

La trepanación vertebral como un método alternativo para la inoculación intraparenquimatosa de diversas suspensiones dentro de la médula espinal

Vertebral Trepanation as an Alternative Method for Intraparenchymal Delivery of Suspensions into the Spinal Cord

Nishida F^{1,3}, Zanuzzi CN^{1,2,3}, Márquez M², Barbeito CG^{1,2,3}, Portiansky EL^{1,3}

¹Laboratorio de Análisis de Imágenes, ²Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

E-mail: elporti@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: Rutinariamente, la administración de fármacos u otras sustancias químicas en regiones específicas de la médula espinal se realiza mediante diferentes técnicas de abordaje, siendo la laminectomía una de las más utilizadas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar una técnica de trepanación como una forma alternativa para la descarga de diversas suspensiones en los segmentos cervicales (C) de la médula espinal. Para ello, se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho. Previo a la trepanación, los músculos de la región cervical fueron divulsionados. Una vez localizados los arcos de las vértebras C4 y C5, se practicó la trepanación del disco intervertebral, utilizando una fresa dental montada sobre un taladro rotatorio. El orificio practicado sirvió como punto de introducción de una aguja para la descarga de solución salina. Esta solución fue descargada en la hemimédula derecha del segmento C5. Previo a su sacrificio a las 24 h postinoculación (p.i.), se practicaron pruebas comportamentales motoras y sensitivas sobre los animales tratados y controles. Posteriormente, se extrajo la médula espinal y los segmentos cervicales fueron procesados para el análisis histopatológico y el recuento de neuronas. Los animales tratados no mostraron variaciones funcionales con respecto a los controles. Asimismo, no mostraron alteraciones estructurales en ninguna de las hemimédulas, excepto en el sitio de ingreso de la aguja. La técnica de la trepanación aquí descrita es precisa, relativamente rápida y de fácil ejecución. Esta puede ser utilizada como un método alternativo a la laminectomía, para la inoculación y distribución de medicamentos, factores de crecimiento u otras suspensiones a ser inoculadas en la médula espinal.

Palabras claves: médula espinal cervical, trepanación, inoculación intraparenquimatosa, recuento, análisis de imágenes.

Abstract: Delivery of drugs or chemical factors into specific regions of the spinal cord is usually carried out by laminectomy. The aim of the present work was to evaluate a trepanation technique as an alternative way of delivery suspensions into the cervical (C) spinal cord segments. For this purpose, male Sprague-Dawley rats were used. Before trepanation, the muscles of the cervical region were divulsioned. Once located at C4 and C5 vertebral archs, intervertebral disc trepanation was performed using a dental drill mounted on a rotatory drill. The performed hole served as an introduction point for the needle of the syringe containing saline. The solution was intraparenchymally delivered into the right side of the C5 segment. Prior to sacrifice at 24 h post-inoculation (p.i.) motor and sensory behavioral tests were performed. Subsequently, histopathological studies and neuronal counting of the spinal cord segments were performed. Treated animals showed no functional variations in comparison to controls. Besides, those rats showed no structural changes at any side of the inoculated segment, except at the site of entry of the needle. The trepanation technique described here is accurate and fast enough; also, it is an easy technique to perform and may be used as an alternative method of laminectomy. Post-surgical trauma was not evident and the recovery of animals was fast. We propose that this technique may be a useful alternative way to deliver and distribute drugs, growth factors or other suspensions targeting the spinal cord.

Keywords: cervical spinal cord, trepanation, intraparenchymal delivery, morphometry, image analysis.

Introducción

La inoculación intraparenquimatosa de sustancias es la forma más efectiva para la distribución de drogas, factores de crecimiento o suspensiones virales dentro de la médula espinal (1, 2, 3). Para mejorar el acceso a la médula espinal se han ensayado diferentes métodos que comprometen a la columna vertebral (4, 5, 6, 7). Sin embargo, la mayor parte de las técnicas descritas se han desarrollado para la médula espinal lumbar (8, 9). La región cervical de la médula espinal de la rata es un sitio de difícil acceso debido a los grandes grupos de músculos epiaxiales presentes en la zona (10,11). La técnica convencional para abordar quirúrgicamente la médula espinal es la laminectomía (12, 13, 14). Este procedimiento realizado por varios grupos de investigación (4,15) implica la remoción del arco dorsal vertebral mediante la ayuda de una pequeña pinza-gubia puntiaguda. Sin embargo, durante el procedimiento, se puede producir el daño traumático de la médula espinal debido a la proximidad anatómica entre el órgano y los cuerpos vertebrales que apenas están separados. En el presente trabajo se propone a la trepanación dorsal como una técnica alternativa y útil para la inoculación intraparenquimatosa de suspensiones dentro de la médula espinal. A través de la evaluación del efecto causado por la solución salina, se postula que este método es lo suficientemente preciso para el propósito, sin la necesidad de proceder a la laminectomía y a la utilización de equipos estereotáxicos.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron 5 ratas Sprague-Dawley macho, entre 3 y 4 meses de edad y con un peso estimado de 150~250 g, criados en el bioterio del INIBIOLP (Universidad Nacional de La Plata - CONICET). Los animales fueron dispuestos en habitaciones con temperatura controlada de 22 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12:12 h. Los animales disponían de comida y agua *ad libitum*. Todos los experimentos con animales fueron realizados de acuerdo a las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del National Institutes of Health (16). El protocolo fue aprobado por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Procedimiento quirúrgico

Tres ratas fueron anestesiadas mediante la inyección de hidrocloreto de ketamina (40 mg/kg; IP), sumado a la administración de xilazina (8 mg/kg; IM) y se colocaron en posición de decúbito ventral (grupo *Sham*). Se realizó una incisión en la piel de

2,5 cm, desde la cresta occipital hasta la apófisis espinosa de la vértebra T2. La porción cervical del músculo trapecio (*Trapezius*) fue incidida en la línea media (aponeurosis común). En este punto, se debe considerar la presencia de grandes vasos, tales como las arterias y venas cervicales profundas, su corte accidental y el consecuente sangrado excesivo. Después de la divulsión, los músculos romboide cervical (*Rhomboideus cervicis*) y esplenio cervical (*Splenius cervicis*) fueron retraídos mediante un sostenedor autoestático. El músculo recto dorsal de la cabeza (*Rectus capitis dorsalis major*), que cubre los grandes procesos laterales de la vértebra C2, fue utilizado como una guía para cortar el músculo erector de la columna (*Musculi erector spinae*) (5 mm en caudal, a partir del músculo recto dorsal mayor de la cabeza) y exponer, de esta manera, el arco vertebral C4. Una vez que se identificaron los arcos vertebrales C4 y C5, el área fue expuesta para acceder al segmento C5. Para ello, se practicó un pequeño orificio en el disco intervertebral C4-C5, 1 mm en lateral a la línea media (apófisis espinosa dorsal). La trepanación se llevó a cabo mediante una fresa dental redonda de 0,8 mm de diámetro, montada sobre un taladro rotatorio de alta velocidad (Dremel MultiPro 395JP, México, México). La punta de una aguja de acero calibre 26, montada en una jeringa Hamilton® de 10µl, colocada dentro de un inyector estereotáxico manual (Stoelting CO 51639, Wood Dale, IL, USA) fue introducida de manera vertical, 3 mm hacia abajo en el lado derecho de la médula espinal para llegar, teóricamente, a la Lámina VI del mismo lado. La figura 1A muestra una radiografía que señala el sitio de introducción de la aguja hasta la posición en donde se realizó la descarga de la solución salina. La punta de la aguja fue mantenida en el lugar durante 2 min, antes y después de la descarga de la solución. La descarga se produjo a razón de 1 µl/min. La hemimédula izquierda del segmento C5 fue utilizada como un control interno. Una vez que la solución fue descargada, se removió la aguja y se suturaron los músculos superficiales y la incisión de la piel. Los animales se mantuvieron en una cámara de control de temperatura hasta que despertaron.

Dos ratas fueron utilizadas como control de la cirugía y del efecto de la solución salina inyectada.

Pruebas de motricidad y sensibilidad (pruebas comportamentales)

Dado que la modificación del estado funcional (sensorio-motor) de la rata depende de la localización y del grado de lesión producido en la médula, se realizaron dos pruebas para evaluar la respuesta sensitiva y motora de los animales. Estas pruebas fueron dirigidas a comprobar, principalmente, la funcionalidad de los miembros torácicos.

Para la evaluación de la capacidad motora de los animales se utilizó la prueba del desplazamiento en escalera horizontal. Esta prueba permitió evaluar ambos pares de miembros simultáneamente. El movimiento de los miembros pelvianos, a menudo está condicionado por los miembros torácicos. Mediante esta prueba los animales fueron estimulados a caminar sobre una superficie de un metro de largo, formada por varillas ubicadas a una distancia variable en cada intento (17,18,19). La evaluación cuantitativa de la prueba se realizó siguiendo el sistema de puntuación (rango de valores) propuesta por Metz y Whishaw (17), en el que el valor de 0 representa la anormalidad y el 6, la perfección.

Todos los valores entre 0 y 2 fueron considerados como errores (fallo total, deslizamiento profundo y deslizamiento ligero sobre el peldaño).

Para la evaluación de la capacidad sensitiva se utilizó la prueba de la platina caliente. Esta prueba consiste en posicionar a la rata sobre una platina con termostato regulable, a una temperatura fija de 55 °C ± 0,5 °C. Se registró el tiempo de latencia, definido como el tiempo entre el punto cero (momento en el que la rata es colocada sobre la superficie caliente) y el momento en el que el animal manifiesta un signo en respuesta al calor (20). Con el fin de evitar un daño tisular, se adoptó un tiempo límite de 20 segundos.

Remoción de la médula espinal

Las ratas fueron sacrificadas de acuerdo con la Guía para el Uso de Animales en Investigación Neurocientífica (la Sociedad de Neurociencia) y aprobado por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, a las 24 h p.i. Previo a su sacrificio, los animales fueron anestesiados mediante la inyección de hidrocloreuro de ketamina (40 mg/kg; IP), sumado a la administración de xilazina (8 mg/kg; IM). A continuación, los animales fueron perfundidos con 100 ml de una solución salina tamponada de fosfato (PBS), pH 7,4, 4 °C, seguido de la administración de una solución salina tamponada de paraformaldehído al 4 %, durante 20 min. La columna vertebral fue removida luego de una fijación en formalina tamponada durante 24 h. Posteriormente, la médula espinal fue disecada (Fig. 1B), sumergida en una solución tamponada criopreservante (sacarosa 30 %; polivinilpirrolidona 1 %; etilenglicol 30 % en PBS 1M 1 % y agua destilada para 100 ml) y almacenada a -20 °C, hasta su utilización.

Procesamiento tisular y tinción histológica

Se realizaron cortes coronales de los segmentos medulares. Cada segmento fue embebido en 0,5 ml de una solución gelificante (sacarosa 10 % en PBS 1M;

agarosa de bajo punto de fusión [Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA] 4 %). Luego de 24 h a 4 °C los bloques de gelatina fueron cortados coronalmente y de manera seriada, con un espesor de 20 µm mediante un micrótopo por vibración (Leica VT 1000S, Wetzlar, Germany). Las muestras fueron posteriormente montadas sobre portaobjetos gelatinizados (gelatina sin sabor 6 g; KCr(SO₄)₂·12 H₂O 0,5 g y agua destilada para 300 ml). Los cortes fueron teñidos con violeta de cresilo para su observación microscópica. El recuento de neuronas se realizó en cortes separados a 120 µm uno de otro.

Análisis de imágenes

Las imágenes de las secciones de los segmentos cervicales fueron capturadas mediante una cámara de video digital (Olympus DP71, Tokio, Japón), montada sobre un microscopio (Olympus BX50, Tokio, Japón), utilizando una lente objetivo de 40x de magnificación y procesada mediante la función de alineación de imágenes múltiples (MIA) del programa de análisis de imágenes cellSens Dimension (v1.6, Olympus, Tokio, Japón). Para estimar el número total de neuronas presentes en todo el segmento cervical se utilizó la siguiente fórmula (21):

$$N = \frac{d}{n \cdot s} \sum_{i=1}^n x$$

donde, N = cantidad total de neuronas; d = longitud (2 mm) del eje rostrocaudal del segmento analizado; n = número de muestras no contiguas contadas por cada segmento (n = 3); s = espesor de la sección (20 µm); x = cantidad de neuronas por cada corte no contiguo. Por lo tanto, N representa la cantidad total de neuronas presentes en cada segmento.

Análisis estadístico

Se utilizaron el test-t de Student para dos grupos y el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) para múltiples comparaciones. La prueba de Fisher para múltiples comparaciones fue utilizada para la determinación de la significación. Se asumió una significación para valores de $p < 0,05$.

Resultados

Efecto clínico de la inoculación intraparenquimatosa

Los animales control mostraron un comportamiento normal en todo momento. Luego de la cirugía, los animales operados se comportaron de la misma manera que los controles.

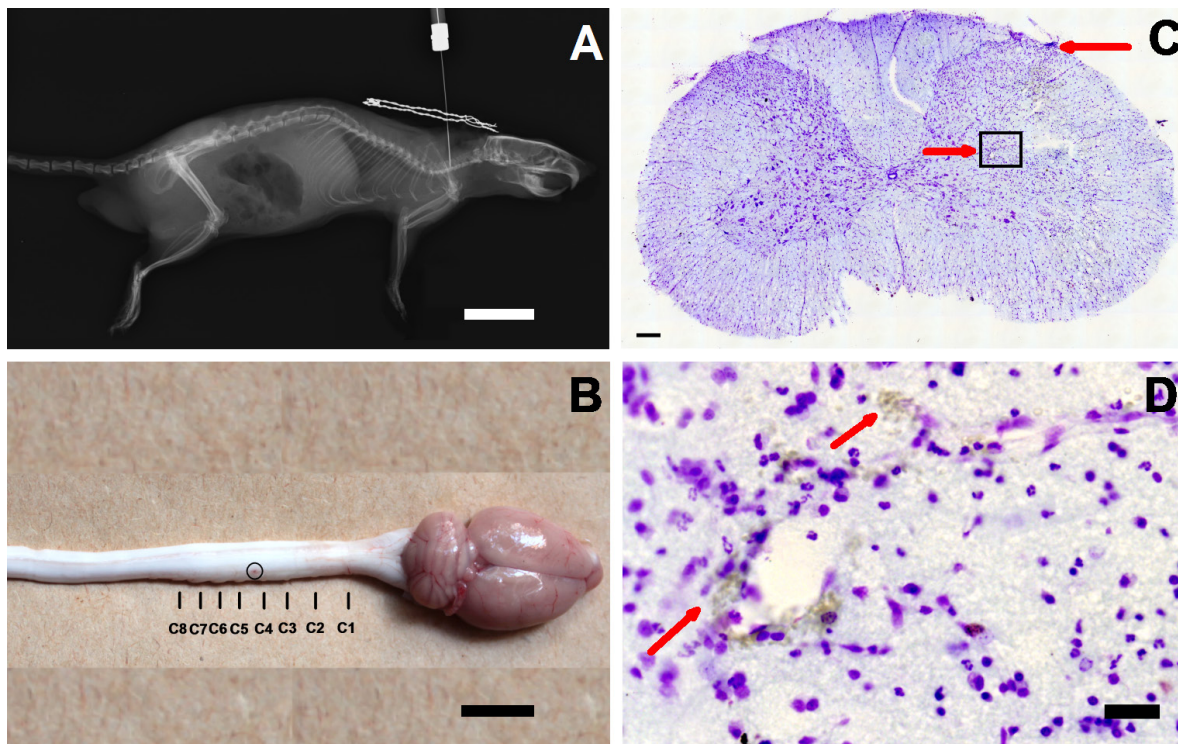


Figura 1. Inoculación intraparenquimatosa en la médula espinal e histología del segmento C5. **A.** Imagen radiográfica (GBA 100 kVp-200 mA, Argentina and Fuji, FCR Prima, Japón), tomada con factor 25 mA y rango de 43 kVp. Se puede apreciar el sitio de introducción de la aguja hasta la posición en donde se realizó la descarga de la droga. Barra = 30 mm. **B.** Aspecto macroscópico del SNC durante la necropsia. El círculo señala el punto de ingreso de la aguja. Barra = 0,5 mm. **C.** Se observa la ranura delgada, provocada por el ingreso de la aguja (flecha), que cruza el tracto corticoespinal lateral hasta alcanzar la Lámina VI dentro de la sustancia gris medular. A simple vista se observa que la cantidad de neuronas en ambas hemimédulas es similar. El recuadro muestra el detalle en D. Barra = 200 μ m. **D.** Detalle del efecto producido por la descarga de solución fisiológica. Se observan hematíes y leucocitos (células polimorfonucleares y macrófagos) presentes en la zona. Barra = 25 μ m.

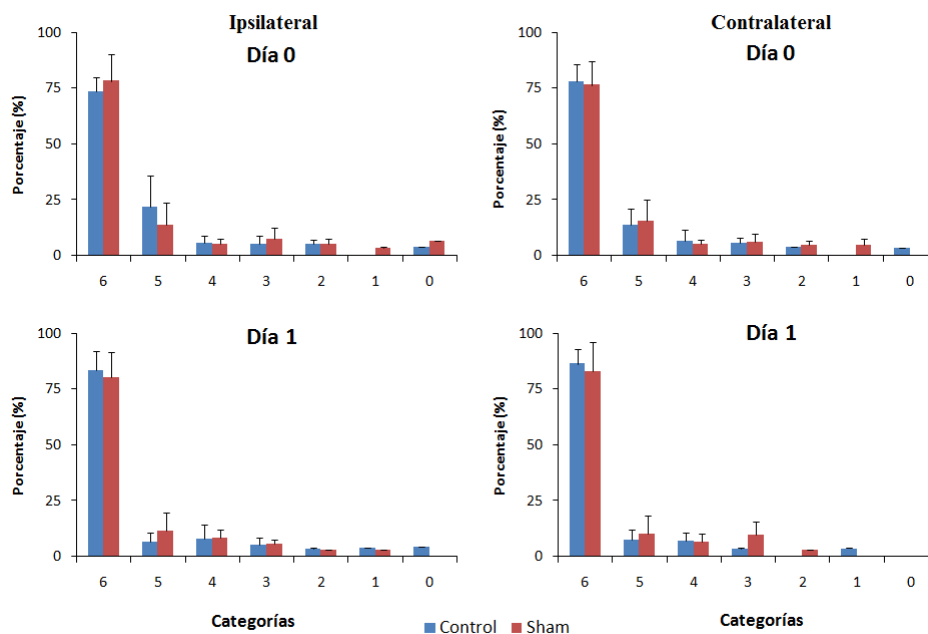


Figura 2. Desplazamiento en la escalera horizontal. Las diferentes categorías especificadas en la sección de Materiales y Métodos para el análisis de motricidad se representan en forma de porcentaje, tanto para los miembros ipsilaterales como contralaterales de los animales control y Sham, para los días 0 y 1 p.i.

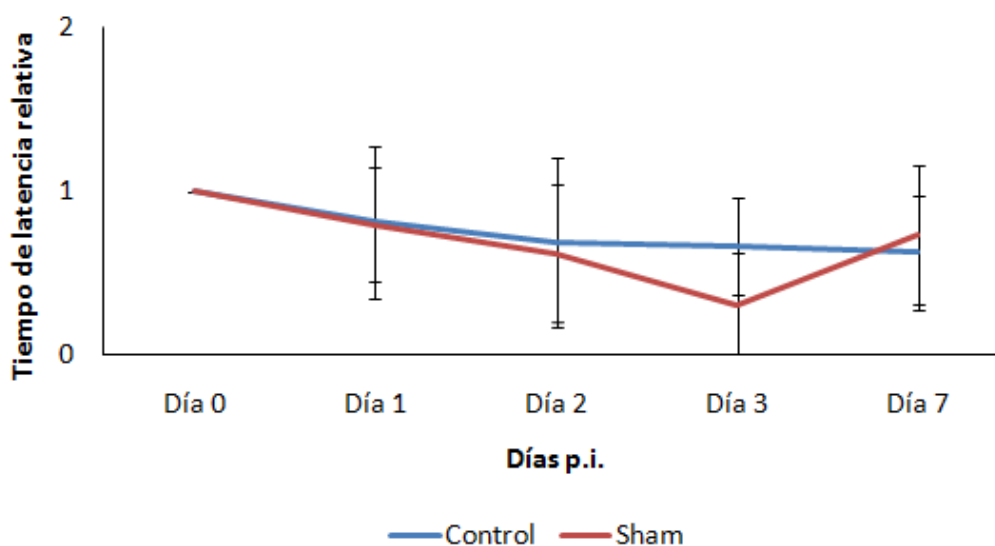


Figura 3. Variación en el tiempo de latencia. No se registraron diferencias significativas respecto al tiempo de latencia registrado para los animales control y *Sham*, para los días 0 y 1 p.i.

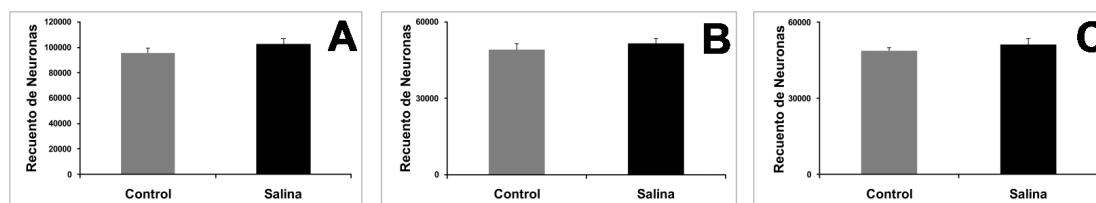


Figura 4. Recuento neuronal del segmento C5. **A.** Estimación de la cantidad total de neuronas en el segmento C5. No se observan diferencias significativas en el recuento neuronal de ambos grupos de animales. **B.** La estimación de la cantidad total de neuronas en la hemimédula ipsilateral es similar a la del grupo control. **C.** No se observan diferencias significativas en el recuento neuronal en la hemimédula contralateral.

Las pruebas de la escalera horizontal y de la platina caliente no demostraron diferencias significativas entre las capacidades motoras y sensitivas de los animales de los grupos control y *Sham* al día 1 p.i. para en miembro ipsilateral (Fig. 2 y 3).

Análisis histopatológico

El patrón de daño tisular en el segmento C5 se observó en todos los animales inoculados. Esta lesión consistió en la pérdida del extremo superior lateral derecho del segmento, correspondiente al tracto espinocerebeloso dorsal. Asimismo, se observó una ranura delgada que cruza el tracto corticoespinal lateral hasta alcanzar la Lámina VI dentro de la sustancia gris medular (Fig. 1C-D).

No se observaron lesiones en los segmentos cervicales correspondientes a los animales control.

Análisis de imágenes

Los animales no mostraron pérdida de neuronas en la hemimédula ipsilateral, en comparación con la

hemimédula contralateral. En estos animales, se observó una leve tumefacción en unas pocas neuronas.

El recuento neuronal en los otros segmentos de la región cervical fue similar a los del segmento C5. Ninguno de estos segmentos mostró signos de daño estructural. El recuento neuronal de los animales control fue similar en ambas hemimédulas, en cada uno de los segmentos analizados (Fig. 4).

Discusión

La búsqueda bibliográfica realizada registró un número muy reducido de trabajos referidos a la descarga intratecal o intraparenquimatosa en la médula espinal cervical murina (4, 15). De hecho, esta región anatómica de la columna vertebral está cubierta por un gran número de músculos que hacen difícil el acceso quirúrgico a cualquiera de sus segmentos. En el presente trabajo se describió la topografía anatómica cervical de la rata, así como los cambios en el recuento neuronal inducidos por la inoculación intraparenquimatosa de una solución salina, utilizando una técnica

de trepanación dorsal.

Mediante la laminectomía, las apófisis espinosas y las láminas de dos o más vértebras, incluidos los ligamentos conectores, se liberan de todas las estructuras circundantes, se extirpan y se descartan permanentemente (22). Si bien se considera que la laminectomía es una técnica que no implica un riesgo para el paciente, la remoción de los ligamentos dorsales y de las articulaciones intervertebrales puede resultar en la inestabilidad vertebral (23, 24). Si bien esta técnica es apropiada para acceder a la médula espinal, la trepanación dorsal propuesta en el presente trabajo es una opción alternativa para la inoculación intraparenquimatosa de diversas soluciones. Es fácil y rápida de realizar, no genera daño tisular evidente y permite una recuperación posquirúrgica óptima. Asimismo, este procedimiento no requiere de la sujeción del animal por medio de un equipo estereotáxico. De todos modos, la lesión traumática producida por la introducción de la aguja en el tejido siempre se generará, independientemente de la técnica utilizada.

Si bien los modelos de lesión en la médula espinal realizados *in vitro* son adecuados para estudiar algunos aspectos de la evolución de la lesión aguda del órgano que se produce *in vivo* (25, 26), la falta de suministro vascular y de una respuesta inmune no los hace lo suficientemente apropiados para entender la complejidad de la respuesta de los tejidos a la lesión y su evolución. Por esta razón, los modelos *in vivo* son de gran relevancia para investigar las lesiones de la médula espinal. Los animales utilizados en el presente trabajo, no mostraron alteraciones clínicas durante el experimento. La leve tumefacción celular observada en algunas pocas neuronas puede ser el resultado del trauma mecánico inducido por la aguja durante la inyección (27, 28).

Las leves diferencias estructurales observadas entre las hemimédulas ipsilateral y contralateral nos permiten sugerir la existencia de un efecto local de la solución introducida. La ausencia de lesiones, tanto en la hemimédula contralateral del segmento inoculado como en el resto de la región cervical, sugieren la ausencia de difusión lateral de la solución. Además, las pruebas de destreza motora y sensitiva demuestran que la lesión provocada por la introducción de la aguja al momento de la inoculación no genera alteraciones funcionales. Si bien se requieren estudios con distintas suspensiones para evaluar las alteraciones de las habilidades motoras y sensitivas de las ratas inoculadas producidas por los productos inoculados, utilizar la técnica de trepanación dorsal, nuestros resultados nos permiten validar la eficacia de esta técnica para la inoculación intraparenquimatosa de diversas suspensiones en un segmento de la médula espinal cervical. Esta técnica evita el proceso de reparación ósea que

se produce después de la laminectomía y permite un acortamiento en los tiempos de recuperación posquirúrgica. Por otra parte, el efecto local observado en el sitio de la inoculación asegura la precisión, la repetibilidad y la reproducibilidad de la técnica.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Ministerio de Ciencia y Tecnología e Innovación Productiva de la Nación (MINCyT), PICT-2012-0574, y la Universidad Nacional de La Plata, Subsidio-V199. Agradecemos al MV. R. Rodríguez y al MV. P. Segura por su ayuda en la obtención de las imágenes radiográficas.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe un conflicto real o potencial de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones dentro de los tres años de comenzado el presente trabajo, que pudiera influir en éste de manera inapropiada.

Bibliografía

1. Fernández-Martos CM, González P, Rodríguez FJ. Acute leptin treatment enhances functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One* 2012; 7: e35594.
2. Peluffo H, Foster E, Ahmed SG, Lago N, Hutson TH, Moon L, Yip P, Wanisch K, Caraballo-Miralles V, Olmos G, Lladó J, McMahon SB, Yáñez-Muñoz RJ. Efficient gene expression from integration-deficient lentiviral vectors in the spinal cord. *Gene Ther*. 2013; 20:645-57.
3. Snyder BR, Gray SJ, Quach ET, Huang JW, Leung CH, Samulski RJ, Boulis NM, Federici T. Comparison of adeno-associated viral vector serotypes for spinal cord and motor neuron gene delivery. *Hum Gene Ther*. 2011; 22:1129-35.
4. Franz CK, Federici T, Yang J, Backus C, Oh SS, Teng Q, Carlton E, Bishop KM, Gasmi M, Bartus RT, Feldman EL, Boulis NM. Intraspinous cord delivery of IGF-1 mediated by adeno-associated virus 2 is neuroprotective in a rat model of familial ALS. *Neurobiol Dis*. 2009; 33:473-81.
5. Jimenez Hamann MC, Tsai EC, Tator CH, Shoichet MS. Novel intrathecal delivery system for treatment of spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2003; 182:300-9.
6. Lepore AC, Haenggeli C, Gasmi M, Bishop KM, Bartus RT, Maragakis NJ, Rothstein JD. Intraparenchymal spinal cord delivery of adeno-associated virus IGF-1 is protective in the SOD1 G93A model of ALS. *Brain Res*. 2007; 1185:256-65.
7. Riley J, Butler J, Baker KB, McClelland S 3rd, Teng Q, Yang J, Garrity-Moses M, Federici T, Boulis NM. Targeted spinal cord therapeutics delivery: Stabilized platform and microelectrode recording guidance validation. *Stereotact Funct Neurosurg*. 2008; 86:67-74.
8. Vulchanova L, Schuster DJ, Belur LR, Riedl MS, Podetz-

- Pedersen KM, Kitto KF, Wilcox GL, McIvor RS, Fairbanks CA. Differential adeno-associated virus mediated gene transfer to sensory neurons following intrathecal delivery by direct lumbar puncture. *Mol Pain*. 2010; 6:31.
9. Wang YC1, Wu YT, Huang HY, Lin HI, Lo LW, Tzeng SF, Yang CS. Sustained intraspinal delivery of neurotrophic factor encapsulated in biodegradable nanoparticles following contusive spinal cord injury. *Biomaterials*. 2008; 29:4546-53.
10. Schaller O. *Nomenclatura Anatómica Veterinaria Ilustrada*. Acribia S.A. Zaragoza (España), 1996.
11. Slatter D. *Tratado de Cirugía en Pequeños Animales*, 3rd edition. Volume 2. Inter-Médica (Argentina), 2006.
12. Baumann MD, Kang CE, Tator CH, Shoichet MS. Intrathecal delivery of a polymeric nanocomposite hydrogel after spinal cord injury. *Biomaterials*. 2010; 31:7631-9.
13. Federici T, Riley J, Park J, Bain M, Boulis N. Preclinical safety validation of a stabilized viral vector direct injection approach to the cervical spinal cord. *Clin Transl Sci*. 2009; 2:165-7.
14. Liu Y, Himes BT, Moul J, Hueng W, Chow SY, Tessler A, Fischer I. Application of recombinant adenovirus for in vivo gene delivery to spinal cord. *Brain Res*. 1997; 768:19-29.
15. Tom VJ, Houlié JD. Intraspinal microinjection of chondroitinase ABC following injury promotes axonal regeneration out of a peripheral nerve graft bridge. *Exp Neurol*. 2008; 211:315-9.
16. National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Eight Edition. The National Academic Press. Washington. 2011.
17. Metz GA, Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J Neurosci Methods*. 2002; 115:169-79.
18. Sedý J, Urdzíkova L, Jendelová P, Syková E. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008; 32:550-80.
19. Klein A, Wessolleck J, Papazoglou A, Metz GA, Nikkhah G. Walking pattern analysis after unilateral 6-OHDA lesion and transplantation of foetal dopaminergic progenitor cells in rats. *Behav Brain Res*. 2009; 199:317-25.
20. Duman EN, Kesim M, Kadioglu M, Ulku C, Kalyoncu NI, Yaris E. Effect of gender on antinociceptive effect of paroxetine in hot plate test in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006; 30:292-6.
21. Sánchez HL, Silva LB, Portiansky EL, Goya RG, Zuccolilli GO. Impact of very old age on hypothalamic dopaminergic neurons in the female rat: A morphometric study. *J Comp Neurol*. 2003; 458:319-25.
22. Birkham WS. Technique of exposure of the spinal cord and canal; Osteoplastic resection and laminectomy. *Ann Surg*. 1905; 41:372-98.
23. Eggert HR, Laborde G. Unilateral approaches to spinal tumors. En: Wenker H, Klinger M, Brock M, Reuter F, editors. *Advances in Neurosurgery*. Berlin: Springer-Verlag; 1986. Vol 14. p. 106-10.
24. Jeon SC, Chough CK, Park HK, Lee KJ, Rha HK, Kim MC. Surgical technique and long-term follow-up of cervical laminoplasty using titanium miniplates. *J Korean Neurosurg Soc*. 2004; 36:369-74.
25. Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: A reappraisal. *NeuroRx*. 2004; 1:80-100.
26. Park E, Velumian AA, Fehlings MG. The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: A review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotraum*. 2004; 21:754-74.
27. Sandler AN, Tator CH. Review of the effect of spinal cord trauma on the vessels and blood flow in the spinal cord. *J Neurosurg*. 1976; 45:638-46.
28. Tsui BC, Armstrong K. Can direct spinal cord injury occur without paresthesia? A report of delayed spinal cord injury after epidural placement in an awake patient. *Anesth Analg*. 2005; 101:1212-4.