



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LA DEGENERACIÓN AXONAL EN QUIASMA ÓPTICO EN UN MODELO
POR ISQUEMIA RETINIANA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

OMAR NARVAEZ DELGADO

TUTOR

DR. JORGE ANTONIO LARRIVA SAHD, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR

DR. LUIS CONCHA LOYOLA, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DRA. MARÍA ROSA ÁVILA COSTA, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE IZTACALA,
UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE, 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.

Este proyecto fue realizado en el laboratorio de Conectividad Cerebral (C-13) y Neuromorfología (A-01) y en el Laboratorio de Imagenología por Resonancia magnética (LANIREM) del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Supervisado por el Dr. Luis Concha Loyola y el Dr. Jorge Larriva Sahd y con el apoyo de los proyectos; UNAM-DGAPA (IG200117), CONACyT (FC 1782).

Agradecimientos

A la UNAM, por la formación académica que me ha otorgado por tantos años y particularmente al Instituto de Neurobiología por el acercamiento a la investigación científica.

Al apoyo por parte de CONACyT (629831 número de becario) y a las facilidades del Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (Conacyt, UNAM, CIMAT, UAQ).

A Luis por toda la atención, conocimiento, apoyo y orientación para el desarrollo de este proyecto y mi formación en la ciencia. Agradezco mucho porque no solo me enseñaste a hacer mejor investigación, sino también a ser una mejor persona.

Al Dr. Jorge Larriva Sahd, a la Dra. María Rosa Ávila Costa y a Ricardo Coronado por todas sus aportaciones en la realización de este proyecto. De igual manera, agradezco a los sinodales; Dr. Rogelio Arellano Ostoia, Dra. Stephanie Colette Thebault y Dr. Gerardo Rojas Piloni por sus sugerencias en la revisión y evaluación del presente trabajo.

A las personas que me instruyeron en todo momento y han aportado a este proyecto; Gema Martínez, Nydia Hernández, Juan Ortiz. Así como también las facilidades otorgadas por parte de Alejandra Castilla y Martin García del bioterio del Instituto.

Agradezco a toda mi familia por todo su cariño y apoyo, y en especial a ustedes, Leticia, Emilio, Citlalli y Sergio, quienes siempre me han apoyado en todo momento en las decisiones académicas y de vida.

Al laboratorio C-13, Marcos y Renata, por el conocimiento y buenos momentos durante estos dos años, y en especial a Kandel's crew de quienes también aprendí mucho pero además hicieron que esta etapa fuera mucho más divertida.

A Lau, Ana, Poncho y Jona por el apoyo y aprendizaje, pero lo que más valoro, su amistad.

A Bet, por el apoyo y motivación que siempre me das para sacar energía extra, por todos esos minutos escuchando música juntos para despejar la mente. Gracias por todo, ¿A quién? A ti.

i.- ÍNDICE

1- INTRODUCCIÓN

2- ANTECEDENTES

2.1 SISTEMA NERVIOSO Y MATERIA BLANCA

2.1.1 Estructura de la vía visual

2.2 DEGENERACIÓN WALLERIANA

2.2.1 Alteraciones celulares de la degeneración Walleriana

2.3 RESONANCIA MAGNÉTICA

2.3.1 Imágenes sensibles a difusión

2.3.1.1 Modelo del tensor

2.3.1.2 Deconvolución esférica restringida

2.3.1.3 Método de búsqueda discreta de resolución múltiple

(MRDS)

2.4 ISQUEMIA RETINIANA

3- JUSTIFICACIÓN

4-HIPÓTESIS

5- OBJETIVO

6- SUJETOS

7-MÉTODOS

7.1 INDUCCIÓN DE ISQUEMIA RETINIANA

7.2 FIJACIÓN Y EXTRACCIÓN DEL TEJIDO

7.3 HISTOLOGÍA

7.3.1 Proceso histológico

7.3.2 Adquisición de fotomicrografías y análisis

7.3.3 Parámetros derivados de la segmentación automática con AxonSeg

7.4 ADQUISICIÓN DE IMÁGENES SENSIBLES A DIFUSIÓN

7.4.1 Preprocesamiento y análisis de las imágenes sensibles a difusión

7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

8-RESULTADOS

8.1 HISTOLOGÍA

8.2 RESONANCIA MAGNÉTICA EX VIVO

8.3 RESONANCIA MAGNÉTICA E HISTOLOGÍA

9-DISCUSIÓN

10-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ii.-ÍNDICE DE FIGURAS

iii.-ANEXOS

1-INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso, a lo largo de la historia, ha sido estudiado mediante distintas ópticas y métodos para comprender procesos fisiológicos y patológicos. La degeneración axonal es un fenómeno histopatológico común de enfermedades neurodegenerativas. En algunas de estas enfermedades, como esclerosis lateral amiotrófica, Alzheimer, Parkinson, Huntington y glaucoma, se presenta degeneración axonal incluso antes que haya daño patente en los cuerpos neuronales (Conforti, Gilley, & Coleman, 2014).

La forma más común de degeneración axonal es la de tipo Walleriana, esta ocurre cuando hay un daño neuronal, ocasionando así una degeneración en las porciones distales a la lesión primaria. El proceso degenerativo consta de dos fases, una aguda y una crónica. Principalmente durante la primera ocurre la edematización y fragmentación de axones, lo cual puede derivar a un estadio crónico caracterizado por una degradación progresiva, con la consecuente fagocitosis de las capas de mielina por las células gliales (Beaulieu, Does, Snyder, & Allen, 1996; Beirowski et al., 2005; Concha, Gross, Wheatley, & Beaulieu, 2006; George & Griffin, 1994; Pavelka & Roth, 2015).

En algunas ocasiones es difícil observar en un nivel macroscópico cambios significativos después de una lesión o patología, por lo cual se han desarrollado diversas técnicas no invasivas que permitan inferir tanto las dimensiones como la macro y microestructura. Una de ellas es la resonancia magnética, y particularmente las imágenes sensibles a difusión han permitido analizar la microestructura posterior a una lesión mediante la interpretación de modelos matemáticos (Beaulieu, 2002; Concha, Livy, Beaulieu, Wheatley, & Gross, 2010). Los métodos basados en imágenes sensibles a difusión utilizan la información de la difusión de las moléculas de agua para permitir inferencias sobre la micro-arquitectura del tejido. La señal de estas imágenes es compleja, y habitualmente se simplifica utilizando modelos matemáticos. El modelo del tensor propuesto por Basser y colaboradores en 1994, permite analizar el daño por medio de parámetros de difusión en fibras con una sola orientación y los cuales se pueden ver alterados en función del tiempo de evolución a la región de la lesión primaria (Concha et al., 2006; Liu, Gross, Wheatley, Concha, & Beaulieu, 2013). Sin embargo, más de dos terceras partes de la materia blanca en sistema nervioso presenta cruces de fibras, por

lo que el modelo del tensor no es adecuado en estas regiones (Concha, 2014; Jeurissen, Leemans, Tournier, Jones, & Sijbers, 2013). Es por ello que se han desarrollado nuevos modelos analíticos, los cuales han otorgado una mejor información de la orientación y distribución de las fibras (Tournier, Calamante, Gadian, & Connelly, 2004; Tournier, Mori, & Leemans, 2011).

Existe poca evidencia de una correspondencia biológica con estas nuevas propuestas analíticas. En un estudio reciente, Rojas-Vite y colaboradores demostraron la alteración de parámetros de difusión *ex vivo* con los modelos CSD, multi-tensor MRDS (*Multi-resolution Discrete Search*) y DIAMOND (*Distribution of Anisotropic Microstructural Environments in DWI*) en quiasma óptico en un modelo murino sometido a isquemia retiniana con una correspondencia del tejido por medio de segmentación axonal a 5 semanas posterior a la lesión (Adachi, Takahashi, Nishikawa, Miki, & Uyama, 1996; Rojas-Vite et al., 2019). Sin embargo, es necesario evaluar la sensibilidad de estos modelos para la detección y caracterización de los eventos que suceden a lo largo del proceso de degeneración axonal. El objetivo de este trabajo es evaluar mediante imágenes sensibles a difusión por resonancia magnética en distintos intervalos la sensibilidad de modelos de análisis en regiones de cruces de fibras y su correlación histológica cuantitativa *ex vivo* de la degeneración axonal en el modelo del quiasma óptico con isquemia retiniana. Al igual que en el trabajo de Rojas-Vite y colaboradores, en este trabajo aprovechamos el arreglo de los axones en la vía visual, particularmente su decusación a nivel del quiasma, de manera que se dispone de segmentos con una sola población axonal (nervio óptico) y una región de cruce de axones (quiasma).

2- ANTECEDENTES

2.1 SISTEMA NERVIOSO Y SUSTANCIA BLANCA

El sistema nervioso central (SNC) se encuentra principalmente conformado por neuronas y células gliales. En mamíferos, las primeras se encuentran en un 10 % y el 90 % restante son gliales. La morfología básica de una neurona consta de un soma, un axón y un número variable de dendritas (figura 1). En el soma neuronal se encuentran distintos organelos como son: mitocondrias, microtúbulos, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, entre otros. Estos se encuentran inmersos en citoplasma o líquido intracelular y rodeados por una bicapa lipídica semipermeable que los separa del líquido extra-celular. El correcto funcionamiento entre los componentes y su ambiente, permite mantener la organización de la microarquitectura del tejido (Edgar & Griffiths, 2014).

Otros elementos celulares son los oligodendrocitos, que principalmente recubren la longitud de los axones con una capa de lípidos y proteínas denominada mielina. Un solo oligodendrocito puede elaborar 60 capas de mielina y las cuales pueden rodear los axones hasta 160 veces (Edgar & Griffiths, 2014; Hildebrand, Remahl, Persson, & Bjartmar, 1993). La capa de mielina no es continua, sino que se encuentra separada en secciones por áreas desprovistas de mielina llamadas nodos de Ranvier. La alternancia de zonas con alta y baja impedancia iónica favorece una conducción eléctrica saltatoria del impulso nervioso, es decir, más rápida que en los axones no mielinizados (Edgar & Griffiths, 2014).

Entre estos componentes existe una estrecha relación, por ejemplo; los axones influyen en la diferenciación de oligodendrocitos, la actividad eléctrica axonal promueve la mielinización, las dimensiones de la mielina están reguladas por señales axonales, los oligodendrocitos proveen del mantenimiento de axones, entre otros (Charles et al., 2000; Edgar & Griffiths, 2014; Fanarraga, Griffiths, Zhao, & Duncan, 1998).

El SNC está principalmente dividido en sustancia blanca y gris. La sustancia blanca constituye los tractos en los cuales los axones se extienden de una región a otra en el SNC, y la sustancia gris está compuesta por los somas de las neuronas, células gliales, dendritas y abundantes capilares hemáticos. La mayor densidad de éstos condiciona el

color grisáceo que se observa en ciertas áreas de especímenes de tejido no fijado. En humano la sustancia blanca comprende alrededor del 40 % del tejido, y algunos ejemplos de los fascículos son: el cuerpo calloso, fimbria, tracto corticoespinal y nervio óptico, por mencionar algunos. En su mayoría tienen una dirección predominante como lo es el nervio óptico, el cual se extiende desde las células ganglionares de la retina en el ojo hasta diferentes regiones cerebrales conformando la vía visual (Edgar & Griffiths, 2014; Hildebrand et al., 1993).

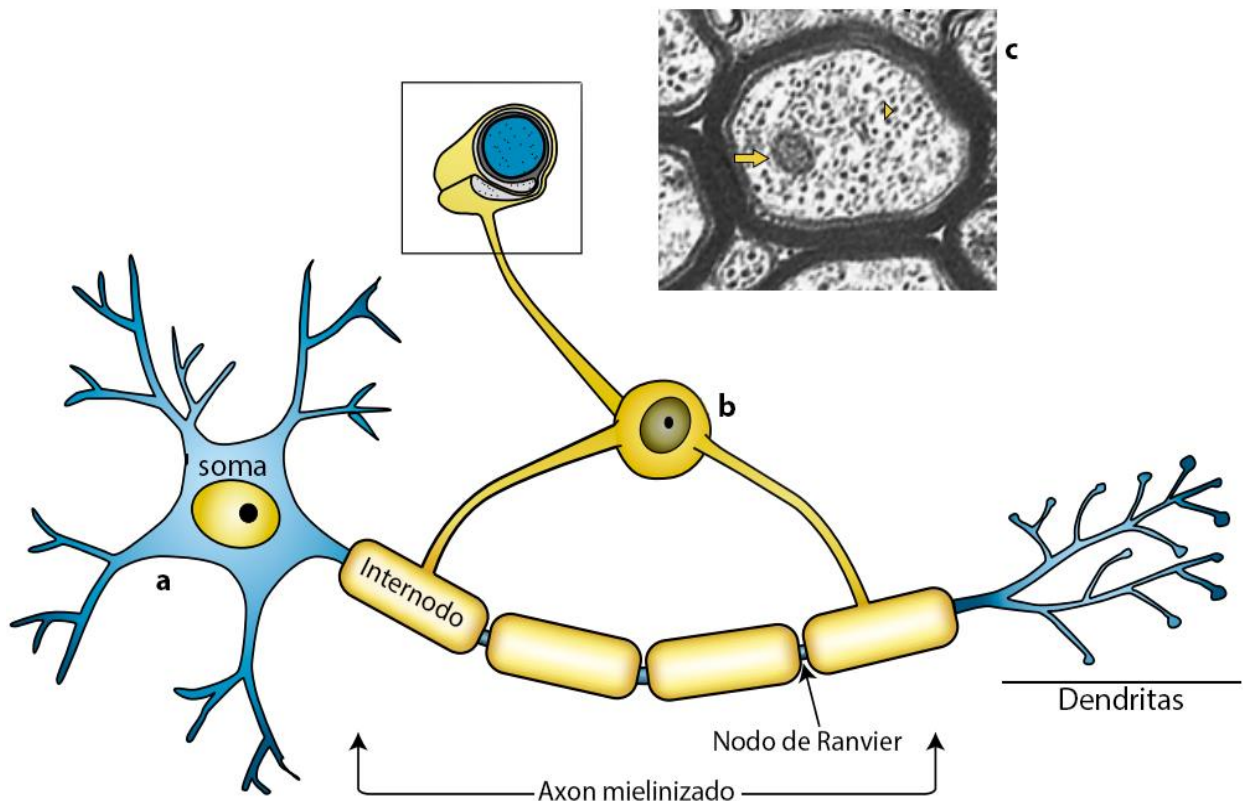


Figura 1. Esquema de neurona y oligodendrocito. En “a” se esquematiza una neurona señalando sus diferentes regiones; soma, axón y dendritas. En “b” se observa un oligodendrocito, el cual sintetiza la mielina que recubre la longitud del axón, esto lo hace en distintos puntos dejando un espacio (nodo de Ranvier) entre cada uno de los oligodendrocitos. En “c” se muestra una micrografía electrónica (ME) de un corte perpendicular al eje mayor de un axón. La flecha amarilla indica una mitocondria en el citoplasma axonal, la cabeza de flecha señala microfilamentos. El axón se encuentra

rodeado por capas de mielina que se observan como las regiones más oscuras en esta micrografía. Tomada y modificada de (Edgar & Griffiths, 2014).

2.1.1 Estructura de la vía visual

La vía visual se encuentra regionalizada y contiene una serie de elementos celulares que permiten las distintas funciones durante la visión. El comienzo de esta vía ocurre por medio de la captación de luz en la córnea, continúa por la pupila y cristalino (figura 2, a), posteriormente sigue por el humor vítreo hasta incidir en la retina, la cual posee cinco tipos neuronales que, entre otros, establecen conexión entre ellas. Se definen 10 capas anatómicas en la retina, en las cuales se encuentran las neuronas fotorreceptoras (conos y bastones), las células bipolares, horizontales, amacrinas y células ganglionares (GC) (figura 2, b). En humano hay aproximadamente siete capas de los cuerpos de las CG en la parte central (60-80 μm) y en la periferia es menor incluso llegando a ser solo de una capa (10-20 μm) (Forrester, McMenamin, Dick, & Pearlman, 2016).

Los axones de las CG convergen en el disco óptico (punto ciego) en la cual no hay fotorreceptores (Forrester, McMenamin, Dick, & Pearlman, 2016). Los axones de las CG forman el nervio óptico y, cada uno de ellos está recubierto por una vaina mielina. El nervio óptico está organizado en pequeños grupos de axones o fascículos divididos por tejido conectivo y glía; en su porción externa el nervio óptico está rodeado por líquido cefalorraquídeo. En el humano, el nervio óptico proyecta centralmente penetrando en la cavidad craneana, y posteriormente, forma el quiasma óptico en el piso del tercer ventrículo. El quiasma óptico se origina por la decusación de alrededor de 50 % de las fibras provenientes del ojo contralateral y el otro 50 % permanece ipsilateral (figura 2, c) (Forrester et al., 2016). A diferencia de esto, el quiasma óptico de la rata decusa más del 90 % de las fibras y el resto se mantiene ipsilateral (Forrester et al., 2016; Jeffery & Erskine, 2005).

Posteriormente el quiasma continúa con los tractos ópticos que rodean los pedúnculos cerebrales de la porción rostral del mesencéfalo; al penetrar las fibras se dividen en fascículos que en su mayoría proyectan al núcleo geniculado lateral (NGL); alrededor de un 10 % restante conecta con el área pretectal y con los colículos superiores (Forrester et al., 2016). Del NGL emergen unos tractos llamados “radiaciones ópticas” que terminan

en la corteza visual, la cual integra los impulsos procedentes de las diferentes áreas de la retina de ambos ojos y procesa la información visual recibida (Forrester et al., 2016).

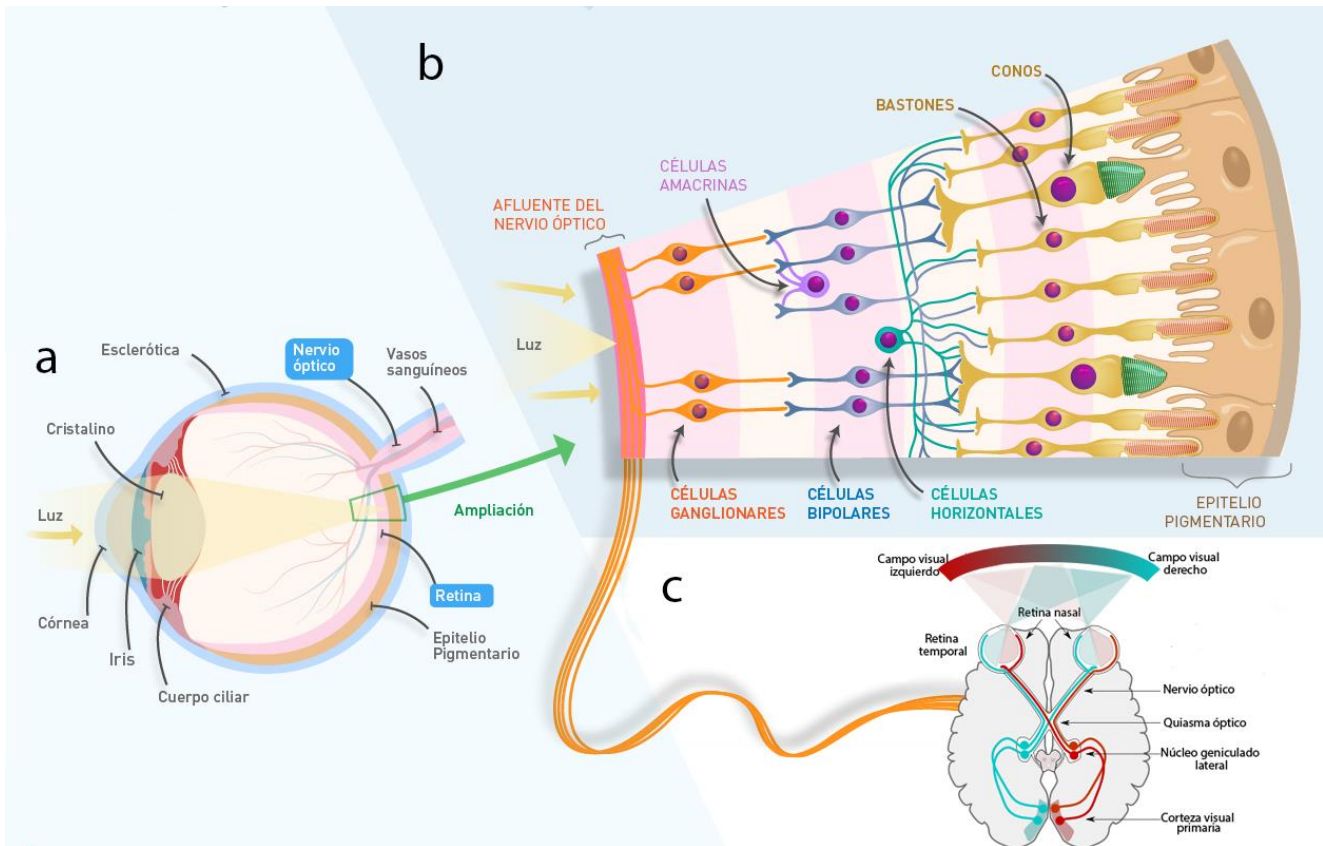


Figura 2. Regiones y componentes celulares de la vía visual. En “a” se observa el globo ocular señalando diversas partes en las que destaca la retina. En “b” se esquematiza la ampliación de la retina con los tipos celulares que la componen. En “c” se muestra la vista general del trayecto de los axones provenientes de las células ganglionares retinianas hasta la corteza visual primaria. Ilustración modificada de Jeremías di Pietro – CCT CONICET Córdoba.

2.2 DEGENERACIÓN WALLERIANA

La degeneración Walleriana se define como el proceso subsecuente a una lesión neuronal, generando así una degeneración distal al daño. La degeneración distal se caracteriza por desintegración granular del citoesqueleto y presencia de ovoides de mielina (Concha *et al.*, 2006; Conforti *et al.*, 2014; Perry, 2005). El proceso de

degeneración ocurre en dos fases. La fase aguda sucede en las primeras 24-48 h posterior a la lesión precipitante, mientras que la fase crónica puede durar varios meses (Waller, 1850). Algunas de las primeras descripciones de este último con un seguimiento longitudinal se encuentran en el trabajo de Williams y Hall de 1971, quienes realizaron una lesión en el nervio ciático de ratas y observaron la progresión del daño en las fibras anteriores tibiales diariamente durante 20 días, y después cada 5 días hasta los 60 días post lesión (Williams & Hall, 1971). Este tipo de estudios describen la fragmentación en los primeros días, seguido de la infiltración de macrófagos y degradación de la mielina en semanas y como evento final, fibrosis y atrofia de los tractos (Thomalla & Glauche, 2005; Williams & Hall, 1971).

Algunas aproximaciones para el estudio de la microarquitectura durante la degeneración Walleriana involucran el uso de técnicas de inmunohistoquímica para la identificación de neurofilamentos o mielina. En 2012 Qin y colaboradores estudiaron el tracto cortico espinal de gatos en diferentes etapas de sobrevivencia después de la lesión, observando degeneración axonal a partir del segundo día caracterizada por edema y desintegración axonal. Al sexto día, hubo un incremento de vacuolas y de axones edematizados. Otro elemento que puede ser visualizado en esta etapa son los axones degradados a manera de fragmentos densos. Estos últimos son más frecuentes en especímenes obtenidos 10 días posteriores al daño y persisten en los estadios crónicos (*i.e.* 20, 30, 45, 60 días) (figura 3, a) (Qin et al., 2012).

Los estudios realizados en nervio óptico confirman los resultados obtenidos en tractos centrales (Sun y cols 2008). Después de provocar la lesión de la vía óptica, se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica a diferentes lapsos después de la lesión; los especímenes procesados para visualizar neurofilamentos mostraron un decremento significativo con la tinción de neurofilamentos fosforilados (NF) a los tres días de la lesión con respecto a los controles, sin embargo no observaron diferencias en esta etapa temprana de la lesión sino en una fase crónica mediante la tinción para mielina (PBM) (figura 3, b) (Sun, Liang, Cross, & Song, 2008).

En breve puede concluirse que durante el proceso de degeneración axonal postraumática la integridad axonal se ve progresivamente alterada. En la micrografía

superior del panel “c” de la figura 3 se observan axones por medio de microscopia electrónica (Qin et al., 2012). En el animal intacto la mielina es compacta, los organelos y el espacio intra-axonal son de características normales, a diferencia de la micrografía inferior en la que particularmente se puede observar la mielina laxa, lo cual resulta del proceso de infiltración de material externo. Las mitocondrias están tumefactas y reducidas en número y la densidad axonal ha disminuido considerablemente.

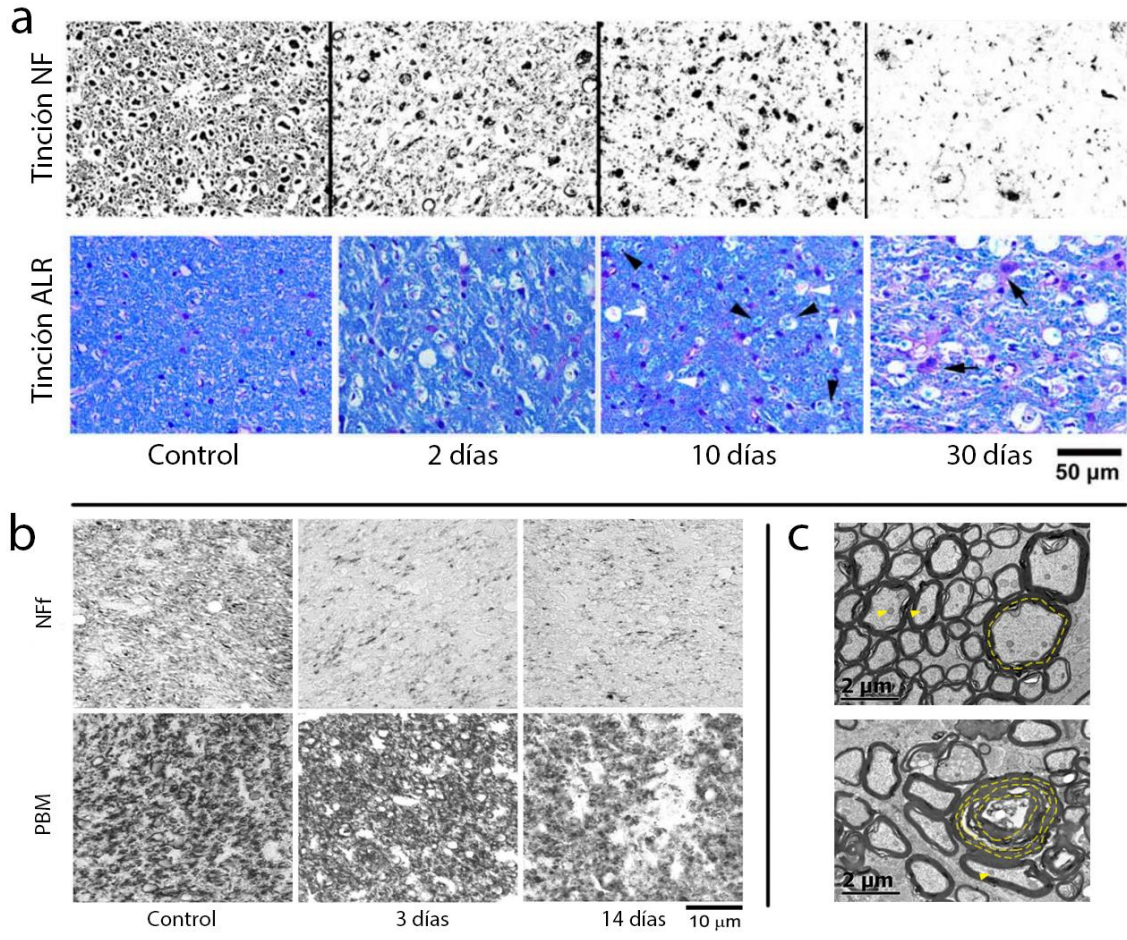


Figura 3. Histopatología de la degeneración Walleriana aguda y crónica. En el panel “a” se observan dos tinciones en el tracto cortico-espinal de gato. En la inmunohistoquímica de NF se puede observar una reducción a partir de los 2 días post lesión con una progresiva pérdida en el día 30 después del daño. La tinción de azul de luxol rápido (ALR) tiñe las capas de mielina en con azul y cuerpos celulares con morado y se muestra una alta densidad de mielina en el grupo control la cual se ve reducida a los dos días posteriores a la lesión. Al día 30 post lesión ésta ha disminuido considerablemente

exponiendo la microglía. Las cabezas de flechas blancas indican la microglía activada que presumiblemente fagocitó restos axonales y las cabezas de flechas negras la microglía con restos de mielina. En el panel “b” se observan dos tinciones en nervio óptico de rata, en la parte superior es tinción de NF y en la parte inferior con proteína básica de mielina. Los cambios en NF son observados a partir de los 3 días post lesión y continua de manera similar para los 14 días, a diferencia de la proteína básica de mielina que no se observan diferencias evidentes en el día 3 post lesión sino hasta los 14 días. En el panel “c” se muestran dos micrografías de microscopia electrónica, en la imagen superior se observan axones de diversos diámetros con mielina compacta a diferencia de la imagen inferior que presenta mielina degenerada. En ambas micrografías las flechas amarillas indican mitocondrias en el espacio intra-axonal y las líneas punteadas amarillas indica la mielina. Tomado y modificado de (Qin *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2008).

2.2.1 Alteraciones celulares de la degeneración Walleriana

En los estadios iniciales post lesión existe una acumulación progresiva de los organelos intracelulares del área proximal al daño. Un segundo estadio es la disolución del citoesqueleto de manera granular volviendo así al axoplasma en una representación amorfa (Perry, 2005). La duración de los estadios varía entre especies, la longitud de los axones dañados, la temperatura, la función (sensorial o motor) y su localización (*i.e.* en SN periférico o en SNC); estos mismos factores inciden en la velocidad de avance de la degeneración (Perry, 2005). En el nervio olfatorio del pez aguja, se ha establecido que la degeneración es mucho más lenta en comparación con lo que ocurre en los mamíferos (Perry, 2005). Por otra parte, estudios realizados en nervio frénico de rata y proyecciones de la raíz dorsal de neuronas ganglionares sensoriales han descrito velocidades de extensión del proceso degenerativo de aproximadamente 3 mm/hr (George & Griffin, 1994; Perry, 2005).

A partir de las primeras descripciones de la degeneración Walleriana y una subsecuente idea sobre el cuerpo celular como generador de proteínas y otras moléculas para la subsistencia del resto de la célula, surgieron hipótesis planteando que la ausencia de estos materiales generaría la disrupción axonal distal característica (Perry, 2005). Sin embargo, se ha descrito una degeneración lenta en una cepa de ratón (C57B1/Ola)

llamada ahora *Wlds* (Tsao, Brown, Carden, McLean, & Perry, 1994). Una lesión en una cepa común resulta en la pérdida de la conductividad eléctrica en la porción distal dentro de un día o dos; a diferencia de esto, la cepa *Wlds* continua con la conductividad eléctrica hasta por 2 semanas. El retraso observado permitió sugerir que la degeneración Walleriana es un proceso activo que requiere la presencia y activación de una vía celular que regule la disgregación del axoplasma (Perry, 2005; Tsao, Brown, Carden, McLean, & Perry, 1994)

Durante el proceso degenerativo se ha observado que el flujo de calcio posterior al periodo de retraso, juega un papel relevante, ya que activa las calpainas que favorecen la degradación granular del axoplasma, por lo que el bloqueo los canales de calcio provoca un retraso en la degradación del citoesqueleto (Mata, Staple, & Fink, 1986; Schlaepfer & Hasler, 1979; George, Glass, Griffin, 1995). Bajo estos resultados surgieron más preguntas relacionadas al flujo del calcio y en 2003 Ouardouz y colaboradores mostraron que la isquemia de la columna dorsal resulta en un incremento en el calcio intra-axonal, incluso sin calcio extracelular, mostrando así que, en los estadios iniciales de la degeneración axonal, el aumento del calcio intracelular alrededor de los perfiles del retículo endoplásmico intra-axonales, condiciona la degradación de neurofilamentos (Ouardouz *et al.*, 2003; Perry, 2005).

2.3 RESONANCIA MAGNÉTICA

2.3.1 Imágenes sensibles a difusión

Las imágenes sensibles a difusión permiten la inferencia de la microestructura. El principio en el que esta técnica está basada es en el movimiento de la auto-difusión del agua ya que naturalmente tiene un movimiento azaroso dependiente de la temperatura, descrito por primera vez por Robert Brown en 1828, por lo que se le llama movimiento Browniano. Posteriormente Einstein resolvió estas observaciones de una manera matemática:

$$D = \frac{\Delta r^2}{2n\Delta t}$$

Esta ecuación establece que el coeficiente de difusión, D (mm^2/s), es proporcional a la media del desplazamiento al cuadrado, (Δr^2) dividido por el número de dimensiones, n , y el tiempo de difusión (Δt) (Alexander, Lee, Lazar, & Field, 2007; Einstein, 1905; Robert, 1828).

Los factores que inciden sobre la difusión del agua o también conocida como auto-difusión (ya que las moléculas del soluto y solvente son las mismas) son el peso molecular, interacciones intermoleculares y la temperatura (Beaulieu, 2002). A una difusión sin restricción al movimiento se le conoce como isotrópica (igual para todas las direcciones) y es fácilmente observado en líquido cefalorraquídeo, pero cuando este movimiento se ve restringido por alguna barrera y hay una dirección definida por dicha restricción, se conoce como difusión anisotrópica (figura 4) (Beaulieu, 2002).

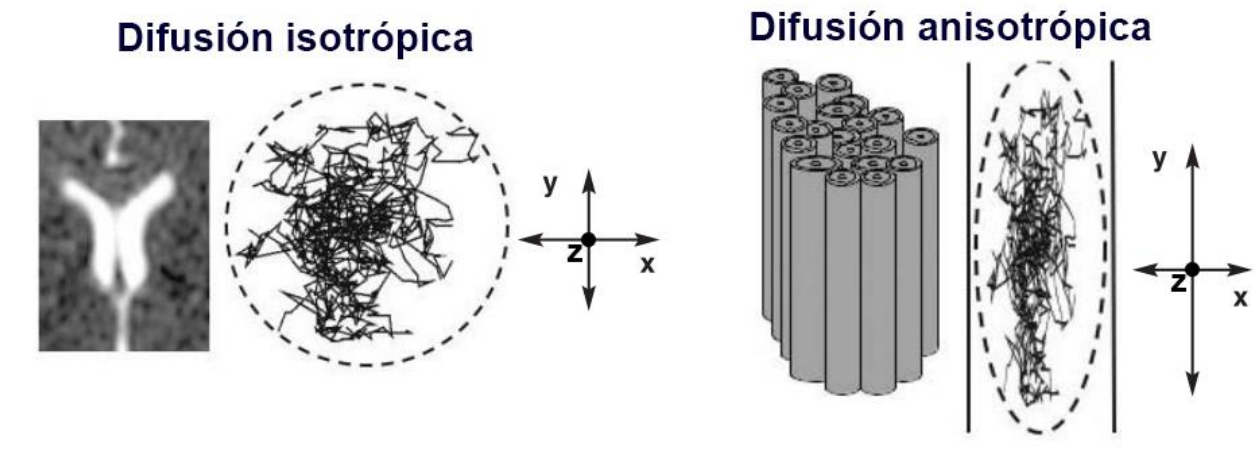


Figura 4. Movimiento del agua isotrópico y anisotrópico. En el lado izquierdo se observa los ventrículos con líquido cefalorraquídeo, en el cual la difusión del agua es isotrópica y es esquematizada con una esfera en la cual las líneas representan el movimiento de las moléculas de agua en todas direcciones. En el lado derecho se esquematiza una población de fibras, la cual tiene una dirección preferente y las moléculas de agua en la imagen contigua corresponden a esa dirección en el eje y . Tomada y modificada de (Rosenbloom, Sullivan, & Pfefferbaum, 2003).

El D del agua a 37°C es alrededor de $3.04 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$. En el sistema nervioso las barreras intra y extracelulares que son impuestas al movimiento libre del agua pueden ser las membranas celulares, capas de mielina, citoesqueleto, fibras adyacentes, organelos, pero principalmente quienes influyen directamente sobre la anisotropía son las membranas celulares y de una manera moduladora las capas de mielina (Beaulieu, 2002; Concha, 2008; Gulani, Webb, Duncan, & Lauterbur, 2001). Estudios tanto en SNC como en periférico han demostrado una alteración en la difusión paralela (axial) y perpendicular (radial) en casos de degeneración Walleriana en regiones de sustancia blanca sin cruces de fibras, como el cuerpo caloso o el fórnix (Concha *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2013).

La manera en que es aprovechada esta propiedad del agua en resonancia magnética fue descrita por primera vez por Hahn en 1950 (Hahn, 1950) al presentar el eco de spin y cada vez el coeficiente de difusión (D) tomó mayor relevancia, hasta los trabajos de Stejskal y Tanner en 1965, en el cual proponen una manera facilitada de cuantificar estos coeficientes con el uso de la secuencia de pulsos de gradiente con eco spin (PGSE) (Stejskal & Tanner, 1965).

La secuencia para adquisición de imágenes sensibles a difusión (figura 5) se basa en codificar la posición espacial de las moléculas de agua a $t = 0$. Posteriormente, invertir la fase de spin con un pulso (π) y decodificar la posición después del tiempo (τ). El uso de los gradientes magnéticos durante esta secuencia es para la codificación y recodificación de la posición de los *spins*, dependientes de la amplitud G , duración (δ) y la separación de tiempo (Δ) de los gradientes sensibilizadores de difusión (Stejskal & Tanner, 1965).

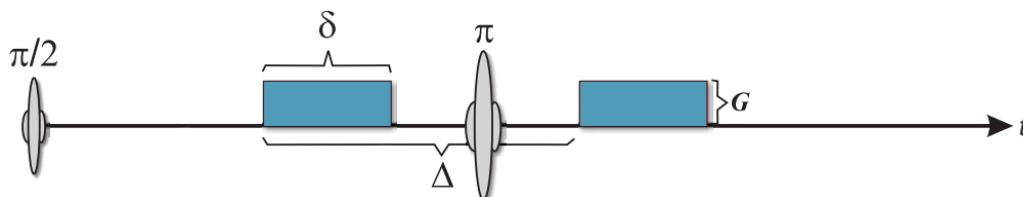


Figura 5. Esquema de una secuencia para adquisición de imágenes sensibles a difusión. Tomada y modificada de (Concha, 2008).

Modificando los parámetros descritos se puede alterar la sensibilidad al movimiento de las moléculas, lo que es llamado el “valor b”. Determinado por la siguiente ecuación:

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$$

En la cual γ es la constante giromagnética y las unidades del valor b es en s/mm². Valores bajos del valor b, serán solo afectadas medianamente por las propiedades del tejido. Sin embargo, cuando hay incremento de este valor, la atenuación de la señal se ve comprometida pero la sensibilidad a pequeñas escalas espaciales se incrementa, lo que permite la evaluación de la complejidad y heterogeneidad de la microestructura (Graessner, 2011; Tang & Zhou, 2019).

2.3.1.1 Modelo del tensor

Una vez obtenidas las imágenes sensibles a difusión son analizadas con distintos modelos matemáticos. Uno de ellos es el modelo de tensor (DTI), puede ser utilizado para caracterizar la difusión tridimensional del agua como una función de localización espacial, en cual se toman las medidas de difusión en diferentes direcciones y usando la descomposición del tensor, se extrae la difusión paralela y perpendicular de las fibras, obteniendo así los 3 vectores principales (eigenvectors) de cada voxel, y así construir mapas cuantitativos (Tournier, Calamante, Gadian, & Connelly, 2004). Esto permite que el modelo describa la magnitud, el grado de anisotropía, y la orientación de la difusión de una población de fibras. Uno de los mapas cuantitativos más utilizados es el de la fracción de anisotropía, que indica el grado de asimetría de la difusión en un voxel (Alexander *et al.*, 2007; Assaf & Pasternak, 2008; Basser, Mattiello, & LeBihan, 1994).

El modelo descrito por Basser en 1994 es ampliamente utilizado en regiones donde se conoce que existe un sola de población de fibras con una dirección preferente en materia blanca, como lo es en tracto corticoespinal, fimbria, nervios ópticos, entre otros, e incluso en estas estructuras se han logrado identificar patologías asociadas a con estas fibras (Auriat, Borich, Snow, Wadden, & Boyd, 2015; Basser *et al.*, 1994).

En materia blanca, el modelo del tensor representado por unos elipsoides otorga información del estado de la microestructura. En el cual estas son más isotrópicas en

regiones con mayor cantidad de agua libre o complejidad del tejido, como se observa en panel a de la figura 6.

En los ventrículos donde existe mayor cantidad de líquido el valor de la FA tiende a cero, mientras que en regiones con una población de fibras bien definidas como en cuerpo calloso los valores de FA tienden a ser cercanos a 1 (Walhovd, Johansen-Berg, & Karadottir, 2014). Sin embargo, estas métricas no solo dependen de la cantidad de líquido presente en el tejido, sino de la distribución y orientación de las fibras en cada voxel (Walhovd et al., 2014). En estos casos podemos encontrar voxeles con cruce de fibras como en a del panel B de la figura 6. Ya que aquí al encontrarse dos poblaciones de fibras en un solo voxel con dos direcciones distintas, el modelo del tensor no es capaz de describir adecuadamente lo que ocurre en la región, resultando en elipsoides más isotrópicos (Walhovd et al., 2014), siendo una de las limitaciones, ya que en la mayoría de la sustancia blanca humana existen este tipo de cruces (Jeurissen *et al.*, 2013).

En la figura 6a podemos observar lo mencionado anteriormente con relación al cuerpo calloso, el cual conserva una dirección bien definida y por lo tanto los elipsoides son elongados manteniendo un eje principal evidente. Además, podemos encontrar casos en los cuales las fibras dentro de un voxel se encuentran con una distribución más compleja (Walhovd, Johansen-Berg, & Karadottir, 2014).

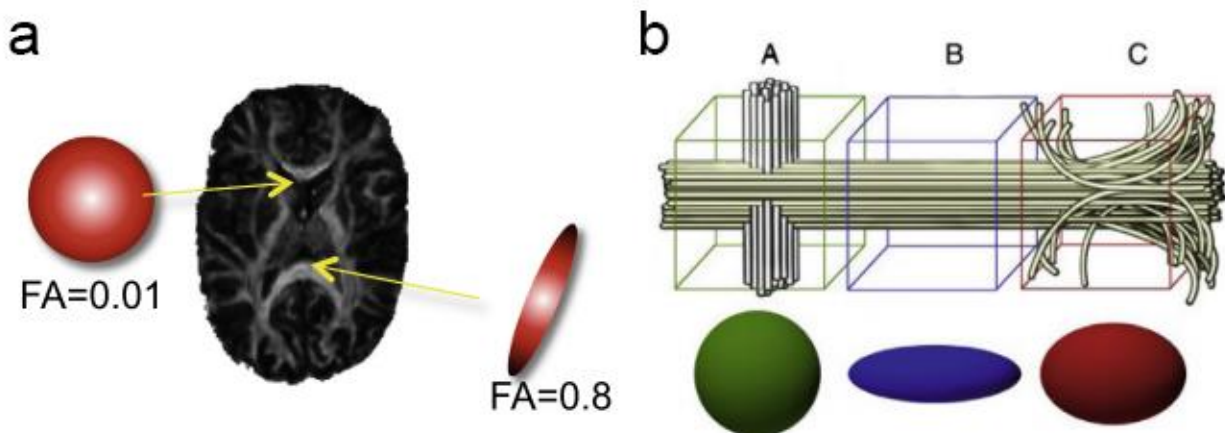


Figura 6. Modelo del tensor en materia blanca. En "a" se observa un mapa de fracción de anisotropía (FA) de un cerebro humano en el cual se observa la difusión isotrópica de una región como el líquido cefalorraquídeo y un elipsoide anisotrópico en cuerpo calloso.

En el panel “b” se observan 3 voxeles con distintas características de las fibras presentes. Lo que genera diferentes magnitudes en las difusiones radiales y perpendiculares. En verde un voxel con cruce de fibras, en azul un voxel con una población de fibras bien definida y en rojo una población de fibras que contiene mayor complejidad en su distribución de las mismas. Tomado de (Walhovd et al., 2014).

2.3.1.2 Deconvolución esférica restringida

Dadas las limitaciones del modelo del tensor, se han desarrollado nuevos modelos matemáticos de la señal, que permitan obtener más información de cada voxel en las imágenes sensibles a difusión y así realizar una mejor inferencia de las características vectoriales de las fibras presentes (figura 7). Algunas de estas técnicas presentan distintas ventajas y limitaciones, pero algo necesario para que sea implementado en la clínica es la necesidad de un tiempo de adquisición de imágenes razonable (i.e 30 – 90 mins), es por lo que el modelo de deconvolución esférica restringida (CSD, por sus siglas en inglés) es una de las más plausibles. Para ello, es necesario obtener la función de distribución de orientación de las fibras (fODF, *fiber orientation distribution function*, por sus siglas en inglés de la señal (Tournier *et al.*, 2004, 2011).

Así como en el modelo del tensor (figura 7, tensor) existen métricas que nos permiten obtener información cuantitativa del estado de la microestructura, CSD también tiene las propias derivadas de cada población presente en un voxel. Estas métricas son una descripción geométrica de la fODF (figura 7, CSD). Una de estas métricas, es la densidad aparente de fibras (AFD, por sus siglas en inglés), en ella se representa la integral de los “lóbulos”, la amplitud de estos está determinada por el pico máximo de la distribución de fibras (PEAK) y la “Dispersión” es una relación entre estas dos. Además, existe otra métrica llamada “Complejidad”, que otorga información de las poblaciones de fibras presentes con sus tamaños relativos (Raffelt *et al.*, 2012).

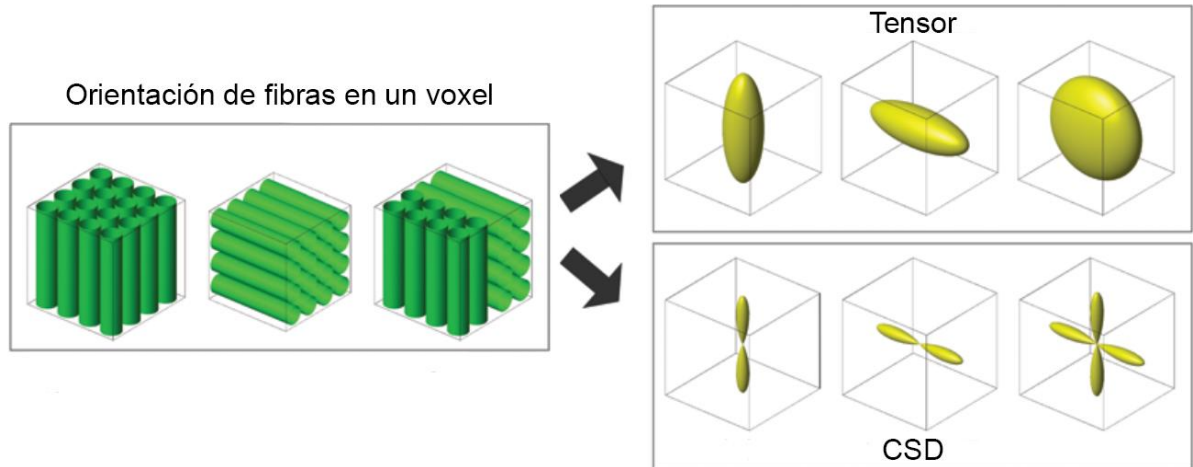


Figura 7. Representación gráfica del modelo del tensor y CSD dependiendo de la orientación de fibras en un voxel. En el lado izquierdo se visualizan tres voxeles, cada uno con una orientación de las fibras distintas, en el cual el último presenta fibras en dos orientaciones. En el lado derecho se esquematiza el modelo del tensor para cada uno de estos voxeles, observando que no es capaz de dar información suficiente de ambas poblaciones, a diferencia del modelo de CSD que contiene los lóbulos indicando la orientación de cada población. Tomada y modificada de (Farquharson *et al.*, 2013).

Este modelo ha demostrado proporcionar una mejor interpretación de lo que sucede en la microestructura del sistema nervioso (figura 8), sin embargo, existe poca evidencia de correspondencia biológica de lo generado por estos modelos matemáticos (Grussu *et al.*, 2017; Rojas-Vite *et al.*, 2019).

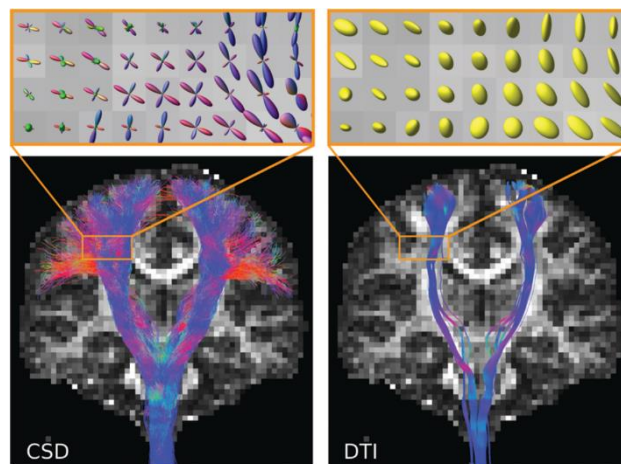


Figura 8. Orientación local de tractogramas. Tractogramas generados con el modelo del tensor (derecha) y un modelo con base en la distribución y orientación de las fibras (izquierda). Tomada de (Farquharson et al., 2013).

2.3.1.3 Método de búsqueda multi-resolución discreta (MRDS)

Otro método para el análisis de imágenes sensibles a difusión por resonancia magnética en voxeles con cruces de fibras, es un método multi-tensor basado en la “búsqueda multi-resolución discreta” (MRDS por sus siglas en inglés) (Coronado-Leija, Ramirez-Manzanares, & Marroquin, 2017). Este método permite la estimación geométrica intra-voxel de las propiedades de difusión con ángulos de cruces relativamente pequeños, así como una estimación más acertada en baja relación señal/ruido (SNR, Signal-to-noise-ratio) dado que estima la función de respuesta (tensor) por voxel y por población de fibras. Algunas de las ventajas que muestra este modelo con respecto a CSD es que presenta mejoras en la precisión de la estimación del número y orientación de las poblaciones de fibras presentes en el voxel. Por otro lado, provee resultados efectivos para la estimación de la difusión axial y radial por población de fibras (Coronado-Leija et al., 2017).

2.4 ISQUEMIA RETINIANA

Para el estudio de la degeneración axonal (Walleriana), estudios previos han utilizado el modelo de isquemia retiniana unilateral. En este modelo se provoca la muerte de las CG en la retina, que conlleva a la degeneración de sus axones (que forman el nervio óptico). La lesión se provoca mediante reducción del flujo sanguíneo total del ojo de rata por la elevación de la presión intraocular, por medio de la canulación de la cámara anterior. Los daños ocasionados pueden ser observados en estudios histopatológicos y morfométricos (Adachi et al., 1996; Takahashi, Lam, Edward, Buchi, & Tso, 1992).

El grado de degeneración depende del tiempo de isquemia (Adachi et al., 1996), logrando observar cambios en el nervio óptico desde los primeros 45 minutos a una presión de 120 mm/Hg. En etapas posteriores a la lesión, el daño a nivel histológico se ve reflejado en la degeneración de las CG retinales y la capa plexiforme interna por medio de tinción con hematoxilina y eosina (Song et al., 2003). La degeneración ocasionada repercute a

todo el nervio, llegando así hasta el quiasma óptico, donde los axones cruzan la línea media, entrecruzándose con axones intactos provenientes del ojo no afectado (Rojas-Vite et al., 2019; Sun, Liang, Cross, & Song, 2008).

Mediciones en serie que incluyen tiempos tempranos en un modelo de daño al nervio óptico por aumento de presión en el ojo de la rata, han llevado a la observación de que las difusiones individuales son producto de indicadores de tejido más específico. La reducción de la difusión paralela en la post-isquemia retiniana temprana, sin un cambio en la difusión perpendicular, se ha correlacionado con daño axonal, y la elevación de la difusión perpendicular fue asociada con la degradación de la mielina (figura 9) (Song et al., 2003). Este comportamiento tiempo dependiente al daño de la difusión paralela y perpendicular, se ha observado en otros modelos experimentales e incluso en análisis *in vivo* de pacientes que fueron sometidos a una transección de la porción anterior del cuerpo caloso como tratamiento a convulsiones atónicas que no responden a medicación, y en la fimbria-fórnix, posterior a una transección en pacientes con epilepsia de lóbulo temporal (Concha et al., 2006; Liu et al., 2013; Song et al., 2003). Estos hallazgos han demostrado que es posible inferir la estructura del tejido nervioso de manera no invasiva, al menos en regiones de sustancia blanca donde todos los axones siguen la misma dirección.

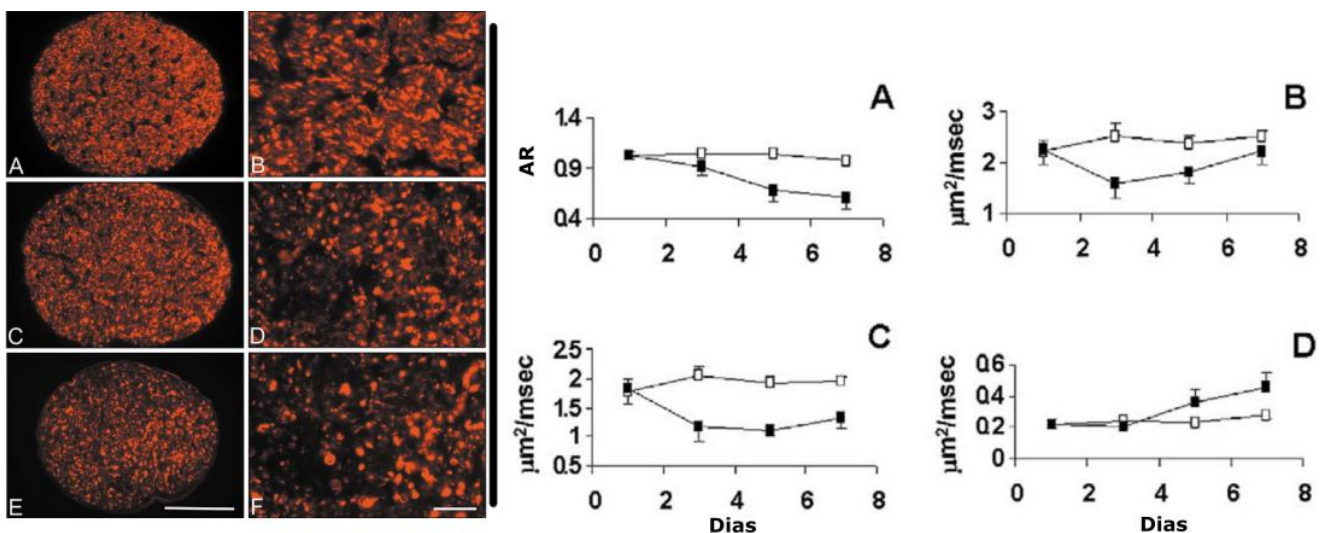


Figura 9. Cuantificación por resonancia magnética y su relación con histología. En el panel de la izquierda se puede observar unas secciones de nervio óptico marcadas por

inmunohistoquímica para neurofilamentos (SMI-31). En A y B se observa un nervio intacto, en C y D un nervio de 3 días posteriores a la lesión y finalmente en E y F corresponde a un nervio 7 días post-lesión. La barra de escala indica un tamaño de 100 μm . En el panel de la derecha se pueden observar cuatro gráficas que corresponden a métricas de mapas cuantitativos derivados del modelo del tensor en registros longitudinales de diversos días. En A, se muestra la anisotropía relativa, en B el “trace” (suma de los 3 vectores principales), en C se observa los cambios de la difusión paralela y en D la difusión radial. Tomada de (Song et al., 2003).

El modelo de isquemia retiniana es ideal para poder hacer una evaluación de la difusión del agua en presencia de una sola población de axones, ya sean intactos (nervio que emerge del ojo no afectado), o degenerados (nervio que emerge del ojo isquémico). Su extensión resulta trivial, pero altamente informativa, pues en el quiasma es posible evaluar la difusión del agua en presencia de dos poblaciones de axones que se cruzan, cada una con características particulares, presentando una oportunidad para realizar una evaluación directa de la capacidad de los nuevos métodos cuantitativos del análisis de imágenes de difusión para la inferencia de características histológicas en sitios con arquitectura compleja.

3-JUSTIFICACIÓN

Las imágenes de difusión permiten acceder a información histológica de forma no invasiva, lo que supone un importante avance para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades neurológicas. Durante diversas enfermedades neurodegenerativas existe una pérdida axonal considerable que a nivel macroscópico es usualmente imperceptible sino hasta etapas avanzadas de la patología. Uno de los procesos histopatológicos principales durante un daño es la degeneración Walleriana, en el cual se ha observado que la difusión del agua inter e intra-axonal se ve alterada. Es por ello que actualmente existen técnicas no invasivas que permiten el análisis de la microestructura en alteración físicas del sistema nervioso. La resonancia magnética por difusión es una de las más utilizadas debido a la alta información generada y que es no invasiva, es decir, no se requiere alguna manipulación directa del tejido o de intervención quirúrgica. En sitios sin cruces de fibras, el modelo del tensor ha demostrado su utilidad. Sin embargo, la mayoría de la sustancia blanca presenta cruces de fibras, invalidando las inferencias del modelo del tensor. Se han desarrollado diversos modelos matemáticos que son capaces de lidiar con arquitecturas complicadas de fibras nerviosas. Ejemplos de ellos son la deconvolución esférica restringida (CSD) y el método multi-tensor, *multi-resolution discrete-search* (MRDS). Al igual que el tensor, estos métodos son altamente sensibles a la degeneración axonal en sitios sin cruces de fibras. Sin embargo, es necesario evaluar la sensibilidad de métodos analíticos de regiones con cruces de fibras ante los cambios morfológicos tempranos dependientes del tiempo posterior al daño con las imágenes histológicas, ya que se ha observado en estudios que un daño axonal agudo ocurre en las primeras horas o días, pero además puede presentarse una degeneración tiempo dependiente al daño correspondiente a una pérdida de mielina, procesos importantes a considerar en patologías neurodegenerativas y en la detección temprana de las mismas. Por lo tanto, es necesario evaluar si existe una correspondencia histológica con la sensibilidad de métodos analíticos de regiones con cruces de fibras, particularmente con CSD y MRDS en imágenes por resonancia magnética en un estudio con distintos intervalos de avance de la patología para apoyar su uso en la clínica en la detección temprana de cambios morfológicos de la microestructura.

4-HIPÓTESIS

La sensibilidad del modelo de deconvolución esférica restringida (CSD) y MRDS es suficiente para identificar cambios en la microestructura post isquemia de los nervios y quiasma óptico en distintos intervalos (1, 7 y 30 días post-isquemia) con respecto al tejido intacto.

Existe una correlación en los parámetros histológicos analizados con los análisis de las imágenes sensibles a difusión por resonancia magnética en ambas condiciones (control y experimental) en nervios y quiasma óptico en distintos intervalos (1, 7 y 30 días post-isquemia).

5-OBJETIVO

Evaluar en cuatro intervalos (control, y 1, 7 y 30 días post-isquemia) con imágenes sensibles a difusión por resonancia magnética la sensibilidad de modelos de análisis en regiones de cruces de fibras y su correlación histológica *ex vivo* de la degeneración axonal en quiasma óptico en un modelo por isquemia retiniana.

6-SUJETOS

Se utilizaron 19 ratas macho de la cepa Wistar, de 300-350 g, cuatro controles y las 15 restantes fueron lesionadas. El grupo experimental fue subdividido en 3 grupos de 5 ratas cada uno (1, 7 ó 30 días). Para las ratas utilizadas como controles, en ellas no se realizó ninguna manipulación experimental. A todos los individuos se les realizó una resonancia magnética *ex vivo* y los respectivos cortes histológicos (figura 10).

Condición	Escaneo <i>ex vivo</i>	Histología	Número de animales
Control	X	X	4
1 día	X	X	5
7 días	X	X	5
30 días	X	X	5

Figura 10. Diseño experimental

7-MÉTODOS

7.1 INDUCCIÓN DE ISQUEMIA RETINIANA

La isquemia fue inducida por medio del incremento de la presión intraocular con la canulación de la cámara anterior del ojo derecho de 15 ratas y las otras 4 fueron utilizadas como controles. Se administró 0.1 ml/100 g de una mezcla de ketamina (70 mg/ml) (PiSA, Hidalgo, México) / xilacina (4 mg/mL) (Cheminova, Ciudad de México, México) y solución salina al 0.9 % (PiSA, Jalisco, México) vía intramuscular para anestesiarse a los sujetos, posteriormente se colocaron en un marco estereotáxico para mantener fija la cabeza durante todo el tiempo del procedimiento experimental, además, debajo de los animales se colocó una camilla térmica para mantener su temperatura corporal.

Posteriormente, se realizó la canulación de la cámara anterior del ojo derecho y se administró solución salina al 0.9 % elevando la presión intraocular a 120 mmHg durante 90 minutos (figura 11) tal como descrito previamente (Adachi et al., 1996).

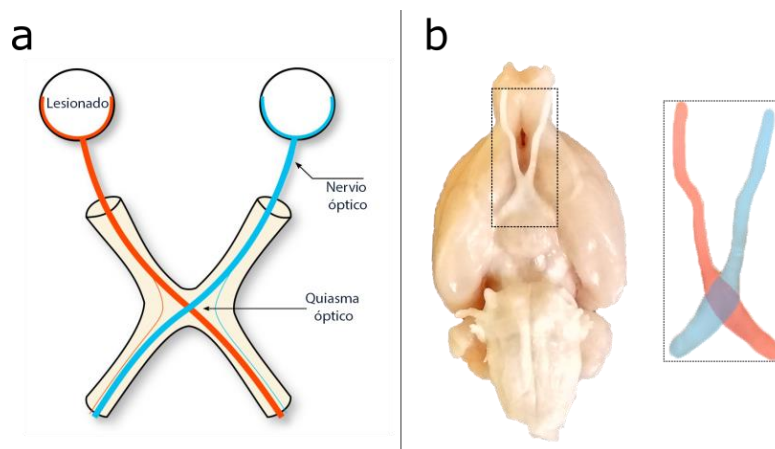


Figura 11. Modelo de isquemia retiniana. En panel “a” se representa la región de interés de manera esquemática con las poblaciones de fibras que decusan en la región del quiasma óptico. En “b” se observa una vista ventral de un cerebro de rata fijado, señalando la región de interés en color. El color rojo señala el nervio y tracto óptico que va a ser afectado por el incremento de la presión intraocular y en color azul el nervio intacto. Tomado y modificado de Rojas-Vite *et al.*, 2019.

7.2 FIJACIÓN Y EXTRACCIÓN DEL TEJIDO

Una vez transcurrido el tiempo indicado después de la isquemia retiniana (1, 7 ó 30 días) se procedió a hacer la eutanasia de los animales con pentobarbital sódico (PiSA Hidalgo, México) y se realizó la perfusión intracardiaca con paraformaldehído (PFA) (Sigma-Aldrich, Montana, EUA) al 4 % con solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés phosphate buffer solution) (Sigma-Aldrich, Montana, EUA) (0.1 M) con glutaraldehído (Electron Microscopy Science, Pennsylvania, USA) (2 %) y gadolinio (Gadovist, Berlín, Alemania) (0.2 mM) para la fijación del tejido. Al terminar la perfusión se procedió a extraer los cerebros cuidadosamente para conservar la mayor longitud de los nervios ópticos y de no lesionar la región del quiasma óptico (figura 6, b). El tejido extraído fue almacenado en la misma mezcla de perfusión.

7.3 HISTOLOGÍA

7.3.1 Proceso histológico

Una vez concluidos los escaneos de resonancia magnética, se procedió a extraer una sección de los nervios ópticos proximal al quiasma óptico. Cada uno fue lavado en amortiguador de fosfatos a 0.1 M a 4 °C, 3 veces para retirar el excedente de la solución de fijadora. Posteriormente fueron inmersos en una solución de tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de fosfatos 0.1 M durante 1 hora en rotación. Transcurrido el tiempo, fueron lavados nuevamente, para comenzar con una deshidratación del tejido en un gradiente de acetona (60 %, 70 %, 80 %, 90 %) hasta realizarlo con acetona absoluta. Después, el tejido fue embebido en una solución 2:1 de resina epoxy con acetona aproximadamente por 17 horas. Al término, cada una de las muestras fue colocada en un molde con solo resina a una temperatura de 56 °C para su polimerización.

Se realizaron cortes histológicos (400-500 nm de grosor) perpendiculares al eje longitudinal, los cuales fueron teñidos con una solución de azul de toluidina con borato de sodio, ambos al 0.5 %.

7.3.2 Adquisición de fotomicrografías y análisis

Al contar con los cortes histológicos, se obtuvieron fotomicrografías con un microscopio Zeiss Axiomager vertical a 63x con platina motorizada, el cual nos permite realizar mosaicos de los cortes completos de nervio óptico. En cada adquisición se tuvo en cuenta una iluminación, exposición, contraste y enfoque adecuados. Posteriormente se realizó la unión de cada una de las imágenes individuales de cada corte con el plugin *grid/collection stitching* (Preibisch, Saalfeld, & Tomancak, 2009) del programa Fiji 1.52i (Schindelin *et al.*, 2013).

Uno de los métodos más utilizados para la cuantificación de axones es el conteo manual, el cual es muy efectivo, pero puede llevar horas de para solo analizar una pequeña región. Para incrementar el área de análisis y obtener la mayor información de la arquitectura del tejido, los mosaicos derivados fueron analizados por medio del programa de segmentación axonal automático, AxonSeg (Zaimi *et al.*, 2016). Dicha herramienta permite la obtención de parámetros morfológicos axonales y de la mielina (figura 12).

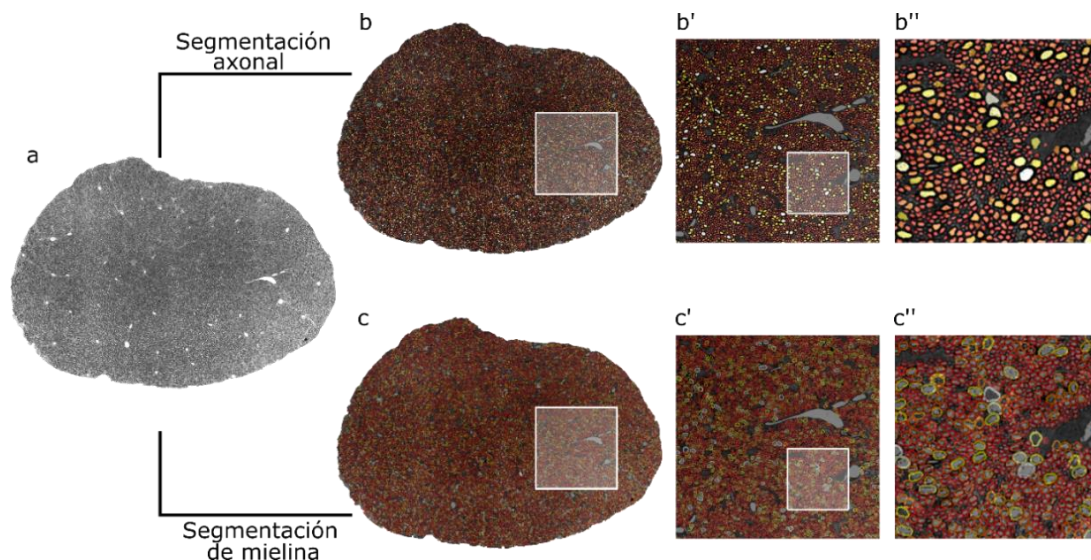


Figura 12. Segmentación axonal de nervio óptico. En “a” se muestra un mosaico de una sección perpendicular al eje largo de nervio óptico. En “b” y “c” se observa la segmentación axonal y de mielina respectivamente del corte de nervio óptico realizado con AxonSeg. En “b'” y “b'” los acercamientos de la región del recuadro en blanco para la segmentación axonal y en “c'” y “c'” para mielina.

7.3.3 Parámetros derivados de la segmentación automática con AxonSeg

Los principales parámetros obtenidos de la segmentación automática y utilizados en este trabajo son la cuantificación total de axones, el diámetro axonal (axón sin contar la mielina), diámetro de mielina (axón más mielina), área axonal, área de mielina, grosor de mielina y tasa-g. Además, se pueden realizar la cuantificación de otros parámetros derivados de las relaciones entre ellos, principalmente con el área total del nervio óptico, como es el caso de densidad axonal, fracción de volumen axonal (FVA) y de mielina (FVM). En la figura 13 se ilustran algunos de ellos.

En el anexo 1 se muestra el proceso completo utilizado para la extracción y generación de tablas derivadas del archivo de salida de AxonSeg.

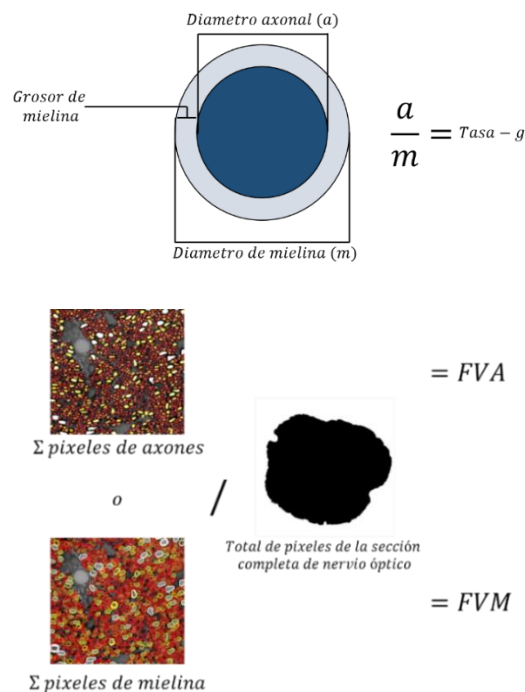


Figura 13. Representación de los parámetros obtenidos por medio de la cuantificación automática. En la parte superior hay una representación de un axón con los parámetros que de AxonSeg se pueden obtener. En la parte inferior se muestra el proceso de obtención de la fracción de volumen axonal (FVA) y de mielina (FVM).

7.4 ADQUISICIÓN DE IMÁGENES SENSIBLES A DIFUSIÓN

Para el caso de las imágenes *ex vivo*, se utilizó una antena de 2 canales enfriada por Helio (Bruker, Ettlingen, German). Los parámetros de la secuencia de adquisición fueron obtenidos del estudio de Rojas-Vite, 2019 y modificados para la antena enfriada por helio, la cual permite una mejor relación señal-ruido, obtener una mejor resolución y valores b más elevados. El tiempo de repetición (TR) fue de 250 ms, tiempo de eco (TE) = 25.19 ms, con 20 direcciones ($b=1000$ s/mm²), 34 ($b = 3000$ s/mm²), 52 ($b = 5000$ s/mm²), 54 ($b = 7000$ s/mm²) y un total de 20 imágenes no sensibles a difusión ($b = 0$ s/mm²) con una resolución de voxel de $80 \times 80 \times 80$ μm y un *field of view* (FOV) = 11.52 mm³. Esta alta resolución, apta para el análisis aquí propuesto, es prácticamente imposible de obtener en la condición *in vivo*.

Los gradientes utilizados tienen una duración (δ) de 4.9 ms y una separación (Δ) de 10.84 ms. Se utilizó una adquisición eco-planar (EPI, echo-planar image) segmentada (8 segmentos) con un tiempo total de escaneo de 15 hrs. Los cerebros fueron inmersos en Fluorinert (Sigma-Aldrich, Montana, USA) y la temperatura fue establecida a 21 grados centígrados durante todo el escaneo.

7.4.1 Preprocesamiento y análisis de las imágenes sensibles a difusión

El primer paso posterior a la adquisición fue realizar un corte de las imágenes en los ejes anterior-posterior y superior-inferior, manteniendo así solo las regiones de interés (i.e. nervios ópticos y quiasma). El siguiente paso consistió en eliminar el ruido de las imágenes (Veraart *et al.*, 2016), seguido de la corrección de anillos de Gibbs (Kellner, Dhital, Kiselev, & Reisert, 2016), corrección de inhomogeneidades del campo (*Biasfield correction*) (Tustison *et al.*, 2010), así como una corrección de movimiento para las corrientes de Foucault (Avants *et al.*, 2014) y el *signal drift* inducido por el calentamiento de los gradientes. Para esto último, se realizó un promedio de las primeras 5 imágenes b_0 , el cual sirvió como imagen de referencia para registrar todas las imágenes de $b=1000$ s/mm², una vez registradas, se procedió a hacer un promedio de dichas imágenes (promedio de $b=1000$) para pasar a ser la imagen referencia del registro de las imágenes con $b=3000$ s/mm², este procedimiento se repitió para cada *shell*. En la figura 14 se

muestra en la parte superior la región analizada en el plano coronal y axial, con una imagen vectorial sobrepuesta del atlas de coordenadas estereotáxicas de Paxinos en una región próxima a la observada en resonancia magnética (Paxinos & Watson, 2004). En la parte inferior, en un plano coronal, se muestran imágenes promedio de un sujeto para las que no son sensibles a difusión ($b=0$ s/mm²) y para $b= 1000$ y 7000 s/mm². En estas imágenes se puede notar el movimiento, la inhomogeneidad del campo magnético y el ruido. En el panel inferior inmediato, se observan las imágenes preprocesadas con los pasos anteriormente descritos.

Finalmente, en el último panel se muestran dos mapas después del pre-procesamiento, del lado izquierdo el de la fracción de anisotropía obtenido por el modelo del tensor en dos planos, coronal y axial, así como el mapa de difusión principal ambos por medio del software MRtrix 3. En este último los colores representan en rojo (izquierda-derecha), verde (superior-inferior) y en azul (posterior-anterior).

En el Anexo 1 se muestra el *pipeline* completo utilizado que consta de comandos del software MRtrix 3, FSL 5.09 y ANTs¹ (Jenkinson, Beckmann, Behrens, Woolrich, & Smith, 2012; Tournier *et al.*, 2019). ¹<http://stnava.github.io/ANTs/>

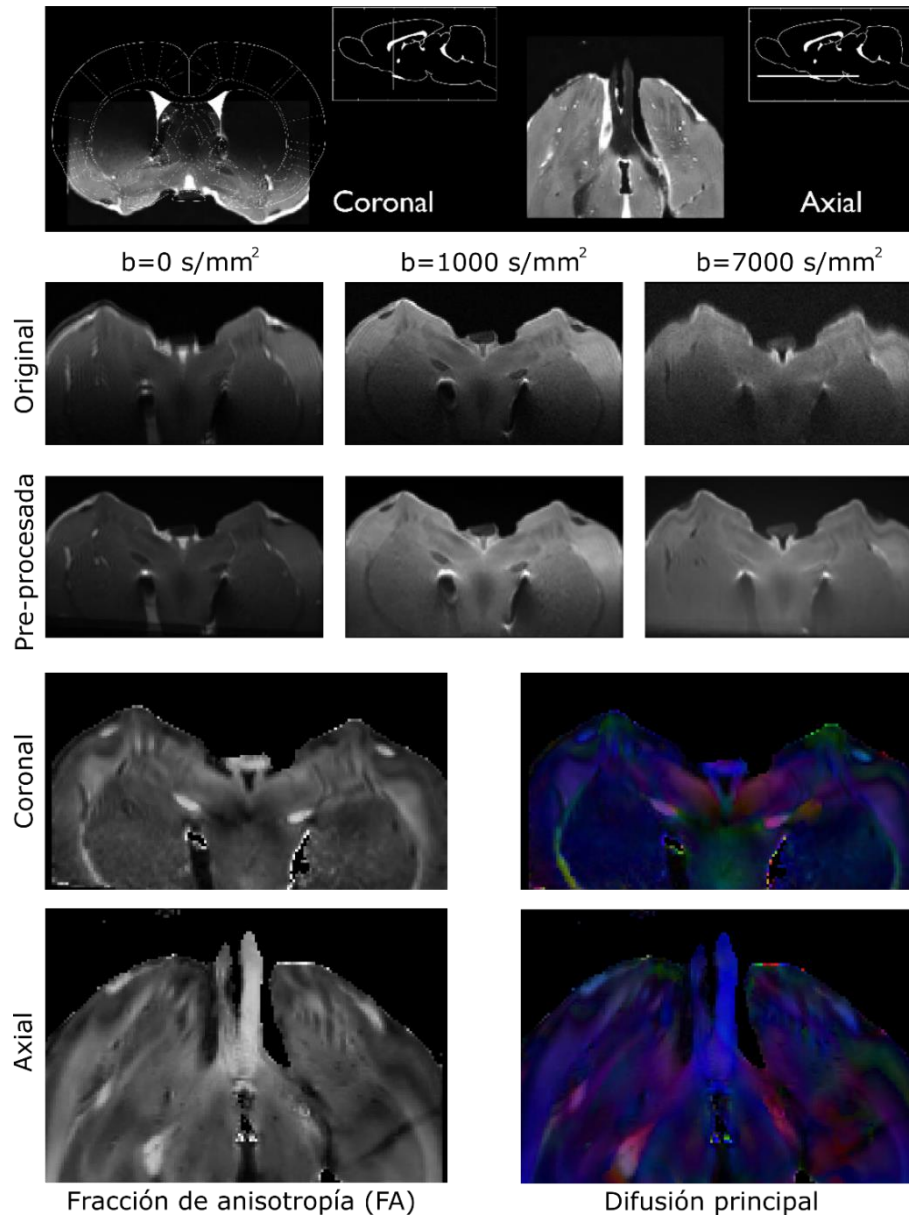


Figura 14. Preprocesamiento de las imágenes sensibles a difusión. En el panel superior se muestra del lado izquierdo una imagen de un atlas de rata sobre una resonancia magnética en el plano coronal (Paxinos & Watson, 2004). Del lado derecho se encuentra el plano axial, en la cual se pueden observar gran porción de los nervios y quiasma óptico. Posteriormente se muestra la imagen original con los subsecuentes promedios de la imagen $b=0$, 1000 y 7000 s/mm^2 y debajo las imágenes preprocesadas correspondientes a los mismos *shells*. Finalmente, se muestra el mapa de FA del lado izquierdo en ambos planos (coronal, axial), así como el mapa de difusión principal.

Al tener la imagen preprocesada, se realizaron máscaras anatómicas manualmente de los nervios ópticos (110 voxeles), así como de la región del quiasma (80 voxeles). Las máscaras fueron obtenidas para extraer las métricas correspondientes a cada modelo.

Para el modelo del tensor, fue utilizado el algoritmo de MRtrix 3 basado en la ponderación iterativa de un estimador lineal de mínimos cuadrados.

En CSD se calculó la función de respuesta para tres componentes (*i.e.* materia blanca, materia gris y líquido cefalorraquídeo) por medio del algoritmo de Dhollander para cada uno de los cerebros. Posteriormente se realizaron máscaras binarias en todos los nervios y tractos ópticos para obtener la función de respuesta únicamente de materia blanca de los voxeles seleccionados por medio del algoritmo de Tournier (Dhollander, Raffelt, & Connelly, 2016; Tournier, Calamante, & Connelly, 2007)

Después, se calculó la función de respuesta manualmente utilizando los voxeles seleccionados por el algoritmo de Tournier y el resultado se sustituyó por el de la materia blanca generado por el algoritmo de Dhollander. Posteriormente, se promediaron las funciones de respuesta de todas las ratas para generar un único set que se aplicó para todas las ratas al calcular la distribución y orientación de fibras (FOD, *fiber orientation distribution*) por medio del algoritmo *multi-shell multi-tissue* (msmt) (Jeurissen, Tournier, Dhollander, Connelly, & Sijbers, 2014).

Para el método de multitensor resuelto por MRDS, se utilizaron los mismos voxeles seleccionados por el algoritmo de Tournier para calcular la función de respuesta y obtener el tensor de difusión por rata. Una vez teniendo esta función, se promedió para obtener un único set utilizado para el análisis de todos los sujetos experimentales.

7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron pruebas de normalidad por medio del método de Shapiro Wilk. Posteriormente, se realizaron comparaciones con pruebas t de Student pareadas para intra-grupo y no pareada para inter-grupo en cada una de las métricas derivadas de histología y de resonancia magnética, considerando una $p < 0.05$ como una diferencia estadísticamente significativa. Además, en cada una de las métricas se realizó una prueba de comparaciones múltiples Wilcoxon dado el tamaño reducido de la muestra, y

posteriormente se aplicó una corrección de la p por medio del método False Discovery Rate (FDR).

Para las matrices de correlación fue utilizado el método de Pearson y de igual manera la p fue corregida con FDR, considerando estadísticamente significativa una diferencia con una $p < 0.05$.

8-RESULTADOS

Los primeros resultados mostrados corresponden a la cuantificación morfológica de la microestructura por medio de la segmentación automática de AxonSeg en los cortes histológicos del nervio óptico. Posteriormente, se muestran los resultados obtenidos por medio del uso de las imágenes sensibles a difusión por resonancia magnética. De estos, la primer primera parte corresponde a los valores derivados del análisis en nervio óptico por medio del modelo del Tensor, CSD y MT-MRDS. La segunda sección son los resultados de la región del quiasma óptico de los cuales se muestra para CSD y MT-MRDS con sus diversas métricas derivadas de ellos. Finalmente, en la última parte, se describen los resultados obtenidos de las correlaciones entre los valores histológicos y los de resonancia magnética.

8.1 HISTOLOGÍA

Cualitativamente podemos observar en la figura 15 que el tejido de animales control, y aquellos sacrificados un día después a la lesión, no presentan cambios en la morfología de los axones, además a lo largo de toda la sección no hay ninguna formación característica de daño axonal. En contraste, los nervios ópticos de animales sacrificados 7 días posteriores al daño, muestran gran pérdida de la integridad axonal. Estos nervios presentan mielina más laxa pero que aún conservan la circularidad típica, además, es posible ver axones en los que la mielina se encuentra completamente alterada y con ello el axón tiene formas completamente atípicas. Otro proceso que podemos visualizar es que algunos axones se encuentran oscuros lo que indica que la integridad de la mielina y membrana celular se ha perdido, ya que el líquido extracelular ha penetrado en ellos. Para el caso de los nervios de animales sacrificados 30 días posteriores a la isquemia

se puede observar un incremento de la frecuencia de las alteraciones de mielina y axones, además de la evidente presencia de células gliales con citoplasma espumoso.

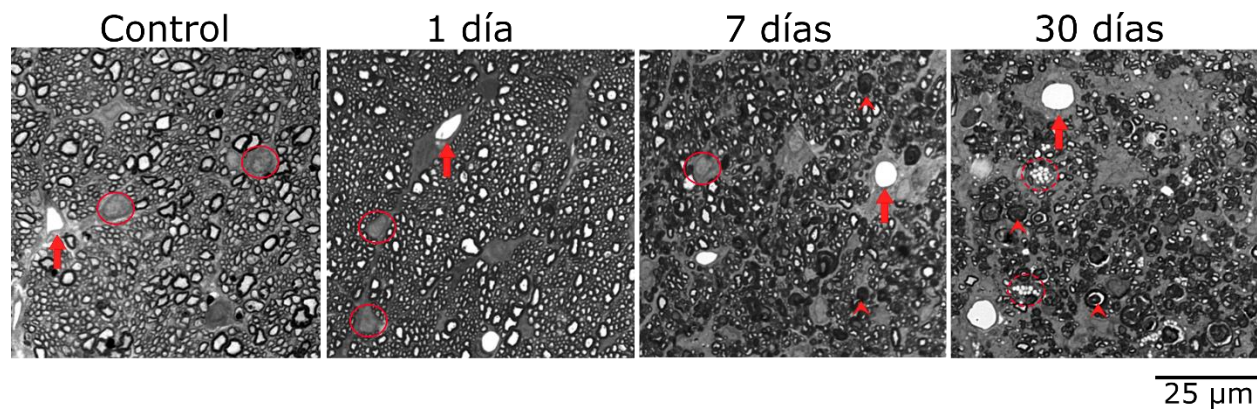


Figura 15. Acercamientos a regiones de nervios ópticos a diferentes días post isquemia retiniana. Flechas indican los capilares; las elipses muestran células gliales; las cabezas de flechas axones degenerados y las elipses punteados células gliales con citoplasma espumoso.

El análisis de las imágenes histológicas por segmentación automática es un método efectivo comparado con alternativas como el uso de umbrales de contraste para la segmentación, el cual nos permitió obtener distintos parámetros. Entre ellos, el primero que muestra un resultado cuantitativo de un estado que cualitativamente es aparente, es la pérdida axonal, en la cual podemos observar en la figura 16 existe un decremento considerable a partir del séptimo día post isquemia (31180 ± 4301) que el nervio contralateral a la lesión (67615 ± 5003). Este decremento también puede ser visualizado en los 30 días post isquemia con un decremento (24220 ± 3916) estadísticamente significativo que el nervio contralateral (74129 ± 2676)

Una situación observable es el decremento del número total de axones de nervio óptico lesionado, por ello cada una de las secciones histológicas se normalizó a su área total correspondiente de cada nervio óptico, y es así como tenemos los resultados de densidad axonal por μm^2 en la gráfica del panel superior de la figura 17. La tendencia de estos resultados es similar al conteo total de axones.

En ambos casos no se observa un cambio aparente a un día posterior a la lesión.

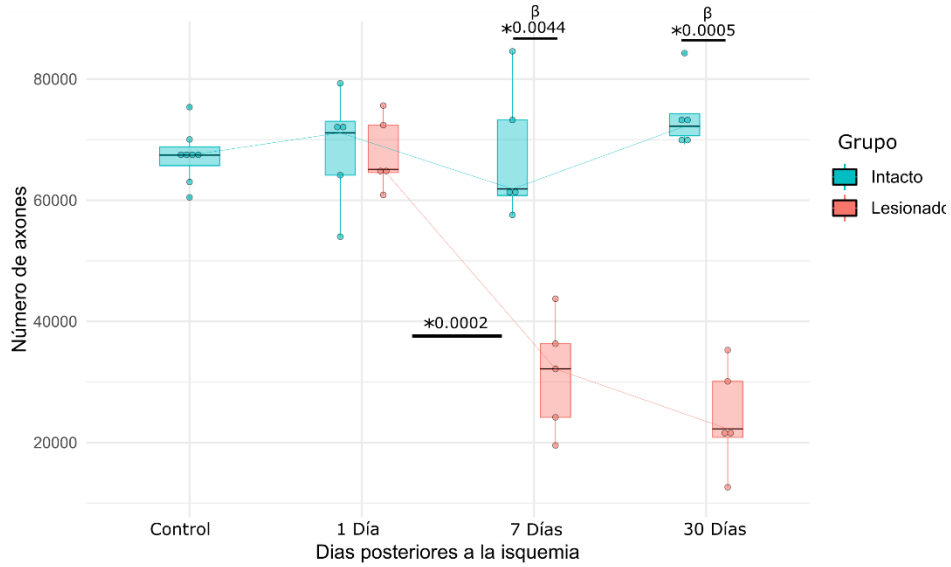


Figura 16. Número total de axones en nervios ópticos intactos y lesionados. En nervios intactos se puede observar que se mantiene un número de axones constante, sin embargo, se observa un cambio estadísticamente significativo en los días 7 y 30 con respecto a los intactos. * $p < 0.05$ en relación al nervio contralateral inter-grupo o intra-grupo. $\beta p < 0.05$ después de comparación múltiple con p corregida con método de FDR.

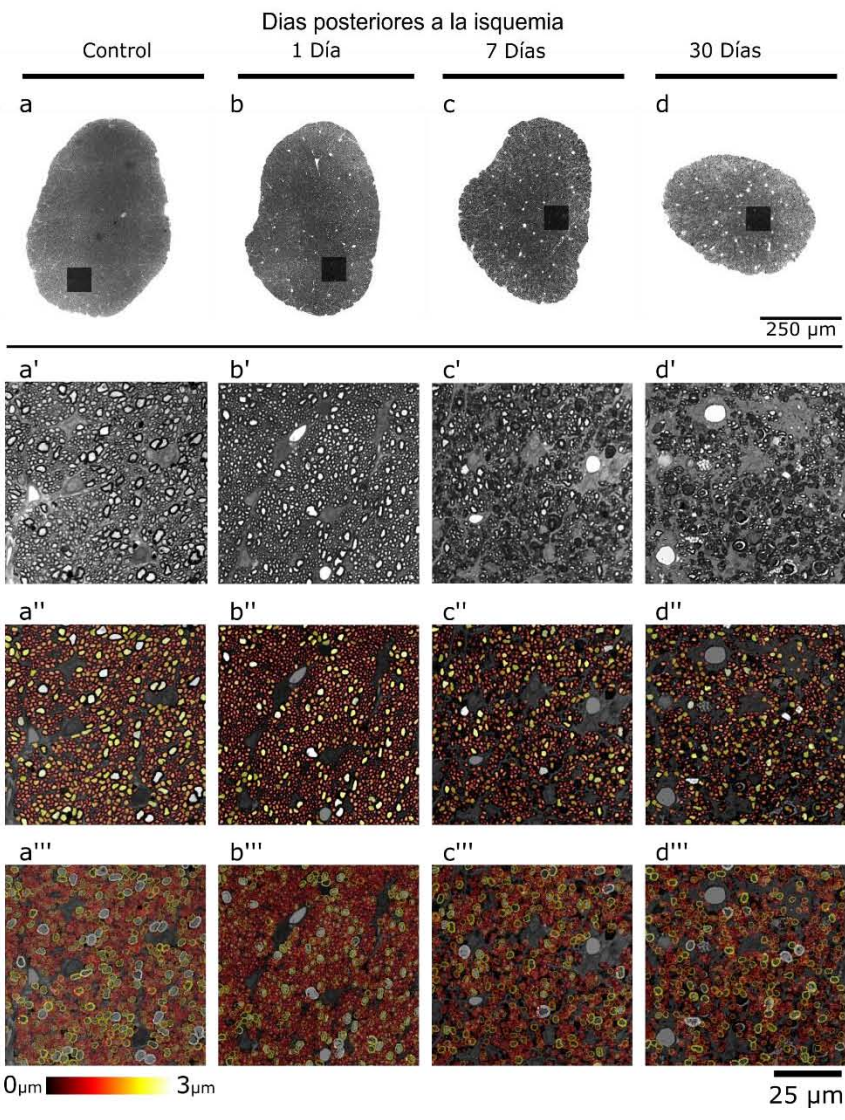
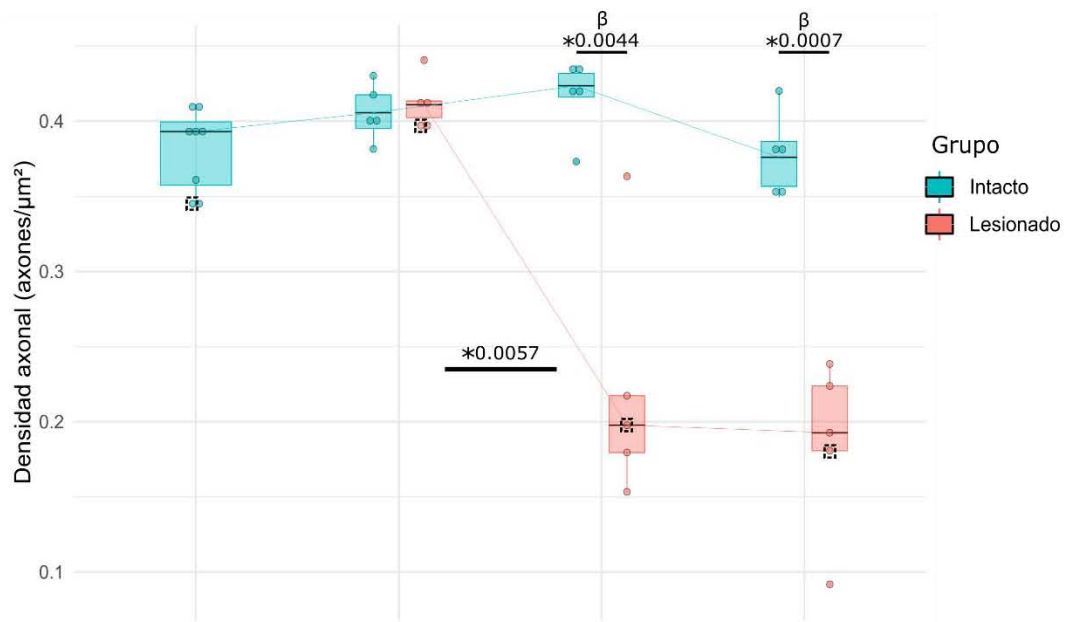


Figura 17. Densidad axonal y segmentación automática. En el panel superior se observa la gráfica de densidad axonal con la información de cada intervalo post-lesión. Cada cuadrado de líneas punteadas está señalando un nervio óptico correspondiente al nervio derecho (lesionado para el caso de la condición experimental) de alguno de los sujetos en cada intervalo (a, b, c, d). El recuadro en negro dentro de cada nervio óptico pertenece al área seleccionada en los aumentos que se observan en la parte media en los cuales a', b', c' y d' son aumentos de cada micrografía. Las letras con doble y triple prima corresponden a la segmentación automática axonal y de mielina respectivamente para cada intervalo. * $p < 0.05$ en relación al nervio contralateral inter-grupo o intra-grupo. $\beta p < 0.05$ después de comparación múltiple con p corregida con método de FDR.

Otra de las métricas a considerar es la FVA, en la figura 18 se muestra la pérdida de la proporción correspondiente a axones en el área total de análisis a partir del séptimo día y una reducción no significativa a los 30 días posteriores a la lesión con respecto al intervalo anterior. De igual manera en el panel b se observa una reducción de la proporción correspondiente a mielina desde el séptimo día post-lesión.

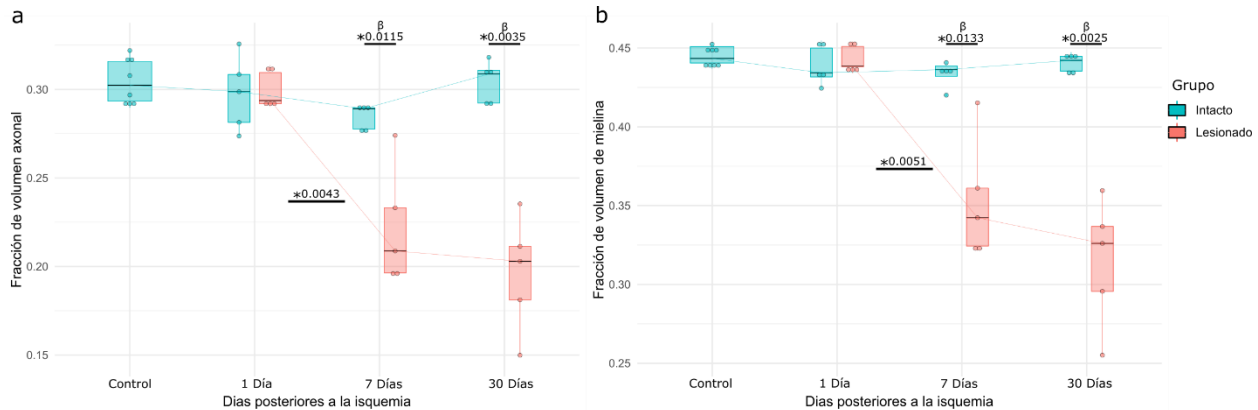


Figura 18. Fracción de volumen axonal y de mielina. En a se muestra la fracción de volumen axonal que presenta un decremento significativo a partir del día 7. Esto puede ser observado de igual manera en b, para la fracción de volumen de mielina. * $p < 0.05$ en relación al nervio contralateral inter-grupo o intra-grupo. $\beta p < 0.05$ después de comparación múltiple con p corregida con método de FDR.

Entre otros parámetros observamos que existe un incremento durante las condiciones experimentales a partir del séptimo día, este es el caso del diámetro axonal (figura 19, a) y del grosor de la mielina (figura 19, c). Esta tendencia se ve ligeramente reducida para el día 30 con respecto a los 7 días post-lesion, sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas entre estos dos intervalos.

La tasa-g (figura 19, b) muestra un decremento de esta relación, lo que nos otorga información acerca del estado en conjunto de la integridad axonal, así como también de la mielina.

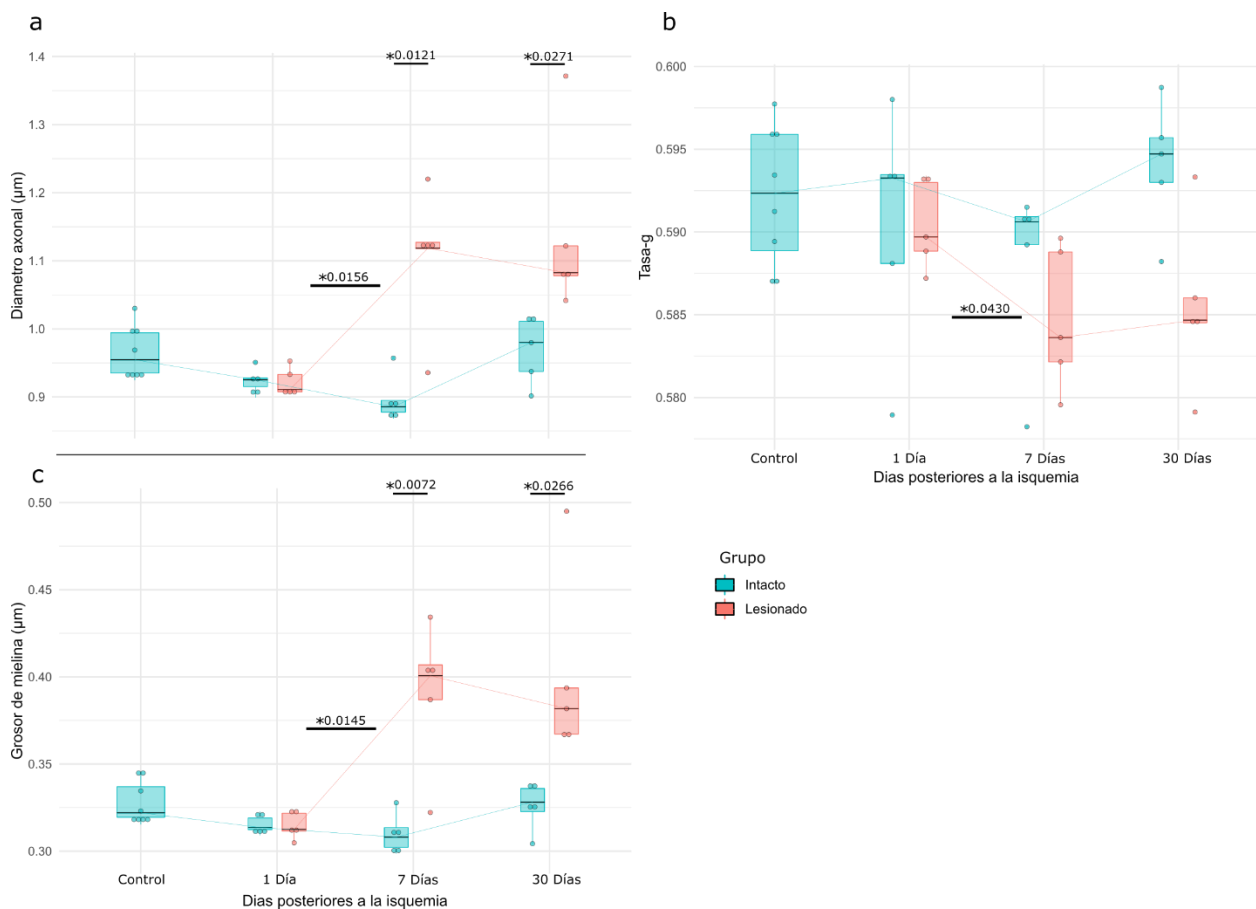


Figura 19. Resultados de cuantificación del diámetro axonal, tasa-g y grosor de mielina. En a se observan los cambios en el diámetro axonal para los distintos intervalos post lesión; en b la tasa-g y en c los resultados del grosor de mielina. * $p < 0.05$ en relación al nervio contralateral inter-grupo o intra-grupo.

8.2 RESONANCIA MAGNÉTICA *EX VIVO*

De acuerdo con los análisis del modelo del tensor en las imágenes de resonancia magnética sensibles a difusión, podemos observar (figura 20) que el grupo correspondiente a un día posterior a la lesión muestra valores similares a los del grupo control, tanto el nervio intacto como el dañado. Para el caso del grupo de siete días posteriores a la lesión, existe una marcada diferencia entre el nervio intacto y el afectado, con un decremento en este último para FA, MD y AD, además de un aumento en la RD. Estos cambios también ocurren en el grupo de 30 días post lesión, a pesar de que existe un incremento en los valores promedio para el nervio dañado comparado con la condición anterior de siete días post lesión, no existen diferencias significativas para ninguna de las métricas obtenidas con el modelo del tensor entre estos dos grupos.

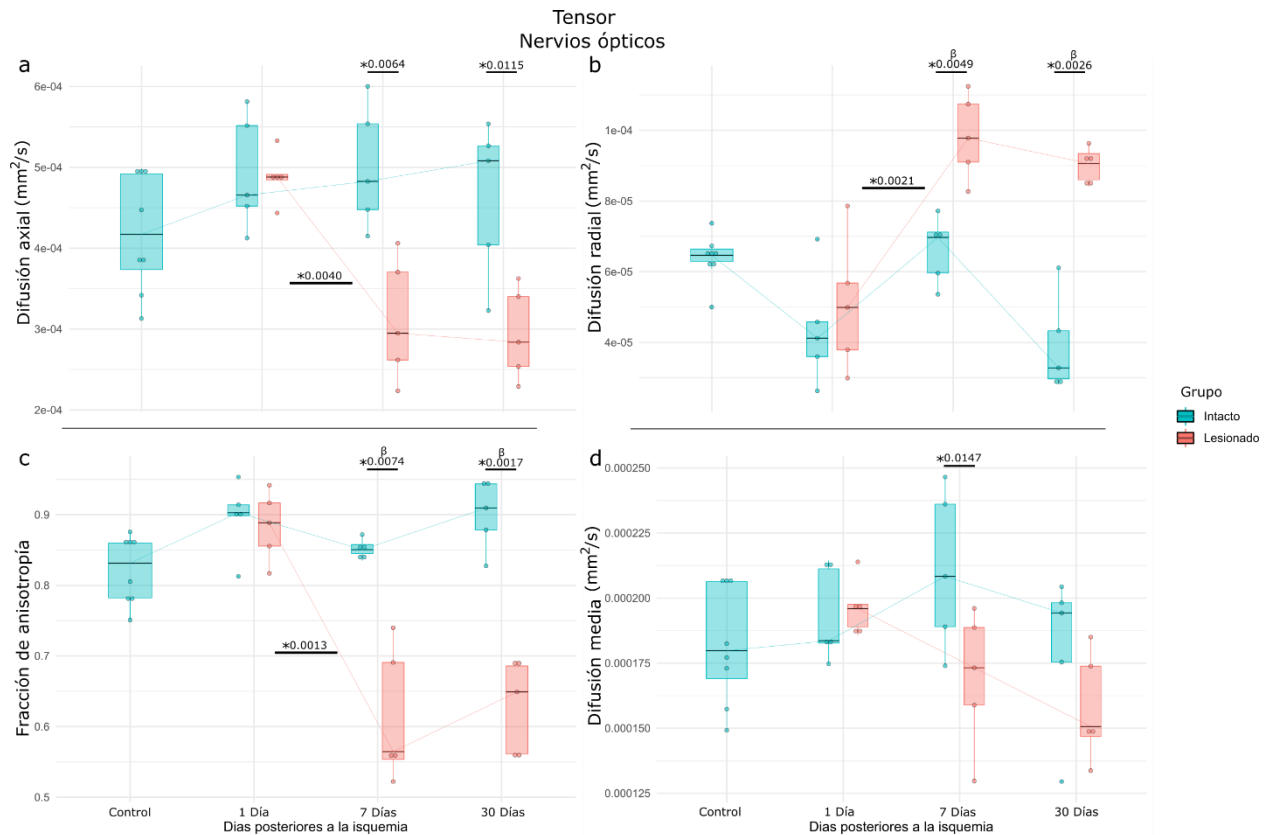


Figura 20. Resultados derivados del modelo del tensor en 4 intervalos. En a los valores obtenidos para la difusión axial, b para difusión radial, en c la fracción de anisotropía y en d la difusión media. Cada una de estas métricas con datos de cada intervalo. *p<0.05

en relación al nervio contralateral inter-grupo o intra-grupo. $\beta p < 0.05$ después de comparación múltiple con p corregida con método de FDR.

Los análisis con el modelo MRDS en nervios ópticos (figura 21) tienen un comportamiento intra e inter-grupo similares a los del modelo del tensor, sin embargo, el día 30 post lesión presenta una tendencia a incrementar y que no es estadísticamente significativo en el nervio dañado con respecto al grupo de 7 días para FA y AD.

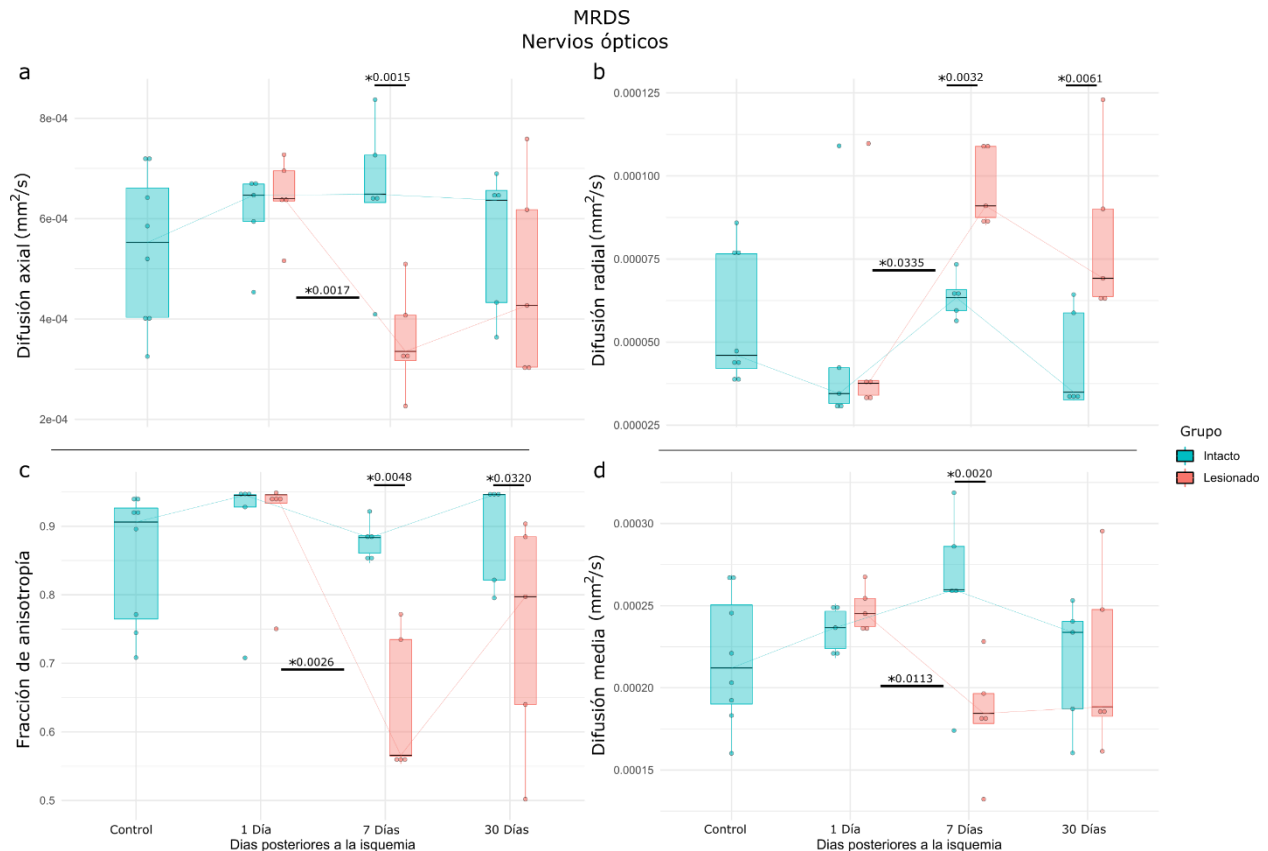


Figura 21. Resultados derivados de MRDS en nervios ópticos. En a los valores obtenidos para la difusión axial, b para difusión radial, en c la fracción de anisotropía y en d la difusión media. Cada una de estas métricas con datos de cada intervalo. * $p < 0.05$ en relación al nervio contralateral inter-grupo o intra-grupo.

Derivado de las métricas del modelo CSD en los nervios ópticos (figura 22), podemos observar que la AFD en condición control y un día post lesión son muy similares, sin diferencias significativas entre la población el nervio intacto y el dañado. Los cambios son observables en el día 7 post lesión, con un decremento (0.560 ± 0.0320) que se

mantiene de manera similar sin diferencias estadísticamente significativas en el grupo de treinta días posteriores a la realización de la isquemia retiniana (0.699 ± 0.0686).

Para complejidad ocurre lo contrario, es decir, hay un incremento para la condición de daño a partir del día 7 y este se mantiene para el día 30 pero sin diferencias estadísticamente significativas intra e inter grupo.

En dispersión observamos que a partir de los 7 días posteriores al daño existe un incremento, sin embargo, este no tiene diferencias estadísticamente significativas con respecto al contralateral.

Los datos correspondientes al pico máximo de AFD (Peak), tienen la misma tendencia que los observados en AFD a partir del día 7 post lesión.

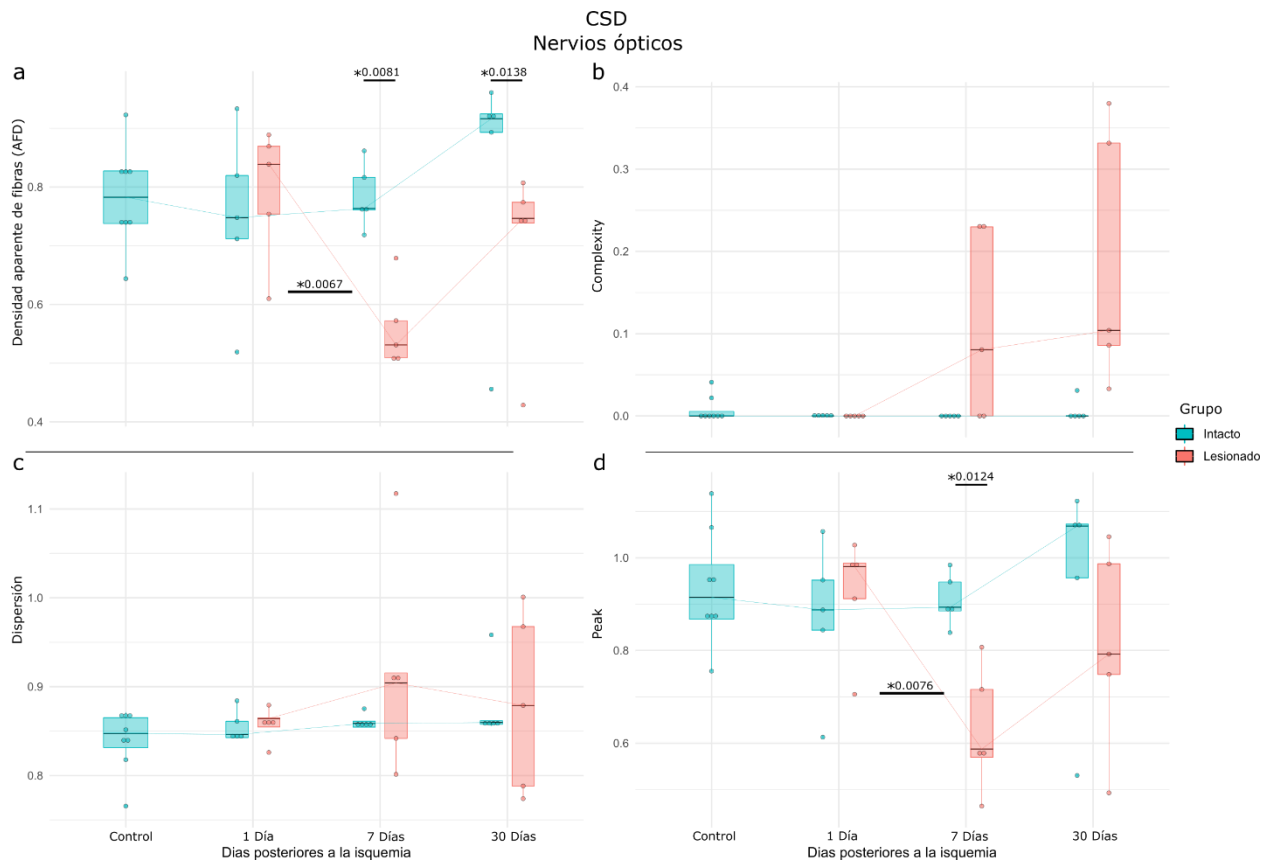


Figura 22. Resultados derivados del modelo CSD en nervios ópticos. En a los valores obtenidos para la densidad aparente de fibras, b para complexity, en c la dispersión y en d para peak. Cada una de estas métricas con datos de cada intervalo. * $p < 0.05$ en relación al nervio contralateral inter-grupo o intra-grupo.

En la figura 23 se encuentra una representación cualitativa de los resultados obtenidos en la región del quiasma óptico con el método MRDS y el modelo CSD. Para el caso del panel superior se observa que los tensores correspondientes al manajo lesionado a partir de 7 días post lesión se vuelve más isotrópico y esto continua para el día 30. En el caso del panel inferior para CSD, la forma de la fODF en el día 1 post lesión para el manajo lesionado, parece tener un incremento, el cual se ve disminuido a partir del día 7 y 30.

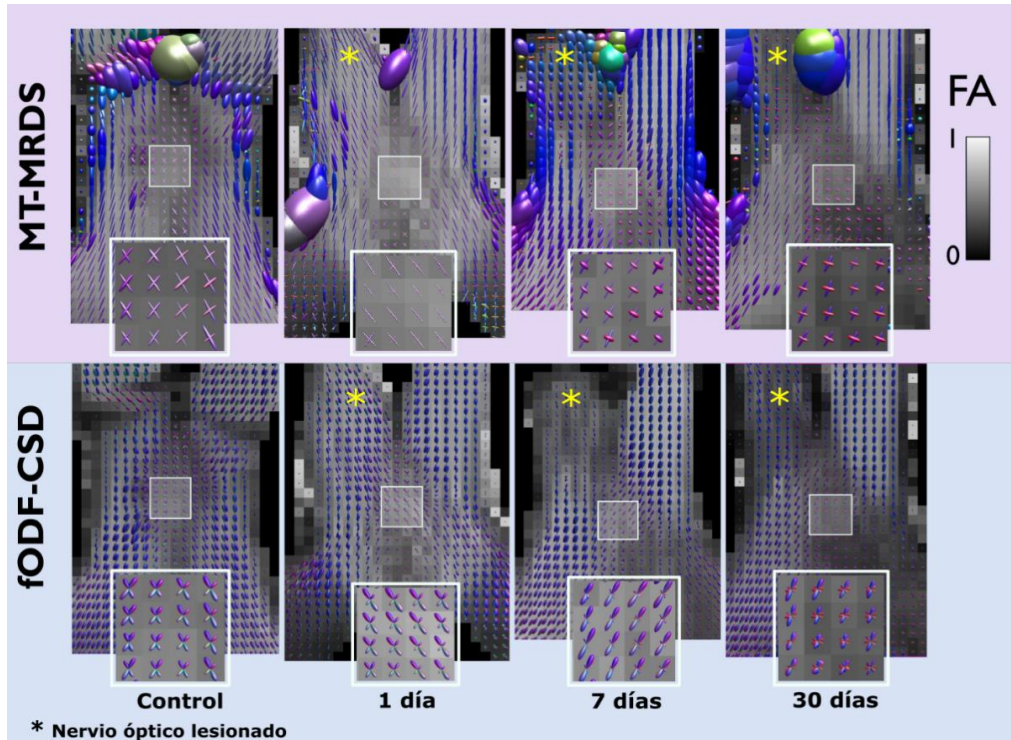


Figura 23. Visualización del método de multi-tensor y CSD en la región del quiasma en distintos intervalos. En el panel superior se muestra la visualización multitensor obtenida con el método MRDS sobre el mapa de FA correspondiente a un sujeto representativo por tiempo post lesión. En el panel inferior se muestran las fODF de los mismos animales.

Respecto a los aspectos cuantitativos y a nivel de grupo, podemos observar con el método MRDS en la región del quiasma se obtuvieron las métricas para cada una de las poblaciones de fibras (figura 24), así, tenemos a la población intacta que decusa para continuar en la porción contralateral del cerebro y de igual manera para la población dañada.

Los valores de FA para el grupo control son similares para ambas poblaciones de axones. Durante la condición de un día post lesión tiende a aumentar, pero sin incremento estadísticamente significativo. Los cambios ocurren en el séptimo día post lesión, en el cual se observa un decremento de la FA en la población de fibras dañadas (0.673 ± 0.0213). Al igual que la condición anterior, el grupo de 30 días post lesión tiene un decremento (0.752 ± 0.0412) estadísticamente significativo en relación con el nervio contralateral (0.857 ± 0.0378) correspondiente. En el caso de la difusión media y axial se presenta una distribución de los datos de manera similar a FA, un decremento a partir de los 7 días post lesión.

La difusión radial presenta cambios a partir del séptimo día después de la lesión en la población afectada, sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas sino hasta los 30 días post lesión en el dañado (0.0000599 ± 0.00000708) con respecto al nervio contralateral (0.0000453 ± 0.00000818).

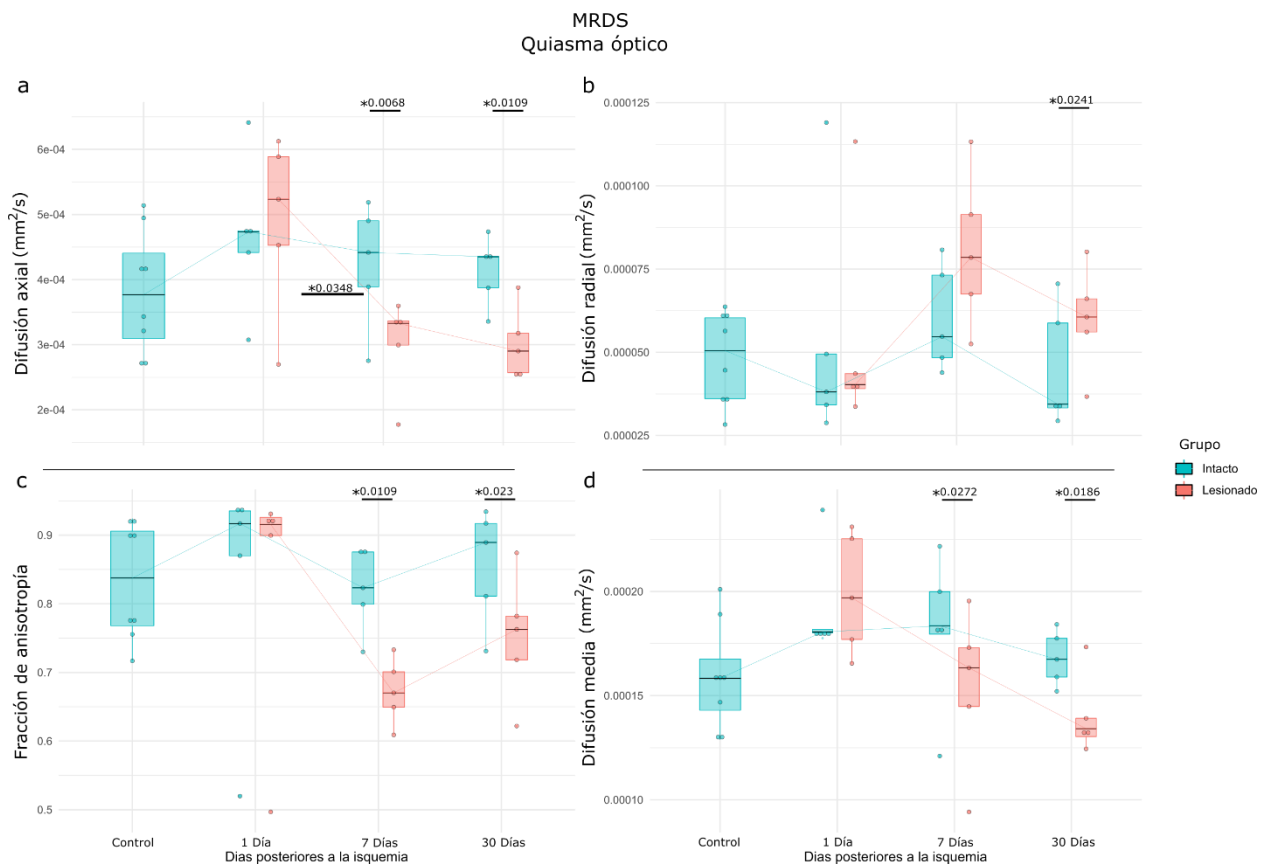


Figura 24. Resultados de MRDS en quiasma óptico por población de fibras. En a los valores obtenidos para la difusión axial, b para difusión radial, en c la fracción de anisotropía y en d la difusión media. Cada una de estas métricas con datos de cada intervalo.

Por último, con el modelo CSD en quiasma óptico se obtuvo un decremento estadísticamente significativo en AFD (0.200 ± 0.0280), dispersión (0.950 ± 0.0344) y peak (0.210 ± 0.0264) para las fibras correspondientes al nervio dañado en el día 7 y se mantiene de forma similar en el día 30 (figura 25). En el día 1 post lesión se observa una tendencia a disminuir en AFD y peak con respecto a la condición control.

Otra de las métricas derivadas es complejidad, la cual es elevada para los grupos control y el día uno posterior a la lesión, y se tiende a reducirse para el día 7 y se mantiene para el día 30.

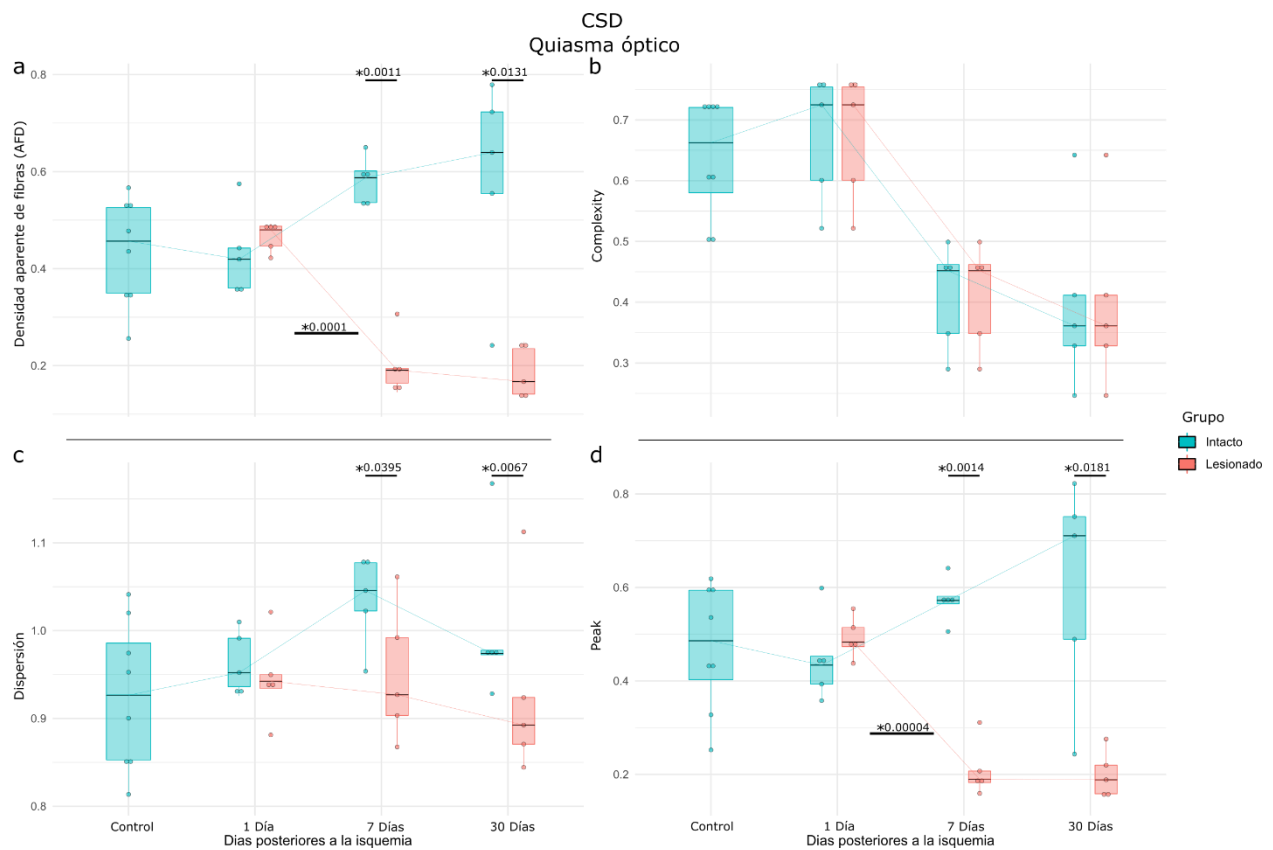


Figura 25. Resultados derivados del modelo CSD en quiasma óptico por población de fibras. En a los valores obtenidos para la densidad aparente de fibras, b para complexity, en c la dispersión y en d para peak. Cada una de estas métricas con datos de cada intervalo. *p<0.05 en relación al nervio contralateral inter-grupo o intra-grupo.

8.3 RESONANCIA MAGNÉTICA E HISTOLOGÍA

Al comparar los resultados obtenidos mediante resonancia magnética con los histológicos, podemos observar que una de las métricas que mayor correlación tiene es AFD con FVA. Ambas métricas son representadas en la figura 26. FVA y AFD son altas en los controles y en un día posterior a la isquemia, pero para el grupo lesionado, a partir de 7 días post isquemia hay un decremento de ambos parámetros.

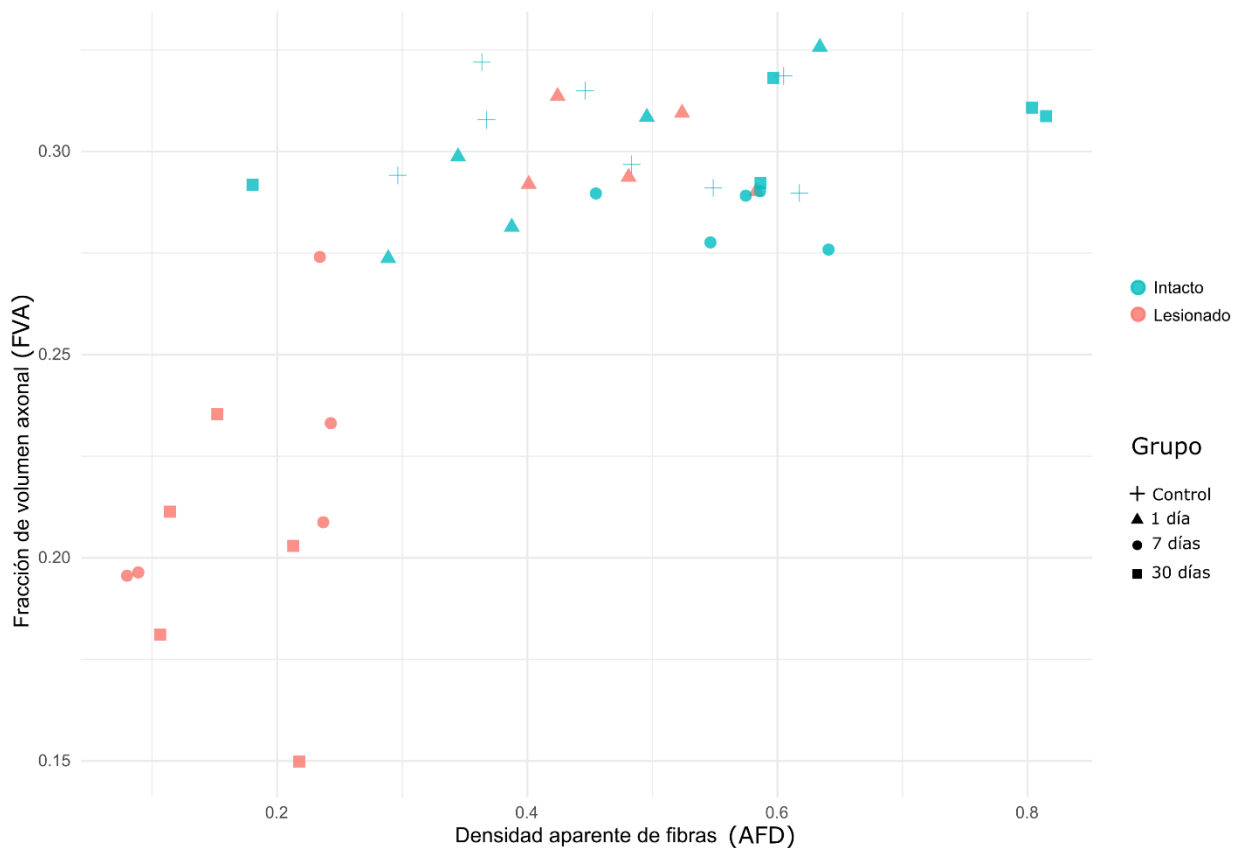


Figura 26. Relación entre fracción de volumen axonal y densidad aparente de fibras en quiasma óptico. Los distintos intervalos, control, 1, 7 y 30 días, están representados con

Figura 28. Matriz de correlación de parámetros histológicos con los de resonancia magnética en quiasma óptico. En color se observan las correlaciones con una $p < 0.05$ después de ser corregidas por el método *FDR*, en rojo se encuentran las correlaciones negativas y en azul las positivas.

9 – DISCUSIÓN

Los resultados observados en la morfología axonal de nervios ópticos intactos para cada grupo, son consistentes con lo descrito en la literatura (Adachi *et al.*, 1996; Peters, 1970; Renner *et al.*, 2017; Rojas-Vite *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2003). El arreglo y distribución axonal es homogéneo a lo largo del nervio óptico, logrando observar algunas características como, capilares regulares, una alta densidad axonal y de mielina, en la cual esta última se encuentra en una forma compacta casi en su totalidad, aunque existen una minoría de inclusiones intralaminares debido al proceso de fijación del tejido.

Sin embargo, el arreglo de los axones intactos se ve modificado a partir de los 7 días posteriores a la lesión. El cambio más evidente es la reducción considerable de la densidad axonal que puede ser observado en la atrofia del nervio óptico por una reducción de su área total. El decremento observado es consecuencia del proceso de degeneración axonal, el cual comienza con edema axonal, consecuentemente infiltración interlaminar y degradación de mielina de una manera fragmentada y tiempo dependiente, en el que para una fase crónica se puede observar la degradación de los restos celulares, llevado a cabo por células gliales. En la fase crónica principalmente se hallan cuerpos lipídicos, y particularmente por el tipo de tinción, mayores cúmulos densos relacionados a axones colapsados (Beirowski *et al.*, 2005; Conforti *et al.*, 2014; Lampert & Cressman, 1966; Peters, 1970; Tricaud & Park, 2017)

Las alteraciones histológicas descritas cualitativamente nos dan un panorama general del estado de la microestructura, sin embargo, es necesario obtener más información de ella para buscar una mayor precisión en la evaluación de la fase en la que se podría encontrar el tejido durante una patología. Los parámetros morfológicos derivados de la segmentación automática como la densidad axonal es una buena aproximación general para la pérdida axonal en relación al área total.

En este estudio, la densidad axonal muestra ser una métrica muy informativa y constante para las condiciones control/intacto y además para la condición experimental. Esto es importante mencionar porque dos de las métricas obtenidas con los modelos utilizados para el análisis de las imágenes sensibles a difusión que se han visto relacionadas con el daño axonal es AFD de CSD y difusión axial por parte del modelo del tensor (Rojas-Vite *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2003; Aung, Mar, & Benzinger, 2013), las cuales muestran significativamente una reducción a partir del día 7 y que corresponde con lo observado con la histología con una correlación positiva en métricas como densidad axonal y FVA.

El diámetro axonal es otro parámetro que se ve incrementado a partir de los 7 días post-lesion. Se esperaría un incremento en el diámetro axonal en las fases agudas debido al edema axonal existente, sin embargo, esto no sería de esta manera en fases crónicas de la degeneración Walleriana (Knoferle *et al.*, 2010). Este efecto principalmente está relacionado a que, durante el proceso de degeneración, se ha observado que los axones con menor calibre son más susceptibles a ser degradados (Campbell, Worrall, & Mahad, 2014; Payne, Bartlett, Harvey, Dunlop, & Fitzgerald, 2012). De manera similar, el grosor de la mielina está incrementado en días 7 y 30 post lesión, lo cual es contrario a lo reportado durante situaciones patológicas. Esto se ha observado en segmentación automática en la condición crónica (35 semanas post isquemia retiniana) y el incremento aparente de estos valores se debe a que el método de segmentación no tiene la sensibilidad de detectar que la mielina en proceso de degradación (Rojas-Vite *et al.*, 2019). En otras palabras, el incremento del grosor de la mielina aquí reportado obedece a un artefacto en su medición, que considera las inclusiones intra-mielínicas como parte del grosor total de las capas.

La fracción de volumen axonal y de mielina son dos métricas que pueden otorgar una mejor aproximación al estado general del nervio óptico. Dado que ambas se encuentran relacionadas a la proporción de axones y mielina presentes en el área total.

La cantidad de mielina durante la degeneración Walleriana en nervio óptico por isquemia retiniana ha sido cuantificada anteriormente con inmunohistoquímica (Sun *et al.*, 2008). En el estudio de Sun y colaboradores se observó que existe una reducción de PBM en etapas intermedias de la degeneración. El decremento de la proporción de mielina es

consistente con la reducción de FVM en el presente trabajo. De igual manera en ese estudio, observaron con el marcador NF fosforilados, que identifica alteraciones axonales relacionadas a muerte neuronal, un decremento significativo en sus niveles de expresión a partir del día 3 postlesión (Knoflerle et al., 2010; Sun et al., 2008). Además, Renner y colaboradores en 2017 realizaron diversos marcajes con tinciones e inmunohistoquímica en un modelo de isquemia retiniana y observaron 21 días post lesión, una reducción en marcaje con hematoxilina y eosina, azul de toluidina, proteína básica de mielina y SMI-32 para neurofilamentos, comparado con el grupo control (Renner *et al.*, 2017). Los resultados aquí mostrados sobre densidad axonal, fracción de volumen axonal y de mielina en los días 7 y 21 son apoyados por los trabajos anteriormente descritos, una evidencia del daño axonal y pérdida de mielina durante la degeneración Walleriana (Renner *et al.*, 2017).

En el presente trabajo se utilizó como primer intervalo un día post lesión, en el cual se esperaba observar cambios morfológicos, principalmente relacionados con la etapa aguda como lo es el edema axonal, sin embargo, no se observaron diferencias significativas con respecto a los controles en ninguna métrica histológica ni de las imágenes sensibles a difusión. Se ha observado en un modelo de *crush* en nervio ciático de la rata cambios existente a partir de las primeras 37 hrs. (Beirowski *et al.*, 2005). Esta técnica permite una visualización con mayor extensión y la progresión de la fragmentación axonal. Por lo que sería relevante utilizar algún marcador de estas características para observaren la progresión temprana del daño (Beirowski *et al.*, 2005; Knoflerle *et al.*, 2010).

Por otro lado, en un estudio de Song y colaboradores de 2003, en el cual, con imágenes sensibles a difusión por resonancia magnética *in vivo*, se observó cambios en métricas del tensor a partir de 3 días post lesión sin observar cambios a un día posterior (Song *et al.*, 2003). Esto último es consistente con los resultados en el presente trabajo, ya que no observamos diferencias estadísticamente significativas en ninguna métrica de los modelos de análisis. De lo cual es importante resaltar que aquí se utilizó una mayor resolución, mayores direcciones de difusión y valores de b en una adquisición *ex vivo*. Mostrando que mejorar los parámetros de adquisición no es posible observar, con los

aquí utilizados, cambios sutiles en la microestructura por degeneración Walleriana (Knöferle *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2003).

La segmentación automática para cortes histológicos en la región del quiasma óptico resulta complicada, debido a que la decusación de las fibras no ocurre de una manera ordenada, por lo que al realizar cortes en la región se obtienen distintas morfologías en las micrografías (Colello & Guillery, 1998). Es así que se pueden visualizar axones circulares como en nervio óptico, pero también estructuras muy oblicuas dependiendo del ángulo en el que los axones fueron seccionados. Esta amplia variabilidad de formas no permite obtener un solo set de parámetros de segmentación adecuado.

Anatómicamente en las ratas, las fibras provenientes de cada uno de los nervios ópticos decusa en más del 90 % y el resto continúa por la vía ipsilateral (Jeffery & Erskine, 2005). Es por ello que se optó por tomar la información histológica de cada uno de los nervios ópticos para relacionarla con las respectivas métricas de dMRI.

Anteriormente se observó la correlación de parámetros histológicos con los obtenidos con CSD, MRDS y DIAMOND en la región del quiasma en fase crónica (35 días posterior) del modelo de isquemia retiniana. Este trabajo es consistente con dichos hallazgos, mostrando, que existe una correspondencia de parámetros histológicos con los de resonancia magnética en la región del quiasma óptico. Una de las principales correlaciones con CSD es la densidad aparente de fibras con la densidad axonal, FVA y MVF. Para el caso de MRDS, una de las métricas con mayor correlación es la difusión axial con FVA y MVF en la condición de daño (Rojas-Vite *et al.*, 2019). En el presente trabajo los principales cambios en la microestructura ocurren a partir de los 7 días post lesión y esto puede ser observado en los parámetros obtenidos de los dos modelos de análisis de imágenes sensibles a difusión. En este estado a pesar de que podría ser considerado como una fase temprana, ya es evidente la pérdida y degeneración axonal en muchos resultados incluso similares a los de los 30 días post lesión.

Por esta situación sería interesante en estudios posteriores analizar el estado morfológico axonal a 3 días post lesión y de ser posible un estadio intermedio de 2 días.

Es relevante el análisis de estos intervalos, en esta etapa aguda de la degeneración Walleriana es donde pueden existir procesos de neuroprotección y/o regeneración de la mielina para una conservación de la microestructura durante el desarrollo de una patología y así evitar la continua progresión del daño (Lingor, Koch, Tönges, & Bähr, 2012; Tang, 2019).

Además de lo relacionado con los resultados aquí presentes, es importante conocer bien las limitaciones de la metodología utilizada, como lo es el uso de la segmentación automática de las imágenes histológicas. De esta manera, el programa utilizado (AxonSeg) ha mostrado resultados confiables en segmentación de imágenes de microscopía óptica, con una precisión alrededor del 83 % y una sensibilidad de 88 %. Sin embargo, puede existir variabilidad dependiendo de la calidad de la microfotografía, el enfoque, la iluminación con lo que puede dar un incremento de los falsos positivos y negativos (Zaimi *et al.*, 2016). Actualmente se siguen desarrollando nuevos softwares como AxonDeepSeg, basado en entrenamiento por *machine learning* y evitar en lo posible los errores de cuantificación (Zaimi *et al.*, 2018). Existen además otras alternativas que permitan obtener mayor información de regiones más complejas como con el uso de segmentación tridimensional de bloques de histología por microscopía electrónica (Abdollahzadeh, Belevich, Jokitalo, Tohka, & Sierra, 2019; Salo *et al.*, 2018).

En cuanto a la resonancia magnética existen algunos puntos a considerar con la parte técnica. Por ejemplo, en este trabajo se logró alcanzar una muy buena resolución espacial de 80 micras, con valores *shells* elevados. Sin embargo, es importante la continua exploración de mejores parámetros y formas de adquisición de las imágenes sensibles a difusión, así como modelos de análisis que permitan obtener una mayor información de la microestructura.

En conclusión, el presente trabajo provee validación histológica a métricas derivadas de imágenes sensibles a difusión en condiciones normales y de daño, particularmente por degeneración axonal de tipo Walleriana en distintos intervalos en la región del quiasma óptico. Los cambios axonales notorios se observaron a partir del séptimo día post lesión, en el cual se existe correlación con las métricas derivadas por resonancia magnética.

Además, este estudio otorga mayor información para la interpretación de diagnósticos clínicos mediante el uso de resonancia magnética durante etapas tempranas de una degeneración axonal en regiones con decusación de fibras.

10- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahzadeh, A., Belevich, I., Jokitalo, E., Tohka, J., & Sierra, A. (2019). Automated 3D Axonal Morphometry of White Matter. *Scientific Reports*, 9, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42648-2>
- Adachi, M., Takahashi, K., Nishikawa, M., Miki, H., & Uyama, M. (1996). High intraocular pressure-induced ischemia and reperfusion injury in the optic nerve and retina in rats. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 234(7), 445–451. <https://doi.org/10.1007/BF02539411>
- Alexander, A. L., Lee, J. E., Lazar, M., & Field, A. S. (2007). Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4(3), 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.05.011>
- Assaf, Y., & Pasternak, O. (2008). Diffusion tensor imaging (DTI)-based white matter mapping in brain research: A review. *Journal of Molecular Neuroscience*, 34(1), 51–61. <https://doi.org/10.1007/s12031-007-0029-0>
- Auriat, A. M., Borich, M. R., Snow, N. J., Wadden, K. P., & Boyd, L. A. (2015). Comparing a diffusion tensor and non-tensor approach to white matter fiber tractography in chronic stroke. *NeuroImage: Clinical*, 7, 771–781. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2015.03.007>
- Avants, B. B., Tustison, N. J., Stauffer, M., Song, G., Wu, B., & Gee, J. C. (2014). The Insight ToolKit image registration framework. *Frontiers in Neuroinformatics*, 8, 44. <https://doi.org/10.3389/fninf.2014.00044>
- Basser, P. J., Mattiello, J., & LeBihan, 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)
- Beaulieu, C. (2002). The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - A technical review. *NMR in Biomedicine*, 15(7–8), 435–455. <https://doi.org/10.1002/nbm.782>
- Beaulieu, C., Does, M. D., Snyder, R. E., & Allen, P. S. (1996). Changes in water diffusion due to Wallerian degeneration in peripheral nerve. *Magnetic Resonance in Medicine*, 36(4), 1–5. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910360419>
- Beirowski, B., Adalbert, R., Wagner, D., Grumme, D. S., Addicks, K., Ribchester, R. R., & Coleman, M. P. (2005). The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (Wld S) nerves. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-6-6>
- Campbell, G. R., Worrall, J. T., & Mahad, D. J. (2014). The central role of mitochondria in axonal degeneration in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 20(14), 1806–1813. <https://doi.org/10.1177/1352458514544537>

- Charles, P., Hernandez, M. P., Stankoff, B., Aigrot, M. S., Colin, C., Rougon, G., ... Lubetzki, C. (2000). Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(13), 7585–7590. <https://doi.org/10.1073/pnas.100076197>
- Colello, S. J., & Guillery, R. W. (1998). European Neuroscience Association The changing pattern of fibre bundles that pass through the optic chiasm of mice . *European Journal of Neuroscience*, *10*(12), 3653–3663. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00416.x>
- 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>
- Concha, L, Gross, D. W., Wheatley, B. M., & Beaulieu, C. (2006). Diffusion tensor imaging of time-dependent axonal and myelin degradation after corpus callosotomy in epilepsy patients. *NeuroImage*, *32*(3), 1090–1099. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.04.187>
- Concha, L, Livy, D. J., Beaulieu, C., Wheatley, B. M., & Gross, D. W. (2010). In Vivo Diffusion Tensor Imaging and Histopathology of the Fimbria-Fornix in Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*, *30*(3), 996–1002. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1619-09.2010>
- Concha, Luis. (2008). Diffusion tensor tractography in temporal lobe epilepsy, 266. Retrieved from http://personal.inb.unam.mx/lconcha/documents/tesis_phd_luisconcha.pdf
- Conforti, L., Gilley, J., & Coleman, M. P. (2014). Wallerian degeneration : an emerging axon death pathway linking injury and disease. *Nature Publishing Group*, *15*(6), 394–409. <https://doi.org/10.1038/nrn3680>
- Coronado-Leija, R., Ramirez-Manzanares, A., & Marroquin, J. L. (2017). Estimation of individual axon bundle properties by a Multi-Resolution Discrete-Search method. *Medical Image Analysis*, *42*, 26–43. <https://doi.org/10.1016/J.MEDIA.2017.06.008>
- Dhollander, T., Raffelt, D., & Connelly, A. (2016). Unsupervised 3-tissue response function estimation from single-shell or multi-shell diffusion MR data... *Conference: ISMRM Workshop on Breaking the Barriers of Diffusion MRI*, (September), 1–2.
- Edgar, J. M., & Griffiths, I. R. (2014). Diffusion Mri for Quantitative Measurement a Microscopist ' S View. In H. Johansen-Berg & T. E. J. Behrens (Eds.), *Diffusion MRI* (1st ed., pp. 73–103). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374709-9.00005-5>
- Einstein, A. (1905). On the Motion of Small Particles Suspended in a Stationary Liquid, as Required by the Molecular Kinetic Theory of Heat. *Annalen Der Physik*, *322*, 549–560. <https://doi.org/10.1002/andp.19053220806>
- Fanarraga, M. L., Griffiths, I. R., Zhao, M., & Duncan, I. D. (1998). Oligodendrocytes are not inherently programmed to myelinate a specific size of axon. *Journal of Comparative Neurology*, *399*(1), 94–100. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980914\)399:1<94::AID-CNE7>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980914)399:1<94::AID-CNE7>3.0.CO;2-5)
- Farquharson, S., Tournier, J. D., Calamante, F., Fabinyi, G., Schneider-Kolsky, M., Jackson, G. D., & Connelly, A. (2013). White matter fiber tractography: Why we need to move beyond DTI. *Journal of Neurosurgery*, *118*(6), 1367–1377.

<https://doi.org/10.3171/2013.2.JNS121294>

- Forrester, J., McMenamin, P., Dick, A., & Pearlman, E. (2016). *The Eye, Basic Sciences in Practice. Clinical and Experimental Optometry* (Fourth).
<https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2008.00321.x>
- George, R., & Griffin, J. W. (1994). Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiculotomy model. *Experimental Neurology*, 129(2), 225–236.
- George, E., Glass, J., & Griffin, J. (1995). Axotomy-Induced Axonal Degeneration Is Mediated by Calcium Influx Through Ion-Specific Channels. *The Journal of Neuroscience*, 15(10), 6445–6452.
- Graessner, J. (2011). Frequently Asked Questions: Diffusion-Weighted Imaging (DWI). *Magnetom Flash*, 84–87.
- Grussu, F., Schneider, T., Tur, C., Yates, R. L., Tachrount, M., İlanuş, A., ... Gandini W C. (2017). Neurite dispersion: a new marker of multiple sclerosis spinal cord pathology? *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 4(9), 663–679.
<https://doi.org/10.1002/acn3.445>
- Gulani, V., Webb, a G., Duncan, I. D., & Lauterbur, P. C. (2001). Apparent diffusion tensor measurements in myelin-deficient rat spinal cords. *Magnetic Resonance in Medicine : Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 45(2), 191–195.
[https://doi.org/10.1002/1522-2594\(200102\)45:2<191::AID-MRM1025>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1522-2594(200102)45:2<191::AID-MRM1025>3.0.CO;2-9)
- Hahn, E. L. (1950). Spin Echoes. *Physical Review*, 80(4), 580–594.
<https://doi.org/10.1103/PhysRev.80.580>
- Hildebrand, C., Remahl, S., Persson, H., & Bjartmar, C. (1993). Myelinated nerve fibres in the CNS. *Progress in Neurobiology*, 40(3), 319–384.
[https://doi.org/10.1016/0301-0082\(93\)90015-K](https://doi.org/10.1016/0301-0082(93)90015-K)
- Jeffery, G., & Erskine, L. (2005). Variations in the architecture and development of the vertebrate optic chiasm. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24(6), 721–753.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2005.04.005>
- Jenkinson, M., Beckmann, C. F., Behrens, T. E. J., Woolrich, M. W., & Smith, S. M. (2012). FSL. *NeuroImage*, 62(2), 782–790.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.09.015>
- Jeurissen, B, Leemans, A., Tournier, J. D., Jones, D. K., & Sijbers, J. (2013). Investigating the prevalence of complex fiber configurations in white matter tissue with diffusion magnetic resonance imaging. *Human Brain Mapping*, 34(11), 2747–2766. <https://doi.org/10.1002/hbm.22099>
- Jeurissen, Ben, Tournier, J. D., Dhollander, T., Connelly, A., & Sijbers, J. (2014). Multi-tissue constrained spherical deconvolution for improved analysis of multi-shell diffusion MRI data. *NeuroImage*, 103, 411–426.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.07.061>
- Kellner, E., Dhital, B., Kiselev, V. G., & Reisert, M. (2016). Gibbs-ringing artifact removal based on local subvoxel-shifts. *Magnetic Resonance in Medicine*, 76(5), 1574–1581. <https://doi.org/10.1002/mrm.26054>
- Knoferle, J., Koch, J. C., Ostendorf, T., Michel, U., Planchamp, V., Vutova, P., ... Lingor, P. (2010). Mechanisms of acute axonal degeneration in the optic nerve in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(13), 6064–6069.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.0909794107>
- Lampert, P. W., & Cressman, M. R. (1966). Fine-structural changes of myelin sheaths after axonal degeneration in the spinal cord of rats. *Am. J. Pathol.*, *49*(3), 1139–1155.
- Lingor, P., Koch, J. C., Tönges, L., & Bähr, M. (2012). Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS. *Cell and Tissue Research*, *349*(1), 289–311. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1362-3>
- Liu, M., Gross, D. W., Wheatley, B. M., Concha, L., & Beaulieu, C. (2013). The acute phase of Wallerian degeneration: Longitudinal diffusion tensor imaging of the fornix following temporal lobe surgery. *NeuroImage*, *74*, 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.01.069>
- Mata, M., Staple, J., & Fink, D. J. (1986). Changes in intra-axonal calcium distribution following nerve crush. *Journal of Neurobiology*, *17*(5), 449–467. <https://doi.org/10.1002/neu.480170508>
- Ouardouz, M., Nikolaeva, M. A., Coderre, E., Zamponi, G. W., McRory, J. E., Trapp, B. D., ... Stys, P. K. (2003). Depolarization-induced Ca²⁺ release in ischemic spinal cord white matter involves L-type Ca²⁺ channel activation of ryanodine receptors. *Neuron*, *40*(1), 53–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14527433>
- Pavelka, M., & Roth, J. (2015). *Functional Ultrastructure. Functional Ultrastructure*. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1830-6>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2004). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set*. Academic Press (5th ed.).
- Payne, S. C., Bartlett, C. A., Harvey, A. R., Dunlop, S. A., & Fitzgerald, M. (2012). Myelin sheath decompaction, axon swelling, and functional loss during chronic secondary degeneration in rat optic nerve. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *53*(10), 6093–6101. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10080>
- Perry, H. V. (2005). Inflammation and axon degeneration. In G. S. Waxman (Ed.), *Multiple Sclerosis As A Neuronal Disease* (pp. 241–253).
- Peters, A. (1970). The Fixation of Central Nervous Tissue and the Analysis of Electron Micrographs of the Neuropil, with Special Reference to the Cerebral Cortex. In W. Nauta & S. Ebbesson (Eds.), *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy* (pp. 56–76). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-85986-1>
- Preibisch, S., Saalfeld, S., & Tomancak, P. (2009). Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *25*(11), 1463–1465. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp184>
- Qin, W., Zhang, M., Piao, Y., Guo, D., Zhu, Z., Tian, X., ... Yu, C. (2012). Wallerian degeneration in central nervous system: Dynamic associations between diffusion indices and their underlying pathology. *PLoS ONE*, *7*(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041441>
- 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>
- Renner, M., Stute, G., Alzureiqi, M., Reinhard, J., Wiemann, S., Schmid, H., ... Kyriaki Thermos, A. (2017). Optic Nerve Degeneration after Retinal Ischemia/Reperfusion

- in a Rodent Model. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00254>
- Robert, B. (1828). A brief account of microscopical observations made on the particles contained in the pollen of plants. *Philosophical Magazine*, 4, 161–173.
- Rojas-Vite, G., Coronado-Leija, R., Narvaez-Delgado, O., Ramírez-Manzanares, A., Marroquín, J. L., Noguez-Imm, R., ... Concha, L. (2019). Histological validation of per-bundle water diffusion metrics within a region of fiber crossing following axonal degeneration. *NeuroImage*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116013>
- Rosenbloom, M., Sullivan, E. V., & Pfefferbaum, A. (2003). Using magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging to assess brain damage in alcoholics. *Alcohol Research and Health*, 27(2), 146–152.
- Salo, R. A., Belevich, I., Manninen, E., Jokitalo, E., Gröhn, O., & Sierra, A. (2018). Quantification of anisotropy and orientation in 3D electron microscopy and diffusion tensor imaging in injured rat brain. *NeuroImage*, 172, 404–414. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.01.087>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2013). Fiji-an Open Source platform for biological image analysis. *Nature Methods*, 9(7). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schlaepfer, W. W., & Hasler, M. B. (1979). Characterization of the calcium-induced disruption of neurofilaments in rat peripheral nerve. *Brain Research*, 168(2), 299–309. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90171-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90171-9)
- Song, S. K., Sun, S. W., Ju, W. K., Lin, S. J., Cross, A. H., & Neufeld, A. H. (2003). Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia. *NeuroImage*, 20(3), 1714–1722. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2003.07.005>
- Stejskal, E. O., & Tanner, J. E. (1965). Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *The Journal of Chemical Physics*, 42(1), 288–292. <https://doi.org/10.1063/1.1695690>
- Sun, S.-W., Liang, H.-F., Cross, A. H., & Song, S.-K. (2008). Evolving Wallerian Degeneration after Transient Retinal Ischemia in Mice Characterized by Diffusion Tensor Imaging. *NeuroImage*, 40(1), 1–10. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2276530/pdf/nihms-41398.pdf>
- Takahashi, K., Lam, T. T., Edward, D. P., Buchi, E. R., & Tso, M. O. (1992). Protective effects of flunarizine on ischemic injury in the rat retina. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 110(6), 862–870. Retrieved from
- Tang, B. (2019). Why is NMNAT Protective against Neuronal Cell Death and Axon Degeneration, but Inhibitory of Axon Regeneration? *Cells*, 8(3), 267. <https://doi.org/10.3390/cells8030267>
- Tang, L., & Zhou, X. J. (2019). Diffusion MRI of cancer: From low to high b-values. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 49(1), 23–40. <https://doi.org/10.1002/jmri.26293>
- Thomalla, G., & Glauche, V. (2005). Time course of wallerian degeneration after ischaemic stroke revealed by diffusion tensor imaging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76, 266–268. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.046375>
- Tournier, J. D., Smith, R., Raffelt, D., Tabbara, R., Dhollander, T., Pietsch, M., ... Connelly, A. (2019). MRtrix3 : A fast, flexible and open software framework for medical image processing and visualisation. *BioRxiviv, Pre-print*.

<https://doi.org/10.1101/551739>

- Tournier, J. D., Calamante, F., & Connelly, A. (2007). Robust determination of the fiber orientation distribution in diffusion MRI: Non-negativity constrained super-resolved spherical deconvolution. *NeuroImage*, 35(4), 1459–1472.
- Tournier, J. D., Calamante, F., Gadian, D. G., & Connelly, A. (2004). Direct estimation of the fiber orientation density function from diffusion-weighted MRI data using spherical deconvolution. *NeuroImage*, 23(3), 1176–1185.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.07.037>
- Tournier, J. D., Calamante, F., Gadian, D. G., & Connelly, A. (2004). Direct estimation of the fiber orientation density function from diffusion-weighted MRI data using spherical deconvolution. *NeuroImage*, 23(3), 1176–1185.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.07.037>
- Tournier, J. D., Mori, S., & Leemans, A. (2011). Diffusion Tensor Imaging and Beyond. *Magnetic Resonance in ...*, 65(6), 1532–1556.
<https://doi.org/10.1002/mrm.22924>
- Tricaud, N., & Park, H. T. (2017). Wallerian demyelination: chronicle of a cellular cataclysm. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 74(22), 4049–4057.
<https://doi.org/10.1007/s00018-017-2565-2>
- Tsao, J. W., Brown, M. C., Carden, M. J., McLean, W. G., & Perry, V. H. (1994). Loss of the Compound Action Potential: an Electrophysiological, Biochemical and Morphological Study of Early Events in Axonal Degeneration in the C57BL/Ola Mouse. *European Journal of Neuroscience*, 6(4), 516–524.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1994.tb00295.x>
- Tustison, N. J., Avants, B. B., Cook, P. A., Yuanjie Zheng, Y., Egan, A., Yushkevich, P. A., & Gee, J. C. (2010). N4ITK: Improved N3 Bias Correction. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 29(6), 1310–1320. <https://doi.org/10.1109/TMI.2010.2046908>
- Veraart, J., Novikov, D. S., Christiaens, D., Ades-aron, B., Sijbers, J., & Fieremans, E. (2016). Denoising of diffusion MRI using random matrix theory. *NeuroImage*, 142, 394–406. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.08.016>
- Walhovd, K. B., Johansen-Berg, H., & Karadottir, R. T. (2014). Unraveling the secrets of white matter-bridging the gap between cellular, animal and human imaging studies. *Neuroscience*, 276, 2–13.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.06.058>
- Waller, A. (1850). Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 140(0), 423–429. <https://doi.org/10.1098/rstl.1850.0021>
- Williams, P. L., & Hall, S. M. (1971). Chronic Wallerian degeneration - an in vivo and ultrastructural study. *Journal of Anatomy*, 109(3), 487–503.
- Yan Aung, W., Mar, S., & Benzinger, T. L. (2013). Diffusion tensor MRI as a biomarker in axonal and myelin damage. *Imaging Med*, 5(5), 427–440.
<https://doi.org/10.2217/iim.13.49>
- Zaimi, A., Duval, T., Gasecka, A., Côté, D., Stikov, N., & Cohen-Adad, J. (2016). AxonSeg: Open Source Software for Axon and Myelin Segmentation and Morphometric Analysis. *Frontiers in Neuroinformatics*, 10(August), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fninf.2016.00037>

Zaimi, A., Wabartha, M., Herman, V., Antonsanti, P.-L., Perone, C. S., & Cohen-Adad, J. (2018). AxonDeepSeg: automatic axon and myelin segmentation from microscopy data using convolutional neural networks. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22181-4>

ii. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de neurona y oligodendrocito

Figura 2. Regiones y componentes celulares de la vía visual

Figura 3. Histopatología de la degeneración Walleriana aguda y crónica

Figura 4. Movimiento del agua isotrópico y anisotrópico

Figura 5. Esquema de una secuencia para adquisición de imágenes sensibles a difusión.

Figura 6. Modelo del tensor en materia blanca

Figura 7. Representación gráfica del modelo del tensor y CSD dependiendo de la orientación de fibras en un voxel.

Figura 8. Orientación local de tractogramas

Figura 9. Cuantificación por resonancia magnética y su relación con histología

Figura 10. Diseño experimental

Figura 11. Modelo de isquemia retiniana

Figura 12. Segmentación axonal de nervio óptico

Figura 13. Representación de los parámetros obtenidos por medio de la cuantificación automática.

Figura 14. Preprocesamiento de las imágenes sensibles a difusión

Figura 15. Acercamientos a regiones de nervios ópticos a diferentes días post isquemia retiniana.

Figura 16. Número total de axones en nervios ópticos intactos y lesionados

Figura 17. Densidad axonal y segmentación automática

Figura 18. Fracción de volumen axonal y de mielina

Figura 19. Resultados de cuantificación del diámetro axonal, tasa-g y grosor de mielina

Figura 20. Resultados derivados del modelo del tensor en 4 intervalos

Figura 21. Resultados derivados de MRDS en nervios ópticos

Figura 22. Resultados derivados del modelo CSD en nervios ópticos

Figura 23. Visualización del método de multi-tensor y CSD en la región del quiasma en distintos intervalos

Figura 24. Resultados de MRDS en quiasma óptico por población de fibras

Figura 25. Resultados derivados del modelo CSD en quiasma óptico por población de fibras

Figura 26. Figura 19. Relación entre fracción de volumen axonal y densidad aparente de fibras

Figura 27. Matriz de correlación de parámetros histológicos con los de resonancia magnética en nervios ópticos

Figura 28. Matriz de correlación de parámetros histológicos con los de resonancia magnética en quiasma óptico

iii. ANEXOS

Anexo 1

Preprocesamiento de imágenes de resonancia.

(https://github.com/onarvaez/dif/blob/master/new_super_reg.sh)

Obtención de métricas derivadas AxonSeg

(https://github.com/onarvaez/AxonSeg_stats_csv)

Anexo 2

Tabla 1. Coeficientes de correlación para nervio óptico

Métrica	Tasa	Diam	Dian	Gros	Are	Are	FVN	FVA	Con	Dens	AFD	Con	Disp	Peak	Difus	Frac	Difus	Difu	Tam	Difus	Frac	Difus	Difu
Tasa-g	1.00	-0.35	-0.42	-0.52	-0.47	-0.36	0.62	0.73	0.65	0.50	0.61	-0.50	-0.31	0.63	0.24	0.43	0.13	-0.42	0.09	0.46	0.57	0.29	-0.52
Diametro axonal	-0.35	1.00	1.00	0.98	0.99	1.00	-0.85	-0.78	-0.76	-0.94	-0.33	0.80	0.56	-0.42	-0.53	-0.54	-0.49	0.40	-0.13	-0.74	-0.78	-0.63	0.54
Diametro axonal+mie	-0.42	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	-0.87	-0.82	-0.79	-0.96	-0.37	0.82	0.57	-0.46	-0.53	-0.56	-0.48	0.43	-0.14	-0.75	-0.81	-0.63	0.57
Grosor de mielina	-0.52	0.98	0.99	1.00	1.00	0.98	-0.90	-0.86	-0.83	-0.96	-0.42	0.83	0.58	-0.51	-0.53	-0.58	-0.47	0.45	-0.14	-0.76	-0.83	-0.62	0.60
Area de mielina	-0.47	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99	-0.88	-0.84	-0.80	-0.95	-0.38	0.83	0.59	-0.47	-0.52	-0.55	-0.46	0.43	-0.16	-0.74	-0.81	-0.61	0.57
Area axonal	-0.36	1.00	1.00	0.98	0.99	1.00	-0.85	-0.78	-0.76	-0.93	-0.32	0.81	0.57	-0.41	-0.51	-0.52	-0.47	0.39	-0.15	-0.73	-0.77	-0.62	0.52
FVM	0.62	-0.85	-0.87	-0.90	-0.88	-0.85	1.00	0.98	0.93	0.94	0.48	-0.87	-0.46	0.53	0.46	0.63	0.33	-0.56	0.16	0.75	0.89	0.53	-0.72
FVA	0.73	-0.78	-0.82	-0.86	-0.84	-0.78	0.98	1.00	0.94	0.91	0.54	-0.83	-0.44	0.58	0.44	0.63	0.30	-0.58	0.15	0.73	0.88	0.49	-0.74
Conteo axonal	0.65	-0.76	-0.79	-0.83	-0.80	-0.76	0.93	0.94	1.00	0.89	0.54	-0.75	-0.34	0.54	0.42	0.64	0.26	-0.63	0.15	0.70	0.89	0.42	-0.80
Densidad axonal	0.50	-0.94	-0.96	-0.96	-0.95	-0.93	0.94	0.91	0.89	1.00	0.46	-0.81	-0.49	0.52	0.56	0.66	0.47	-0.54	0.08	0.80	0.88	0.62	-0.68
AFD	0.61	-0.33	-0.37	-0.42	-0.38	-0.32	0.48	0.54	0.46	1.00	-0.24	-0.22	0.96	0.48	0.62	0.32	-0.64	-0.23	0.49	0.59	0.26	-0.63	
Complexity	-0.50	0.80	0.82	0.83	0.83	0.81	-0.87	-0.83	-0.75	-0.81	-0.24	1.00	0.63	-0.35	-0.48	-0.59	-0.41	0.46	-0.10	-0.71	-0.79	-0.61	0.51
Dispersión	-0.31	0.56	0.57	0.58	0.59	0.57	-0.46	-0.44	-0.34	-0.49	-0.22	0.63	1.00	-0.46	-0.41	-0.49	-0.37	0.35	0.19	-0.36	-0.43	-0.34	0.20
Peak	0.63	-0.42	-0.46	-0.51	-0.47	-0.41	0.53	0.58	0.54	0.52	0.96	-0.35	-0.46	1.00	0.53	0.67	0.38	-0.66	-0.27	0.50	0.61	0.30	-0.59
Difusión axial_mrds	0.24	-0.53	-0.53	-0.53	-0.52	-0.51	0.46	0.44	0.42	0.56	0.48	-0.48	-0.41	0.53	1.00	0.88	0.95	-0.70	-0.67	0.79	0.66	0.75	-0.44
Fracción de anisotrop	0.43	-0.54	-0.56	-0.58	-0.55	-0.52	0.63	0.63	0.64	0.66	0.62	-0.59	-0.49	0.67	0.88	1.00	0.71	-0.91	-0.56	0.78	0.83	0.58	-0.70
Difusión media_mrds	0.13	-0.49	-0.48	-0.47	-0.46	-0.47	0.33	0.30	0.26	0.47	0.32	-0.41	-0.37	0.38	0.95	0.71	1.00	-0.45	-0.64	0.72	0.50	0.80	-0.21
Difusión radial_mrds	-0.42	0.40	0.43	0.45	0.43	0.39	-0.56	-0.58	-0.63	-0.54	-0.64	0.46	0.35	-0.66	-0.70	-0.91	-0.45	1.00	0.46	-0.62	-0.77	-0.33	0.80
Tamaño de compartin	0.09	-0.13	-0.14	-0.14	-0.16	-0.15	0.16	0.15	0.15	0.08	-0.23	-0.10	0.19	-0.27	-0.67	-0.56	-0.64	0.46	1.00	-0.13	-0.05	-0.18	-0.02
Difusión axial_tensor	0.46	-0.74	-0.75	-0.76	-0.74	-0.73	0.75	0.73	0.70	0.80	0.49	-0.71	-0.36	0.50	0.79	0.78	0.72	-0.62	-0.13	1.00	0.87	0.90	-0.64
Fracción de anisotropi	0.57	-0.78	-0.81	-0.83	-0.81	-0.77	0.89	0.88	0.89	0.88	0.59	-0.79	-0.43	0.61	0.66	0.83	0.50	-0.77	-0.05	0.87	1.00	0.60	-0.88
Difusión media_tensc	0.29	-0.63	-0.63	-0.62	-0.61	-0.62	0.53	0.49	0.42	0.62	0.26	-0.61	-0.34	0.30	0.75	0.58	0.80	-0.33	-0.18	0.90	0.60	1.00	-0.24
Difusión radial_tensor	-0.52	0.54	0.57	0.60	0.57	0.52	-0.72	-0.74	-0.80	-0.68	-0.63	0.51	0.20	-0.59	-0.44	-0.70	-0.21	0.80	-0.02	-0.64	-0.88	-0.24	1.00

Tabla 2. Coeficientes de correlación para quiasma óptico

Métrica	Tasa-g	Diame	Diame	Gros	Area	Area	FVM	FVA	Cont	Dens	AFD	Dispe	Peak	Difus	Frac	Difus	Difusi	Tamari
Tasa-g	1.00	-0.35	-0.42	-0.52	-0.47	-0.36	0.62	0.73	0.65	0.50	0.52	0.06	0.53	0.28	0.32	0.18	-0.28	0.17
Diametro axonal	-0.35	1.00	1.00	0.98	0.99	1.00	-0.85	-0.78	-0.76	-0.94	-0.62	-0.41	-0.57	-0.51	-0.35	-0.49	0.18	-0.40
Diametro axonal+	-0.42	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	-0.87	-0.82	-0.79	-0.96	-0.64	-0.40	-0.60	-0.51	-0.36	-0.49	0.19	-0.41
Grosor de mielini	-0.52	0.98	0.99	1.00	1.00	1.00	0.98	-0.90	-0.86	-0.83	-0.96	-0.67	-0.39	-0.62	-0.52	-0.38	-0.48	0.22
Area de mielina	-0.47	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99	-0.88	-0.84	-0.80	-0.95	-0.65	-0.39	-0.60	-0.51	-0.37	-0.48	0.20	-0.40
Area axonal	-0.36	1.00	1.00	0.98	0.99	1.00	-0.85	-0.78	-0.76	-0.93	-0.61	-0.41	-0.56	-0.50	-0.35	-0.48	0.18	-0.39
FVM	0.62	-0.85	-0.87	-0.90	-0.88	-0.85	1.00	0.98	0.93	0.94	0.75	0.16	0.75	0.51	0.42	0.44	-0.29	0.40
FVA	0.73	-0.78	-0.82	-0.86	-0.84	-0.78	0.98	1.00	0.94	0.91	0.75	0.13	0.76	0.50	0.43	0.41	-0.32	0.38
Conteo axonal	0.65	-0.76	-0.79	-0.83	-0.80	-0.76	0.93	0.94	1.00	0.89	0.77	0.19	0.76	0.50	0.46	0.39	-0.37	0.40
Densidad axonal	0.50	-0.94	-0.96	-0.96	-0.95	-0.93	0.94	0.91	0.89	1.00	0.73	0.33	0.69	0.56	0.42	0.50	-0.26	0.42
AFD	0.52	-0.62	-0.64	-0.67	-0.65	-0.61	0.75	0.75	0.77	0.73	1.00	0.23	0.98	0.46	0.48	0.34	-0.37	0.45
Dispersión	0.06	-0.41	-0.40	-0.39	-0.39	-0.41	0.16	0.13	0.19	0.33	0.23	1.00	0.07	0.25	0.16	0.29	0.01	0.21
Peak	0.53	-0.57	-0.60	-0.62	-0.60	-0.56	0.75	0.76	0.76	0.69	0.98	0.07	1.00	0.44	0.48	0.31	-0.39	0.42
Difusión axial_mi	0.28	-0.51	-0.51	-0.52	-0.51	-0.50	0.51	0.50	0.50	0.56	0.46	0.25	0.44	1.00	0.75	0.90	-0.48	-0.14
Fracción de aniso	0.32	-0.35	-0.36	-0.38	-0.37	-0.35	0.42	0.43	0.46	0.42	0.48	0.16	0.48	0.75	1.00	0.40	-0.91	-0.43
Difusión media_r	0.18	-0.49	-0.49	-0.48	-0.48	-0.48	0.44	0.41	0.39	0.50	0.34	0.29	0.31	0.90	0.40	1.00	-0.04	0.07
Difusión radial_r	-0.28	0.18	0.19	0.22	0.20	0.18	-0.29	-0.32	-0.37	-0.26	-0.37	0.01	-0.39	-0.48	-0.91	-0.04	1.00	0.47
Tamaño de comp	0.17	-0.40	-0.41	-0.41	-0.40	-0.39	0.40	0.38	0.40	0.42	0.45	0.21	0.42	-0.14	-0.43	0.07	0.47	1.00