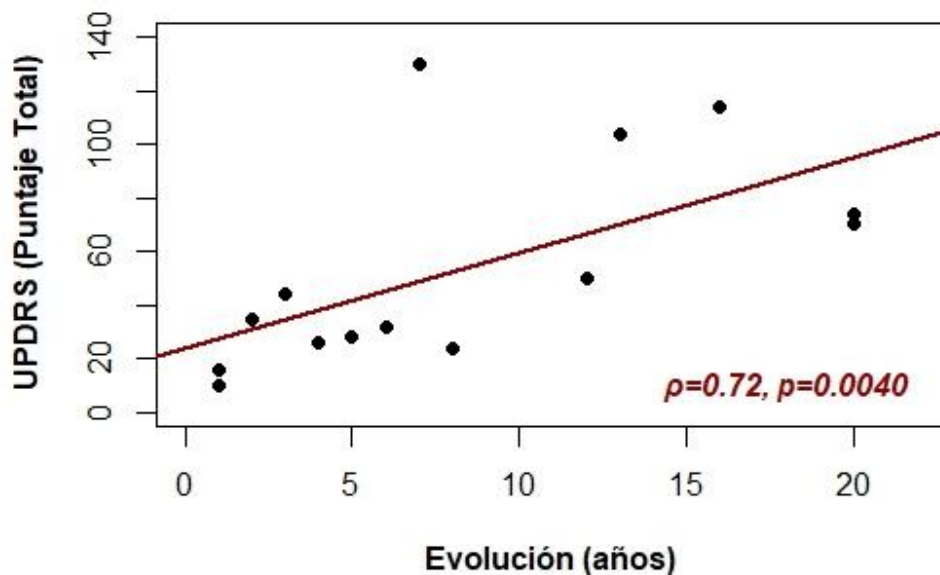


Figura 10. Gráfico de dispersión que muestra la relación positiva entre el puntaje total UPDRS y la evolución en años de la EP.

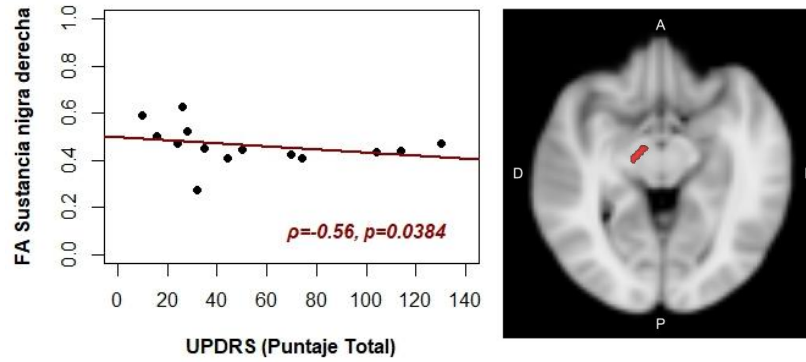


Figura 11. Gráfico de dispersión que muestra la relación negativa entre el puntaje total UPDRS y el FA de la SN derecha (roja en el plano axial), en la EP. En el plano axial, A= anterior, P= posterior, D= derecha e I= izquierda.

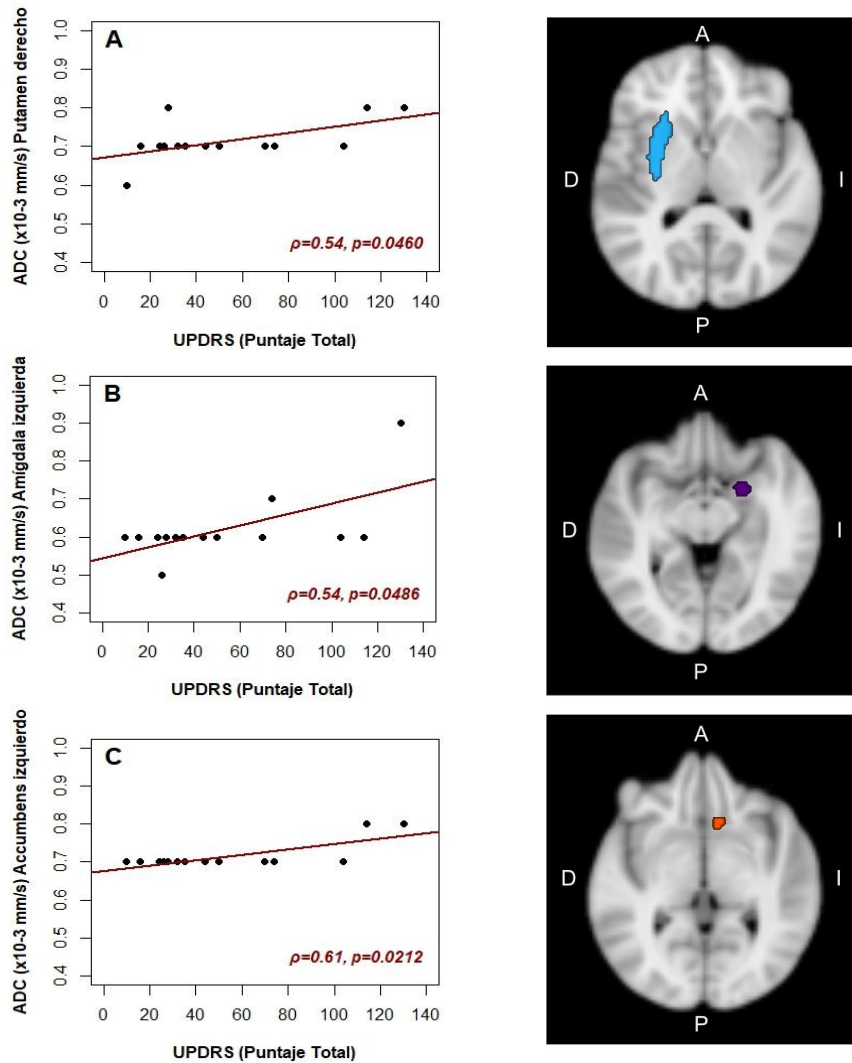


Figura 12. Gráficos de dispersión que muestran la relación positiva entre el puntaje total UPDRS y el ADC de estructuras de SG en la EP. A) Putamen derecho (azul en el plano axial). B) Amígdala izquierda (morada en el plano axial). C) Accumbens izquierdo (naranja en el plano axial). En el plano axial, A= anterior, P= posterior, D= derecha e I= izquierda.

También se halló una relación negativa moderada ($\rho=-0.48$, $p=0.0294$, $n=21$) del porcentaje de acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel con el ADC del TNE izquierdo (ver figura 13). Es decir, cuando el porcentaje de acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel es mayor, como en el caso de la EP, el ADC es menor en las fibras nigroestriatales izquierdas. Esto confirma la existencia de una asociación entre las anomalías de SB y las acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en la EP.

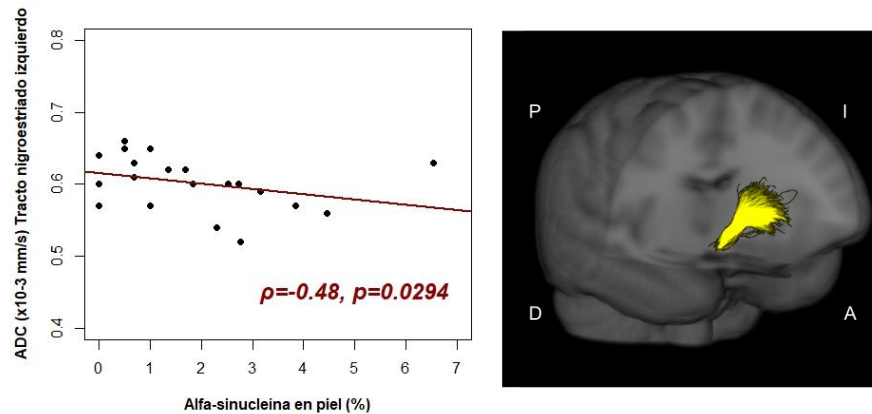


Figura 13. Gráfico de dispersión que muestra la relación negativa entre el porcentaje de acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel y el ADC del tracto nigroestriatal izquierdo (amarillo en el plano tridimensional). En el plano tridimensional, A= anterior, P= posterior, D= derecha e I= izquierda.

En este sentido, sólo las anomalías en difusión de estructuras de SG y SB (fibras nigroestriatales) se asocian con el progreso de la EP y las acumulaciones anormales de alfa-sinucleína, respectivamente.

VII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos son muy relevantes y alentadores; se lograron confirmar la mayoría de las hipótesis propuestas. El porcentaje de acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel fue mayor en el grupo con EP. Fue posible reconstruir, en la mayoría de los participantes, el tracto de las fibras nigroestriatales de SB mediante el modelo CSD. Hubo diferencias entre grupos en parámetros de difusión de estructuras de SG y SB; y se encontró una relación de las anomalías en parámetros de difusión de estructuras de SG y SB con el progreso de la EP y el porcentaje de acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en la piel, respectivamente.

El mayor porcentaje de acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel, en el grupo con EP, es consistente con estudios que reportan una mayor presencia de la proteína en distintos tejidos fuera del sistema nervioso central (Djaldetti et al., 2009), como la piel (Miki et al., 2010; Rodríguez-Leyva et al., 2014) y la glándula submandibular del tracto digestivo (Adler et al., 2016), en la EP. Aunque el sello histológico de la patología es la presencia anormal de la proteína en el tejido cerebral (principalmente en las neuronas dopaminérgicas de la SN), lo anterior confirma que la enfermedad es sistémica y que, por lo tanto, se puede caracterizar por una presencia anormal de alfa-sinucleína en varios sistemas.

Su acumulación juega un papel muy relevante en los cambios intracelulares que provocan disfunción o muerte celular (Wakabayashi et al., 2009) y neurodegeneración en etapas avanzadas (Stefanis, 2012). En el tejido cerebral, la presencia de la proteína no está confinada únicamente al cuerpo celular de las neuronas dopaminérgicas; también se localiza en los procesos neuríticos, ligada a las vesículas de las terminales presinápticas, lo que potencialmente se relaciona con su neurotoxicidad (Spinelli et al., 2014), implicando incluso una degeneración axonal anterior a la degeneración del cuerpo celular (Burke & O'Malley, 2013). Su mecanismo neurotóxico en neuronas dopaminérgicas se ha demostrado en dos modelos murinos (Recchia et al., 2008; Zhang et al., 2017b). En el modelo de Recchia et al. (2008) provocaron déficits motores en ratas, semejantes a los de la

EP en humanos, mediante la inyección de una forma mutada del gen que codifica para alfa-sinucleína en la SN derecha. En el modelo de Zhang et al. (2017b) indujeron alteraciones motoras en ratones mediante una enzima que promueve la agregación anormal de la proteína al adherirse a ésta.

Así, la acumulación anormal de alfa-sinucleína en piel resulta un biomarcador muy útil para el diagnóstico y progreso de la EP, ya que puede adquirirse *in vivo*, desde etapas tempranas y con mínima invasión. Es un indicador sistémico de la patología que, en el tejido cerebral, está implicado no sólo en la degeneración del cuerpo de las neuronas dopaminérgicas, sino en su degeneración axonal. Por lo tanto, tiene sentido que se relacione con parámetros de difusión que indican anomalías en las fibras nigroestriatales de SB implicadas en su fisiopatología (Braak et al., 2003; Langston, 2006), tal y como se observa en los resultados del presente trabajo.

Las fibras nigroestriatales de SB son proyecciones dopaminérgicas que juegan un papel muy importante en el control del movimiento voluntario y automático (DeLong, 2000). El déficit de dopamina en su vía compromete a las neuronas dopaminérgicas y ocasiona un desequilibrio en el circuito de los núcleos basales, provocando los síntomas motores característicos de la EP (Braak et al., 2003; Langston, 2006). Es posible analizar y reconstruir estas fibras, *in vivo* y de manera no invasiva, mediante DWIs (Concha, 2014; Pyatigorskaya et al., 2014). En este trabajo se reconstruyó el TNE, a través de tractografía probabilística derivada del modelo CSD, para analizar los parámetros de difusión de las fibras nigroestriatales en la EP. La tractografía no refleja los tractos de SB reales, sino que resuelve sus trayectorias mediante algoritmos computacionales y modelos matemáticos, por lo que conlleva ciertas limitaciones (Jbabdi et al., 2015). El procedimiento implementado en este estudio permitió visualizar la trayectoria correspondiente al TNE en el 95% de los participantes. No se logró visualizar el tracto en un caso aislado debido a errores de registro que no pudieron ser corregidos.

Se distinguió una trayectoria de la SN al estriado dorsolateral (C y P) que viaja por la cápsula interna. En algunos casos, incluso se distinguieron proyecciones laterales al P caudal. Esto es consistente con la descripción de la anatomía de la vía

nigroestriatal en mamíferos (Moore & Bloom, 1978), en la que los axones de la SN compacta ascienden en un haz principal a través del tegmento ventromedial hacia el diencéfalo rostral y la porción medial de la cápsula interna, para luego distribuirse a lo largo del estriado dorsolateral; un haz lateral al principal corre hacia el P caudal a través del GP en los mamíferos cuyo estriado se encuentra separado en C y P. Una anatomía y conectividad similar de la SN y el estriado dorsolateral se ha descrito en estudios de trazadores retrógrados (Carmona, Catalina-Herrera, & Jiménez-Castellanos, 1991; Hontanilla, De las Heras, & Giménez-Amaya, 1996; Lynd-Balta & Haber, 1994; Smith & Kieval, 2000).

En estudios de tractografía similares al presente (Andica et al., 2018; Tan et al., 2015; Zhang et al., 2015), sólo reconstruyeron el haz lateral a la vía nigroestriatal principal. En contraste con este trabajo, que incluyó al C y P como regiones blanco, estos estudios incluyeron al GP; además, no derivaron la tractografía del modelo CSD de difusión. Tan et al. (2015) y Zhang et al. (2015) emplearon el modelo DT; y Andica et al. (2018) aplicaron el modelo NODDI (*Neurite Orientation Dispersion and Density Imaging*). El modelo DT (Basser et al., 1994) es sencillo en su interpretación, pero resulta ineficiente para resolver la orientación de fibras en regiones de entrecruzamiento, donde existen más de una población de fibras orientadas coherentemente. El modelo NODDI es complejo de interpretar, pero estima parámetros confiables para representar adecuadamente tres ambientes de la microestructura de las neuritas: el intracelular, el extracelular y el fluido cerebroespinal (Zhang, Schneider, Wheeler-Kingshott, & Alexander, 2012). El modelo CSD (Tournier et al., 2004, 2008; Tournier et al., 2007) es más simple de interpretar que el modelo NODDI y, por su mayor resolución angular, resuelve la inexactitud del modelo DT en regiones de entrecruzamiento. En este sentido, el modelo CSD resulta idóneo para reconstruir confiablemente el TNE que, precisamente, se localiza en una región por donde cruzan varias fibras, principalmente las córticoespinales y las de la cápsula interna. Otros estudios (Theisen et al., 2017; Zhang, Larcher, Misic, & Dagher, 2017a) hallaron un perfil de conectividad nigroestriatal más consistente con este estudio. De manera similar, Theisen et al. (2017) incluyeron al P como ROI; y Zhang et al. (2017a) estimaron la

tractografía mediante el modelo de deconvolución esférica.

Hasta ahora, la evidencia que analiza el TNE con técnicas de neuroimagen en la EP ha sido escasa (Andica et al., 2018; Tan et al., 2015; Theisen et al., 2017; Zhang et al., 2015). Quizá, debido a las dificultades técnicas (Jbabdi et al., 2015) que conlleva identificar confiablemente el TNE en imágenes cerebrales. Es un tracto pequeño que incluye proyecciones de la SN, un núcleo cerebral que también es muy pequeño y se localiza a nivel del cerebro medio en el tallo cerebral. En las imágenes de resonancia magnética, esta región es susceptible a artefactos de movimiento y volumen parcial, así como a errores de registro. Además, las DWIs tienen una limitada resolución espacial, por lo que la contaminación del tracto por fibras que entrecruzan o de áreas adyacentes es muy probable. Tal es el caso de las fibras córticoespinales y de la cápsula interna.

El proyecto actual intentó resolver las limitaciones mencionadas mediante el desarrollo de un procedimiento sistematizado para reconstruir el TNE. No obstante, debido al tamaño del tracto y los artefactos de volumen parcial, fue imposible eliminar por completo la contaminación de las fibras que viajan por la cápsula interna para llegar a regiones frontales (Meola et al., 2016). El procedimiento consistió inicialmente en definir adecuadamente la SN, la cual se estableció como región de “siembra” para iniciar la trayectoria del TNE. Su segmentación se realizó de manera semiautomática. A partir de un atlas estándar para edades avanzadas de los núcleos basales (Keuken et al., 2014), desarrollado mediante neuroimágenes estructurales adquiridas en un resonador magnético de 7 Teslas, se registró la SN a las DWIs. Las inexactitudes del registro se corrigieron manualmente de acuerdo con el conocimiento anatómico de la SN y con ayuda de las imágenes T2-FLAIR, debido a que su contraste permite una mejor identificación de dicha estructura. Posteriormente, se excluyeron de la SN los voxeles que ésta compartía con el TF y el TCE, los cuales también se usaron como tractos control. El algoritmo de reconstrucción tractográfica inició en la SN, incluyó al estriado dorsolateral (C y P), y excluyó al TCE y a la corteza frontal. De esta manera, es preciso afirmar que el TNE corresponde mayormente a las fibras nigroestriatales, ya que se logró atenuar

la contaminación de fibras córticoespinales y de la cápsula interna, lo que se reafirma en los análisis comparativos y relacionales: sólo se encontraron efectos en el TNE, no en el TF ni en el TCE, lo que sugiere que las fibras son distintas.

En cuanto a los análisis comparativos y relacionales, no se usaron modelos estadísticos complejos debido a las limitaciones de los datos y la muestra. Se intentó reducir el número de variables de volúmenes y difusión mediante un análisis de componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*), sin embargo, los resultados no arrojaron componentes concluyentes que pudieran incluirse en otros modelos. No obstante, los resultados actuales son muy relevantes y alentadores. Es necesario corroborarlos con muestras más amplias, ya que enmarcan la importancia de incrementar y reenfocar futuras investigaciones sobre la EP hacia las conexiones cerebrales, haciendo uso de las técnicas de difusión más novedosas y avanzadas. Hasta ahora, son las únicas que permiten estudiar la SB *in vivo*.

Se analizaron parámetros de volumen y difusión en estructuras de SG (C, P, T, GP, H, A, Acc, SN y NST) y SB (TNE) comprometidas en la EP, así como su relación con variables clínicas (edad, evolución, puntaje total UPDRS y % de alfa-sinucleína en piel). También se analizaron el TF y el TCE como tractos control, de acuerdo con la lógica de que las fibras correspondientes no están implicadas en los síntomas motores de la EP. Para estudiar el volumen se usó un porcentaje proporcional al total cerebral para evitar un sesgo debido a las diferencias individuales en el tamaño cerebral. En la difusión se usaron los parámetros FA y ADC del modelo DT (Basser et al., 1994), ya que existe suficiente evidencia que los posiciona como biomarcadores de la degeneración dopaminérgica en la EP (Harper, Newman, Hadley, & Grosset, 2011; Scherfler et al., 2013; Schuff et al., 2015), incluso en modelos animales (Liu et al., 2017).

En los análisis comparativos por grupo, no se observaron diferencias volumétricas en ninguna de las estructuras analizadas, pero sí se hallaron anomalías en parámetros de difusión en SG y en SB. Los hallazgos de volumen coinciden con evidencia que no encuentra cambios volumétricos en estructuras subcorticales en la EP (Theisen et al., 2017), sin embargo, Sterling et al. (2017) sí encuentran

reducciones de volumen en estructuras corticales, lo que podría sugerir que el volumen es un parámetro sensible para detectar cambios en estructuras corticales, pero no en estructuras subcorticales en la EP. Los resultados de difusión concuerdan con estudios que han encontrado anomalías en estructuras de SG (Haehner et al., 2018; Hall et al., 2016; Sterling et al., 2016; Theisen et al., 2017; Vaillancourt et al., 2009) y SB (Hall et al., 2016; Sterling et al., 2017) comprometidas en la EP, particularmente las fibras nigroestriatales de SB (Andica et al., 2018; Theisen et al., 2017; Tan et al., 2015; Zhang et al., 2015). No obstante, a diferencia de otros estudios que usaron el modelo DT y han encontrado reducciones de FA y/o incrementos de ADC, tanto en SG (Haehner et al., 2018; Theisen et al., 2017; Vaillancourt et al., 2009) como en SB (Tan et al., 2015; Zhang et al., 2015), en este trabajo no se encontraron reducciones de FA, ni en SG ni en SB, y los hallazgos de ADC fueron inconsistentes: el ADC fue mayor en el H izquierdo, y menor en la A y el TNE izquierdos en la EP. También hay evidencia de inconsistencias o nulo efecto en estos parámetros en investigaciones animales (Hikishima et al., 2015; Van Camp et al., 2009) y de humanos (Andica et al., 2018; Hall et al., 2016; Sterling et al., 2017;). Incluso, no se han encontrado asociaciones consistentes entre FA y ADC e indicadores de la función dopaminérgica (Lenfeldt et al., 2017), lo que sugiere que estos biomarcadores no son óptimos en la EP de manera aislada (Hirata et al., 2017). Quizá su interpretación sea más precisa en conjunto con otros biomarcadores, como el porcentaje de alfa-sinucleína en piel; este estudio confirmó la asociación del porcentaje de la proteína y el ADC en SB (TNE).

Si bien los hallazgos no son del todo consistentes, es claro que FA y ADC reflejan algún tipo de cambio en la microarquitectura de las estructuras implicadas en la EP. Una explicación que se ha propuesto ante tales inconsistencias es la respuesta inflamatoria (Vila et al., 2001), la cual cambiaría el patrón de difusión debido a la gliosis en el vacío dopaminérgico. Otra posible explicación es la intrusión de fibras adyacentes de tractos longitudinales que incrementan la direccionalidad (Lenfeldt et al., 2015). Se requieren futuras investigaciones que incluyan muestras más amplias, modelos estadísticos más complejos e indicadores de la respuesta inflamatoria; así como parámetros más precisos de difusión, como los derivados del modelo CSD o

NODDI, para corroborar y enriquecer este estudio con biomarcadores más adecuados para describir la compleja microarquitectura de las estructuras implicadas en la EP, principalmente la de la SB, ya que existe evidencia sólida de una degeneración dopaminérgica walleriana en la patología (Burke & O'Malley, 2013; Theisen et al., 2017).

En cuanto a los análisis relacionales, no se controló la edad para evitar perder los efectos encontrados. Al controlar la variable, los efectos no alcanzaban la significancia estadística, lo que podría deberse al tamaño de la muestra más que a un efecto de la edad, ya que la muestra está pareada en esta variable y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas por grupo en la misma, ni una asociación con otras variables clínicas.

No se encontraron relaciones significativas entre el volumen de estructuras de SG y SB y el progreso de la EP (puntaje total UPDRS) y las acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel. Nuevamente se confirma que el volumen no resulta un biomarcador sensible de los cambios en estructuras subcorticales en la EP. El puntaje total UPDRS fue considerado como un indicador del progreso de la EP debido a su alta asociación con los años de evolución de la EP.

Se hallaron relaciones moderadas significativas entre los parámetros de difusión de estructuras de SG y SB, y el progreso de la EP y las acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel, respectivamente. El mayor progreso de la EP se asocia con reducciones de FA (en SN derecha) e incrementos de ADC (en P derecho, A izquierda y Acc izquierdo) en estructuras de SG; mientras que las mayores acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel se asocian con reducciones de ADC (en el TNE izquierdo) en SB. Estos resultados son consistentes con estudios que también encuentran asociaciones entre parámetros de difusión e indicadores del progreso de la EP (Vaillancourt et al., 2009; Zhang et al., 2015) y acumulaciones anormales de alfa-sinucleína (Khairnar et al., 2016). Además, se suman a la evidencia de inconsistencias sobre el efecto en los parámetros de difusión discutidos en párrafos anteriores, confirmando que no son óptimos en la EP de manera aislada (Hirata et al., 2017). Sin embargo, el hallazgo de su asociación con

el porcentaje de alfa-sinucleína en piel refuerza su potencial como biomarcador en conjunto con otros biomarcadores, particularmente en estructuras de SB, ya que la relación sólo se observó en el TNE y, como se ha discutido anteriormente, hay evidencia de degeneración dopaminérgica walleriana en la EP (Burke & O'Malley, 2013; Theisen et al., 2017). Además, esto último adquiere mayor sentido con el hallazgo de la relación entre las anomalías en parámetros de difusión en estructuras de SG y el progreso de la enfermedad, pues podría sugerir que las anomalías en SG son más evidentes cuando la enfermedad ha progresado, es decir, cuando ya hubo degeneración axonal.

Tomando en cuenta todos los hallazgos, es posible confirmar que la relación entre las anomalías de SB y las acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel existe y sustenta el uso potencial conjunto de ambos biomarcadores para caracterizar la EP desde etapas tempranas, *in vivo* y con mínima invasión; en beneficio de diagnósticos más tempranos y seguimientos adecuados.

VIII. LIMITACIONES Y FUTURAS INVESTIGACIONES

Como cualquier estudio, éste presenta varias limitaciones que deben ser consideradas. En primer lugar, la muestra es reducida, lo que repercute en los análisis estadísticos. Una muestra pequeña limita el alcance de los efectos estadísticos y resulta insuficiente para realizar modelos estadísticos complejos. Las muestras más grandes describen con mayor precisión los datos, son más representativas y generalizables, y permiten establecer modelos estadísticos complejos para describir o explicar los datos con menor probabilidad de error. Por ello, en este estudio se usaron análisis estadísticos simples, cuyos resultados deben interpretarse con cautela y corroborarse con muestras más amplias y modelos estadísticos más complejos. Sin embargo, cabe destacar que, a pesar de las limitaciones de la muestra, se logró diferenciar al grupo con EP del grupo control.

En segundo lugar, es importante considerar que la tractografía no refleja los tractos de SB reales, sino que resuelve sus trayectorias mediante algoritmos computacionales y modelos matemáticos, por lo que conlleva ciertas limitaciones (Jbabdi et al., 2015). Particularmente, la reconstrucción del TNE implica varias dificultades técnicas que deben afrontarse. Las DWIs tienen una resolución espacial limitada, el tracto es pequeño y se localiza en el cerebro medio en el tallo cerebral. Por lo tanto, la región que ocupa en las imágenes de resonancia magnética es muy susceptible a artefactos de movimiento y volumen parcial, así como a errores de registro, siendo probable la contaminación del tracto por fibras que entrecruzan o de áreas adyacentes, como las fibras córticoespinales y de la cápsula interna. Para afrontar dichas limitaciones, este trabajo desarrolló un procedimiento sistematizado enfocado, principalmente, a la precisa segmentación de la SN y la reconstrucción del TF y el TCE para atenuar la contaminación de las fibras correspondientes. Aún así, y aunque el TNE coincide con descripciones anatómicas en mamíferos (Moore & Bloom, 1978), estudios con trazadores retrógrados (Carmona et al., 1991; Hontanilla et al., 1996; Lynd-Balta & Haber, 1994; Smith & Kieval, 2000) y estudios de imagen similares (Theisen et al., 2017; Zhang et al., 2017a), convendría confirmar las proyecciones mediante histología. Siempre es deseable validar los

resultados de la tractografía con múltiples métodos. Además, es necesario tener en mente que esta técnica no puede resolver la direccionalidad de las conexiones cerebrales, lo que hace imposible distinguir el flujo de la información. Sin embargo, a pesar de sus limitaciones, es la única que permite estudiar la conectividad anatómica *in vivo* y de manera no invasiva, lo que la convierte en una herramienta muy valiosa para estudiar la SB en patologías donde puede estar comprometida, como lo es la EP.

Otra limitación del proyecto es la falta de un análisis de reproducibilidad, tanto de la tractografía como de la segmentación de la SN. Siempre es conveniente que se correlacionen los hallazgos de dos examinadores para corroborar los datos y evitar cualquier tipo de sesgo individual. Además, se recomienda que en futuras investigaciones se segmente la SN de acuerdo con las subdivisiones (lateral, medial y ventral) del estudio de Zhang et al. (2017a), lo que quizá contribuya con una reconstrucción tractográfica del TNE más precisa.

También es importante desarrollar investigaciones que incluyan parámetros de difusión más precisos, como los derivados del modelo CSD (Tournier et al., 2004, 2008; Tournier et al., 2007) y NODDI (Zhang et al., 2012), e indicadores de la respuesta inflamatoria. Como se observó en este estudio, los parámetros de difusión del modelo DT (FA y ADC) son inconsistentes de manera aislada (Hirata et al., 2017), lo que se ha propuesto que pudiera deberse a la gliosis que origina la respuesta inflamatoria (Vila et al., 2001). Estos estudios serían de gran utilidad para establecer biomarcadores adecuados para describir la compleja microarquitectura de las estructuras implicadas en la EP. Estudios longitudinales, multimodales y con medidas de desempeño cognitivo también ayudarían a producir resultados con mayor valor clínico en la EP.

IX. CONCLUSIONES GENERALES

En la búsqueda de una relación entre anomalías en SB y acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel en la EP, se desarrolló un proyecto en el que se identificó que los síntomas motores de la patología se originan por el compromiso de la vía nigroestriatal. Para estudiarla, a partir de DWIs, se reconstruyó su trayectoria y se generaron mapas de parámetros de difusión derivados del modelo DT, los cuales se relacionaron con el porcentaje de alfa-sinucleína en piel. A pesar de sus limitaciones, los resultados observados son relevantes y alientan a continuar con futuras investigaciones para extender y corroborar los hallazgos. Se pueden derivar cuatro conclusiones principales de éstos.

La primera es que es posible reconstruir el TNE mediante un procedimiento sistematizado de tractografía probabilística derivada del modelo CSD, el cual permite una descripción confiable de la conectividad anatómica de regiones por donde entrecruzan fibras adyacentes, como sucede en la vía nigroestriatal. Este es uno de los pocos trabajos que logran identificar la conectividad anatómica de la SN y el estriado con el modelo CSD. La segunda es que la acumulación anormal de alfa-sinucleína en piel es un biomarcador sistémico muy útil para el diagnóstico y progreso de la EP. Se puede adquirir *in vivo*, desde etapas tempranas de la enfermedad y con mínima invasión. La tercera es que, aunque los parámetros de difusión derivados del modelo DT no son consistentes de manera aislada, sí son capaces de reflejar algún tipo de cambio en la compleja microarquitectura de las estructuras de la vía nigroestriatal en la EP. Parámetros derivados de modelos de difusión más precisos, así como la inclusión de indicadores de la respuesta inflamatoria permitirían comprender mejor estos resultados. Finalmente, la cuarta es que sí existe una asociación entre los parámetros de difusión que reflejan anomalías en SB y las acumulaciones anormales de alfa-sinucleína en piel. Estas conclusiones sustentan el uso potencial conjunto de ambos biomarcadores para caracterizar la EP desde etapas tempranas, *in vivo* y con mínima invasión, en beneficio de diagnósticos más tempranos y adecuados.

XI.REFERENCIAS

- Adler, C. H., Dugger, B. N., Hentz, J. G., Hinni, M. L., Lott, D. G., Driver-Dunckley, E., ... Beach, T. G. (2016). Peripheral Synucleinopathy in Early Parkinson's Disease: Submandibular Gland Needle Biopsy Findings. *Movement Disorders*, 31(2), 250-256.
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, 12(10), 366-375.
- Alexander, G. E., & Crutcher, M. D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 266-271.
- Andersson, J. L., Skare, S., & Ashburner, J. (2003). How to correct susceptibility distortions in spin-echo echo-planar images: application to diffusion tensor imaging. *NeuroImage*, 20, 870-888.
- Andersson, J. L., & Sotiropoulos, S. N. (2015). An integrated approach to correction for off-resonance effects and subject movement in diffusion MR imaging. *NeuroImage*, 125, 1063-1078.
- Andica, C., Kamagata, K., Hatano, T., Okuzumi, A., Saito, A., Nakazawa, M., ... Aoki, S. (2018). Neurite orientation dispersion and density imaging of the nigrostriatal pathway in Parkinson's disease: Retrograde degeneration observed by tract-profile analysis. *Parkinsonism and Related Disorders*, 51, 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.02.046>
- Basser, P. J., Mattiello, J., & Le Bihan, D. (1994). MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophysical Journal*, 66(1), 259-267. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80775-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80775-1)
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*, 24, 197-211.
- Burke, R. E., & O'Malley, K. (2013). Axon degeneration in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 246, 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.01.011>
- Calamante, F., Tournier, J. D., Heidemann, R. M., Anwender, A., Jackson, G. D., & Connelly, A. (2011). Track density imaging (TDI): validation of super resolution property. *NeuroImage*, 56(3), 1259-1266.
- Carmona, A., Catalina-Herrera, C. J., & Jiménez-Castellanos, J. (1991). Nigrocaudate and Nigroputaminal Projections. *Acta Anat.*, 141, 145-150
- Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., & Schapira, A. H. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol*, 5(3), 235-245. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(06\)70373-8](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(06)70373-8)
- Concha, L. (2014). A macroscopic view of microstructure: Using diffusion-weighted images to infer damage, repair, and plasticity of white matter. *Neuroscience*, 276, 14-28. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.004>
- Coupé, P., Yger, P., Prima, S., Hellier, P., Kervrann, C., & Barillot, C. (2008). An Optimized

- Blockwise NonLocal Means Denoising Filter for 3-D Magnetic Resonance Images. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 27(4), 425–441.
- DeLong, M. R. (2000). *The Basal Ganglia*. En E. R. Kandel, J. H. Schwartz, & T. M. Jessell (Eds). Principles of Neural Science (pp. 854-868). New York: McGraw-Hill.
- Desikan, R. S., Ségonne, F., Fischl, B., Quinn, B. T., Dickerson, B. C., Blacker, D., ... Killiany, R. J. (2006). An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *NeuroImage*, 31, 968-980.
- Djaldetti, R., Lev, N., & Melamed, E. (2009). Lesions outside the CNS in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 24(6), 793–800. <https://doi.org/10.1002/mds.22172>
- Gili, J. (1993). *Introducción biofísica a la resonancia magnética en neuroimagen*. Barcelona: Editorial Centre Diagnòstic Pedralbes.
- Hagmann, P., Jonasson, L., Maeder, P., Thiran, J. P., Wedeen, V. J., & Meuli, R. (2006). Understanding diffusion MR imaging techniques: from scalar diffusion-weighted imaging to diffusion tensor imaging and beyond. *Radiographics*, 26(1), 205–23. <https://doi.org/10.1148/rg.26si065510>
- Hall, J. M., Ehgoetz Martens, K. A., Walton, C. C., O'Callaghan, C., Keller, P. E., Lewis, S. J. G., & Moustafa, A. A. (2016). Diffusion alterations associated with Parkinson's disease symptomatology: A review of the literature. *Parkinsonism & Related Disorders*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.09.026>
- Harper, L., Newman, E., Hadley, D., & Grosset, D. (2011). Validation of reduced fractional anisotropy measures in the substantia nigra of Parkinsons patients using DAT imaging. *Proc Intl Soc Mag Reson Med*, 19, 1
- Hikishima, K., Ando, K., Yano, R., Kawai, K., Komaki, Y., Inoue, T., ... Okano, H. (2015). Parkinson disease: Diffusion MR imaging to detect nigrostriatal pathway loss in a marmoset model treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Radiology*, 275, 430-437
- Hirata, F. C. C., Sato, J. R., Vieira, G., Lucato, L. T., Leite, C. C., Bor-Seng-Shu, E., ... Cardoso, E. F. (2017). Substantia nigra fractional anisotropy is not a diagnostic biomarker of Parkinson's disease: a diagnostic performance study and meta-analysis. *Eur Radiol*, 27, 2640-2648
- Hontanilla, B., De las Heras, S., & Giménez-Amaya, J. M. (1996). A topographic re-evaluation of the nigrostriatal projections to the caudate nucleus in the cat with multiple retrograde tracers. *Neuroscience*, 72(2), 485-503
- Hospital Sant Joan de Déu. (2014). Enfermedades neurodegenerativas con acúmulo cerebral de hierro. ¿Qué son los ganglios basales? [Figura]. Guía Metabólica. Recuperado de <https://metabolicas.sjdhospitalbarcelona.org/ecm/enfermedades-neurodegenerativas-acumulo-cerebral-hierro-enach/info/ganglios-basales>
- Hughes, A. J., Ben-Shlomo, Y., Daniel, S. E., & Lees, A. J. (1992). What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease. A clinicopathologic study. *Neurology*, 42(6), 1142-1142.
- Jbabdi, S., Sotiropoulos, S. N., Haber, S. N., Van Essen, D. C., & Behrens, T. E. (2015).

- Measuring macroscopic brain connections in vivo. *Nature Neuroscience*, 18, 1546-1555. <https://doi.org/10.1038/nn.4134>
- Jenkinson, M. & Smith, S. M. (2001). A global optimisation method for robust affine registration of brain images. *Medical Image Analysis*, 5(2), 143-156
- Khairnar, A., Ruda-Kucerova, J., Drazanova, E., Szabó, N., Latta, P., Arab, A., ... Rektorova, I. (2016). Late-stage α -synuclein accumulation in TNWT-61 mouse model of Parkinson's disease detected by diffusion kurtosis imaging. *Journal of Neurochemistry*, 136, 1259-1269. <https://doi.org/10.1111/jnc.13500>
- Keuken, M. C., Bazin, P. L., Crown, L., Hootsmans, J., Laufer, A., Müller-Axt, C., ... Forstmann, B. U. (2014). Quantifying inter-individual anatomical variability in the subcortex using 7T structural MRI. *NeuroImage*, 94, 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.03.032>
- Kuhn, M., Johnson, A., & Davis, K. (1988). Wallerian Degeneration: Evaluation with MR Imaging. *Radiology*, 168, 199-202.
- Langston, J. W. (2006). The Parkinson's complex: Parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann Neurol.*, 59(4), 591-596. <https://doi.org/10.1002/ana.20834>
- Lenfeldt, N., Eriksson, J., Aström, B., Forsgren, L., & Jakobson-Mo, S. (2017). Fractional Anisotropy and Mean Diffusion as Measures of Dopaminergic Function in Parkinson's Disease: Challenging Results. *Journal of Parkinson's Disease*, 7, 129-142. <https://doi.org/10.3233/JPD-161011>
- Lenfeldt, N., Larsson, A., Nyberg, L., Birgander, R., & Forsgren, L. (2015). Fractional anisotropy in the substantia nigra in Parkinson's disease: a complex picture. *European Journal of Neurology*, 22, 1408-1414. <https://doi.org/10.1111/ene.12760>
- Liu, L. X., Du, D., Zheng, T., Fang, Y., Chen, Y. S., Yi, H. L., ... Shi, Q. L. (2017). Detecting dopaminergic neuronal degeneration using diffusion tensor imaging in a rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: fractional anisotropy and mean diffusivity values. *Neural Regeneration Research*, 12(9), 1485-1491. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.213559>
- Lynd-Balta, E., & Haber S. N. (1994). The organization of midbrain projections to the striatum in the primate: sensorimotor-related striatum versus ventral striatum. *Neuroscience*, 59(3), 625-640
- Manjón, J. V. & Coupé, P. (2016). volBrain: an online MRI brain volumetry system. *Frontiers in Neuroinformatics*.
- Méndez-Herrera, C. R. (2011). El núcleo subtalámico en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson y su rol como diana quirúrgica. *Rev Chil Neuro-Psiquiat*, 49(1), 62-68.
- Meola, A., Yeh, F. C., Fellows-Mayle, W., Weed, J., Fernández-Miranda, J. C. (2016). Human connectome-based tractographic atlas of the brainstem connections and surgical approaches. *Neurosurgery*, 79, 437-455. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000001224>, PMID: 26914259
- Miki, Y., Tomiyama, M., Ueno, T., Haga, R., Nishijima, H., Suzuki, C., ... Wakabayashi, K. (2010). Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease.

- Neuroscience Letters*, 469(3), 357–359. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.027>
- Moore, R. Y., & Bloom, F. E. (1978). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annu. Rev. Neurosci.* 1, 129–169.
- Nambu, A. (2004). A new dynamic model of the cortico-basal ganglia loop. *Progress in Brain Research*, 143, 461-466.
- Nambu, A., Tokuno, H., & Takada, M. (2002). Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal “hyperdirect” pathway. *Neuroscience Research*, 43(2), 111-117.
- Pierpaoli, C., Barnett, A., Pajevic, S., Chen, R., Penix, L., Virta, A., & Basser, P. (2001). Water Diffusion Changes in Wallerian Degeneration and their Dependence on White Matter Architecture. *NeuroImage*, 13, 1174-1185. <https://doi.org/10.1006/nimg.2001.0765>
- Pyatigorskaya, N., Gallea, C., Garcia-Lorenzo, D., Vidailhet, M., & Lehericy, S. (2014). A review of the use of magnetic resonance imaging in Parkinson’s disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 7(4), 206–20. <https://doi.org/10.1177/1756285613511507>
- Raffelt, D., Tournier, J. D., Rose, S., Ridgway, G. R., Henderson, R., Crozier, S., ... Connelly, A. (2012). Apparent Fibre Density: A novel measure for the analysis of diffusion-weighted magnetic resonance images. *NeuroImage*, 59(4), 3976–3994. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.10.045>
- Recchia, A., Rota, D., Debetto, P., Peroni, D., Guidolin, D., Negro, A., ... Giusti, P. (2008). Generation of a α -synuclein-based rat model of Parkinson’s disease. *Neurobiology of Disease*, 30(1), 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.11.002>
- Rivera, D. M., Puentes, S., & Caballero, L. (2011). Resonancia magnética cerebral: secuencias básicas e interpretación. *Universit as M dica*, 52(3), 292–306.
- Rodr guez-Leyva, I., Calder n-Garcidue as, A. L., Jim nez-Capdeville, M. E., Renter a-Palomo, A. A., Hernandez-Rodr guez, H. G., Vald s-Rodr guez, R., ... Castanedo-C zares, J. P. (2014). α -Synuclein inclusions in the skin of Parkinson’s disease and parkinsonism. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(7), 471–8. <https://doi.org/10.1002/acn3.78>
- Scherfler, C., Esterhammer, R., Nocker, M., Mahlknecht, P., Stockner, H., Warwitz, B., ... Seppi, K. (2013). Correlation of dopaminergic terminal dysfunction and microstructural abnormalities of the basal ganglia and the olfactory tract in Parkinson’s disease. *Brain*, 136, 3028-3037
- Schuff, N., Wu, I. W., Buckley, S., Foster, E. D., Coffey, C. S., Gitelman, D. R., ... Marek, K. (2015). Diffusion imaging of nigral alterations in early Parkinson’s disease with dopaminergic deficits. *Mov Disord*, 30, 1885-1892
- Sharma, K. R., Sheriff, S., Maudsley, A., & Govind, V. (2013). Diffusion Tensor Imaging of Basal Ganglia and Thalamus in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuroimaging*, 23(3), 368-374. <https://doi.org/10.1111/j.1552-6569.2011.00679.x>
- Skare, S., & Bammer, R. (2010). Jacobian weighting of distortion corrected EPI data. *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 5063.

- Smith, S. M. (2002). Fast robust automated brain extraction. *Human Brain Mapping*, 17(3), 143-155.
- Smith, S. M., Jenkinson, M., Woolrich, M. W., Beckmann, C. F., Behrens, T. E., Johansen-Berg, H., ... Matthews, P. M. (2004). Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *NeuroImage*, 23, S208-S219.
- Smith, Y., & Kieval, J. Z. (2000). Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *TINS*, 23(10), S28-S33
- Spinelli, K. J., Taylor, J. K., Osterberg, V. R., Churchill, M. J., Pollock, E., Moore, C., Meshul, C. K., & Unni, V. K. (2014). Presynaptic Alpha-Synuclein Aggregation in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 34(6), 2037-2050.
- Stefanis, L. (2012). alpha-Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2), 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>
- Sterling, N. W., Du, G., Lewis, M. M., Swavely, S., Kong, L., Styner, M., & Huang, X. (2017). Cortical gray and subcortical white matter associations in Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 49, 100-108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.09.015>
- Sterling, N. W., Lewis, M. M., Du, G., & Huang, X. (2016). Structural imaging and Parkinson's disease: Moving toward quantitative markers of disease progression. *Journal of Parkinson's Disease*, 6(3), 557–567. <https://doi.org/10.3233/JPD-160824>
- Tan, W. Q., Yeoh, C. S., Rumpel, H., Nadkarni, N., Lye, W. K., Tan, E. K., & Chan, L. L. (2015). Deterministic Tractography of the Nigrostriatal-Nigropallidal Pathway in Parkinson's Disease. *Sci. Rep.*, 5(17283), 1-6. <https://doi.org/10.1038/srep17283>
- Theisen, F., Leda, R., Pozorski, V., Oh, J. M., Adluru, N., Wong, R., ... Gallagher, C. L. (2017). Evaluation of striatonigral connectivity using probabilistic tractography in Parkinson's disease. *NeuroImage: Clinical*, 16, 557-563. <http://doi.org/10.1016/j.nicl.2017.09.009>
- Tournier, J. D., Calamante, F., & Connelly, A. (2007). Robust determination of the fibre orientation distribution in diffusion MRI: Non-negativity constrained super-resolved spherical deconvolution. *NeuroImage*, 35(4), 1459–1472. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.02.016>
- Tournier, J. D., Calamante, F., & Connelly, A. (2012). MRtrix: diffusion tractography in crossing fibre regions. *Int J Imag Sys Tech.*, 22, 53–66.
- Tournier, J. D., Calamante, F., Connelly, A., Yeh, C. H., Calamante, F., Cho, K. H., ... Connelly, A. (2004). Direct estimation of the fiber orientation density function from diffusion-weighted MRI data using spherical deconvolution. *NeuroImage*, 23(3), 1459–1472. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.05.002>
- Tournier, J. D., Yeh, C. H., Calamante, F., Cho, K. H., Connelly, A., & Lin, C. P. (2008). Resolving crossing fibres using constrained spherical deconvolution: Validation using diffusion-weighted imaging phantom data. *NeuroImage*, 42(2), 617–625. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.05.002>
- Urriola, Y. J., & Wenger C, R. (2013). Más allá del tensor de difusión: Experiencia preliminar

en Tractografía HARDI-CSD y Super-Resolución en 1.5T. *Revista Chilena de Radiología*, 19(4), 166–173. <https://doi.org/10.4067/S0717-93082013000400005>

- Vaillancourt, D. E., Prodoehl, J., Abraham, I., Corcos, D. M., Zhou, X. J., Cornelia, C. L., & Little, D. M. (2009). High-resolution diffusion tensor imaging in the substantia nigra of de novo Parkinson disease. *Neurology*, 72(16), 1378–1384. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000340982.01727.6e>
- Van Camp, N., Blockx, I., Verhoye, M., Casteels, C., Coun, F., Leemans, A., ... Van der Linden, A. (2009). Diffusion tensor imaging in a rat model of Parkinson's disease after lesioning of the nigrostriatal tract. *NMR Biomed*, 22, 697-706
- Vila, M., Jackson-Lewis, V., Guegan, C., Wu, D. C., Teismann, P., Choi, D. K., Tieu, K., & Przedborski, S. (2001). The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, 14, 483-489
- Wakabayashi, K., Tanju, K. & Mori, F. (2009). Pathology of basal ganglia in neurodegenerative diseases. *Brain Nerve*, 61, 429–439.
- Yamada, K., Patel, U., Shrier, D. A., Tanaka, H., Chang, J. K., & Numaguchi, Y. (1998). MR Imaging of CNS Tractopathy: Wallerian and Transneuronal Degeneration. *AJR*, 171, 171-813.
- Zhang, H., Schneider, T., Wheeler-Kingshott, C. A., & Alexander, D. C. (2012). NODDI: Practical in vivo neurite orientation dispersion and density imaging of the human brain. *NeuroImage*, 61, 1000-1016. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.03.072>
- Zhang, Y., Wu, I. W., Buckley, S., Coffey, C. S., Foster, E., Mendick, S., Seibyl, J., Schuff, N. (2015). Diffusion Tensor Imaging of the Nigrostriatal Fibers in Parkinson's Disease. *Mov. Disord.*, 30(9), 1229–1236. <https://doi.org/10.1002/mds.26251>
- Zhang, Y., Larcher, K. M. H., Misic, B., & Dagher, A. (2017). Anatomical and functional organization of the human substantia nigra and its connections. *eLife*, 6, 1-23. <https://doi.org/10.7554/eLife.26653>
- Zhang, Z., Kang, S. S., Liu, X., Ahn, E. H., Zhang, Z., He, L., ... Ye, K. (2017). Asparagine endopeptidase cleaves α -synuclein and mediates pathologic activities in Parkinson's disease. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(8), 632-642. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3433>