



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA / LANIREM

INFERENCIA NO INVASIVA DE AFECCIÓN DE TEJIDO NERVIOSO  
MEDIANTE IMÁGENES DE RESONANCIA SENSIBLES A DIFUSIÓN  
CON CODIFICACIÓN MULTIDIMENSIONAL

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

PRESENTA:  
RICARDO ALONSO RIOS CARRILLO

TUTOR PRINCIPAL  
DR. LUIS CONCHA LOYOLA<sup>1</sup>  
COMITÉ TUTOR  
DR. ALONSO RAMÍREZ MANZANARES<sup>2</sup>  
DR. SARAEL ALCAUTER SOLÓRZANO<sup>1</sup>

1. Instituto de neurobiología, UNAM. 2. Centro de investigación en matemáticas A.C.

UNAM CAMPUS JURIQUILLA, QUERÉTARO, 2023



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.



JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Juan Fernández Ruiz  
Secretario: Dr. Luis Concha Loyola  
Vocal: Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo  
Vocal: Dra. Penélope Aguilera Hernández  
Vocal: Dra. Nuria Esturau Escofet

La tesis se realizó en Instituto de neurobiología, UNAM.

TUTOR DE TESIS:

Dr. Luis Concha Loyola

---



*A mi madre y a mi padre.  
Por su apoyo incondicional.  
Los amo.  
Ricardo Rios.*



# Reconocimientos

---

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo y la beca recibida a lo largo del doctorado. La realización de esta tesis es gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (clave IN204720 y folio 252022). Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida para finalizar este proyecto.

Agradezco a Luis Concha por todos estos años de ser un excelente supervisor. Siempre me ha alentado a continuar en los momentos complicados. Le he aprendido muchísimo y de todas las cosas: desde cómo hacer un script de bash, como escanear en un resonador magnético, como hacer las mejores gráficas, textos y presentaciones, como montar un clúster de linux y hasta cuales son las mejores cervezas. Sobre todo cómo ser un excelente líder y ser humano. Admiro mucho su positividad y creatividad hacia todas las cosas. Espero llegar a ser un buen ejemplo como él. Agradezco a mi otro gran supervisor Alonso Ramírez por todos estos años de trabajar juntos. Su ojo crítico siempre me mantuvo al margen y estoy seguro que sin su guía y participación no hubiera llevado a este proyecto lejos. Admiro mucho su forma de organizarse, su enseñanza, su “mano dura” para las cosas serias y su gran sentido del humor para todo lo demás. Otro gran líder y ser humano. Disfruté mucho su estancia en el laboratorio este último año. En especial que anduvimos de tour gastronómico por todo Juriquilla y fue de lo mejor del año. Me siento afortunado de haber tenido tan grandes supervisores en mi doctorado. Espero podamos seguir charlando, riendo, colaborando y seguir aprendiendo de ellos muchas cosas por muchos años más.

Agradezco a Mirelta Regalado y a Hiram Luna por todo su apoyo en la realización de este trabajo. Me brindaron toda su ayuda en tiempos de pandemia para la parte experimental de este proyecto. No hubiera podido ser posible de terminar en tiempo y forma sin ellos. Agradezco a los grandes amigos que hice en el laboratorio C-13 a lo largo de estos años. Siempre tuvimos un ambiente de trabajo agradable y sano que nos permitió a todos y todas crecer y madurar. Aprendí mucho de la vida con nuestras conversaciones y aprendí mucho enseñando lo que sé y escuchando de sus ideas y problemas de sus proyectos. Son una parte fundamental de mi crecimiento académico y personal de estos años. Agradezco a Ricardo Coronado por ser mi cómplice en los congresos de difusión y por estar ahí para charlar del mundo académico.

Agradezco a mi tío Guillermo por recibirme en su casa en Querétaro los años de



mi doctorado. Nunca tuve que batallar económicamente gracias a su apoyo. Agradezco a mi madre y a mi padre por su incondicional soporte. Su ejemplo es prueba de que trabajando con buenos ánimos, dedicación y esfuerzo se obtienen grandes frutos. Les dedico todos los frutos de mi doctorado. Los amo. Gracias por estar siempre ahí.





# Declaración de autenticidad

---

Por la presente declaro que, salvo cuando se haga referencia específica al trabajo de otras personas, el contenido de esta tesis es original y no se ha presentado total o parcialmente para su consideración para cualquier otro título o grado en esta o cualquier otra Universidad. Esta tesis es resultado de mi propio trabajo y no incluye nada que sea el resultado de algún trabajo realizado en colaboración, salvo que se indique específicamente en el texto.

Ricardo Alonso Rios Carrillo. UNAM Campus Juriquilla, Querétaro, 2023



# Resumen

---

La resonancia magnética pesada por difusión (DW-MRI) es una técnica no invasiva que es sensible a la geometría microestructural en tejido nervioso y es útil para la detección de neuropatología en investigación y la clínica. Los métodos de codificación multidimensional fueron desarrollados para enriquecer los datos microestructurales que se pueden obtener mediante DW-MRI. Particularmente, el novedoso método de codificación con b-tensor (perteneciente a la familia de codificaciones multidimensionales) ha demostrado ser más específico a algunas propiedades microestructurales que las adquisiciones de DW-MRI convencionales. A su vez, los métodos de aprendizaje de máquina son particularmente útiles para el estudio de conjuntos de datos multidimensionales.

En este trabajo, probamos la capacidad de detección de daño de un análisis de datos DW-MRI adquiridos con codificación por b-tensor mediante aprendizaje de máquina para diferentes escenarios de histopatología cerebral. Esto lo realizamos mediante tres pasos: 1) Introducimos diferentes niveles de daño en materia blanca en el nervio óptico de rata. 2) Obtuvimos un conjunto de datos DW-MRI *ex vivo* con codificación de b-tensor y calculamos métricas cuantitativas de microestructura utilizando *Q-space Trajectory Imaging*. 3) Usamos un modelo de aprendizaje de máquina para identificar las métricas de mayor contribución y construimos un clasificador probabilístico a nivel voxel de daño histopatológico. Nuestros resultados muestran que este modelo es sensible a características microestructurales de daño. En conclusión, datos DW-MRI con codificación de b-tensor, analizados mediante métodos de aprendizaje de máquina, tienen un potencial de continuar su desarrollo para la precisa detección de histopatología y neurodegeneración.



# Índice general

---

<b>Índice de figuras</b>	<b>xv</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>xvii</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Estructura de la tesis . . . . .	2
<b>2. Microestructura del tejido cerebral</b>	<b>5</b>
2.1. Elementos de Microestructura . . . . .	5
2.1.1. Materia gris y materia blanca . . . . .	7
2.1.2. Neurona . . . . .	8
2.1.2.1. Soma neuronal . . . . .	8
2.1.2.2. Dendritas . . . . .	8
2.1.2.3. Axón . . . . .	8
2.1.2.4. Mielina . . . . .	9
2.1.3. Glía . . . . .	9
2.1.3.1. Oligodendrocito . . . . .	9
2.1.3.2. Astrocito . . . . .	9
2.1.3.3. Microglía . . . . .	10
2.2. Microestructura de materia blanca en degeneración . . . . .	10
2.2.1. Degeneración axonal . . . . .	10
2.2.1.1. Degeneración Walleriana . . . . .	11
2.2.2. Desmielinización . . . . .	12
2.2.3. Glía reactiva en la inflamación . . . . .	12
2.2.3.1. Astrogliosis y cicatriz glial . . . . .	12
2.2.3.2. Microglía activa . . . . .	14
<b>3. Principios y técnicas de DW-MRI</b>	<b>15</b>
3.1. La física de la difusión . . . . .	15
3.2. DW-MRI . . . . .	16
3.3. La codificación unidimensional de difusión (lineal) . . . . .	18
3.4. Imagenología por tensor de difusión . . . . .	20
3.4.1. Métricas del tensor de difusión . . . . .	22



3.4.2. El tensor de kurtosis . . . . .	24
3.5. La codificación multidimensional de difusión (b-tensorial) . . . . .	25
3.6. El modelo de la distribución de tensores de difusión . . . . .	27
3.7. Imagenología por trayectoria del espacio-Q . . . . .	29
3.7.1. Métricas para la distribución de tensores de difusión . . . . .	30
<b>4. Justificación del proyecto</b>	<b>37</b>
4.1. Motivación . . . . .	37
4.2. Objetivos . . . . .	38
<b>5. Métodos / Diseño del experimento</b>	<b>39</b>
5.1. Modelo animal . . . . .	39
5.1.1. Modelo experimental . . . . .	39
5.1.2. Extracción cerebral . . . . .	40
5.2. DW-MRI . . . . .	42
5.2.1. Preparación de muestra . . . . .	42
5.2.2. Adquisición . . . . .	42
5.2.3. Preprocesamiento . . . . .	43
5.2.4. Análisis b-tensorial . . . . .	44
5.3. Histología . . . . .	44
5.3.1. Imágenes histológicas . . . . .	46
5.4. Análisis/Pipeline de aprendizaje de máquina . . . . .	46
<b>6. Resultados</b>	<b>51</b>
6.1. Etiquetas experimentales para datos de DW-MRI . . . . .	51
6.2. Evaluación histológica . . . . .	51
6.3. Etiquetas basadas en histología para datos de DW-MRI . . . . .	55
6.4. Clasificación por aprendizaje de máquina . . . . .	58
<b>7. Discusión y conclusiones</b>	<b>65</b>
7.1. Puntos importantes . . . . .	65
7.2. Discusión . . . . .	65
7.3. Limitaciones del estudio . . . . .	68
7.4. Conclusiones . . . . .	69
<b>A. Anexo de métodos</b>	<b>71</b>
A.1. El espacio-Q . . . . .	71
A.2. Bosques aleatorios . . . . .	72
A.2.1. Árbol de decisión . . . . .	73
A.2.2. Importancia de características . . . . .	74
A.3. Histología - Azul de toluidina . . . . .	76

<b>B. Productos académicos derivados</b>	<b>77</b>
B.1. Publicación . . . . .	77
B.2. Disponibilidad de datos . . . . .	77
B.3. Código . . . . .	77
B.4. Conferencias nacionales . . . . .	77
B.5. Conferencias internacionales . . . . .	78
<b>Bibliografía</b>	<b>79</b>



## Índice de figuras

---

2.1. Ilustración de los componentes de microestructura en tejido cerebral. . .	6
2.2. Fotomicrografía de histología en materia blanca sana. . . . .	7
2.3. Etapas de la degeneración Walleriana. . . . .	13
3.1. Movimiento browniano. . . . .	17
3.2. Secuencia de pulsos para la codificación unidimensional de difusión. . . .	19
3.3. La relación entre el gradiente de difusión $g$ , el vector $q$ y el b-valor en DW-MRI. . . . .	21
3.4. Tensores de difusión y sus elipsoides correspondientes. . . . .	23
3.5. Ejemplos de las métricas del tensores de difusión. . . . .	24
3.6. Formas y sensibilidad del b-tensor . . . . .	27
3.7. Los b-tensores, su gradiente y su trayectoria en el espacio-Q . . . . .	28
3.8. El modelo de la distribución de tensores de difusión . . . . .	32
3.9. La señal de DW-MRI para varias casos de microambientes y distintas formas del b-tensor . . . . .	33
3.10. La diferencia entre la anisotropía fraccional y la microanisotropía fraccional	34
3.11. Las métricas de QTI . . . . .	35
5.1. Diseño experimental. . . . .	41
5.2. Esquema del protocolo. . . . .	43
5.3. Ejemplo de imágenes codificadas mediante tensor-b preprocesadas. . . .	45
5.4. Sistema de etiquetado basado en patrones histológicos. . . . .	47
5.5. Diagrama del pipeline de aprendizaje de máquina. . . . .	49
6.1. Contrastes de Imagenología por trayectoria del espacio-Q (QTI). . . . .	52
6.2. Las métricas Imagenología por trayectoria del espacio Q por grupo ex- perimental. . . . .	53
6.3. Gráficos de violín para los grupos experimentales para las métricas de Imagenología por trayectoria del espacio Q. . . . .	54
6.4. Patrones histopatológicos después de los procedimientos experimentales.	56
6.5. Ejemplos de fotomicrografías de nueve especímenes en el estudio. . . . .	57
6.6. Métricas QTI a nivel voxel según el etiquetado basado en histología. . .	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

6.7. Gráficos de violín para las tres clases de nervio y el patrón regional definidos por examinación histológica. . . . .	60
6.8. Resultados del algoritmo de aprendizaje de máquina. . . . .	61
6.9. Resultados complementarios para el análisis de importancia características. . . . .	61
6.10. Relevancia de características en subconjuntos métricas. . . . .	62
6.11. Clasificación a nivel voxel de los patrones histológicos. . . . .	63
6.12. Ejemplos de daño histopatológico del patrón regional y su correspondiente clasificación con aprendizaje de máquina basado en datos con MDE DW-MRI. . . . .	64
A.1. Árbol de decisión. . . . .	75

# Abreviaturas

---

AD	Difusividad axial
$C_c$	Coherencia de orientación
DKI	Imagenología por tensor de kurtosis
DTD	Distribución de tensores de difusión
DTI	Imagenología por tensor de difusión
DW-MRI	Imágenes de resonancia magnéticas pasadas por difusión
FA	Anisotropía fraccional
$K_a$	Kurtosis anisotrópica
$K_i$	Kurtosis isotrópica
LPS	Lipopolisacárido
LTE	Codificación con b-tensor lineal
MD	Difusividad media
MDE	Codificación multidimensional de difusión
ML	Aprendizaje de máquina
PGSE	Gradientes pulsados por eco de spin
PTE	Codificación con b-tensor planar
QTI	Imagenología por trayectoria del espacio-Q
RD	Difusividad radial
RF	Bosque aleatorio
RGB	Rojo-verde-azul
SDE	Codificación única de difusión
SNC	Sistema nervioso central
SNR	Relación señal-ruido
STE	Codificación con b-tensor esférico
$\mu$ FA	Micro anisotropía fraccional



# Introducción

---

Las imágenes de resonancia magnética pesadas por difusión (1) (DW-MRI, por sus siglas en inglés: *Diffusion Weighted - Magnetic Resonance Imaging*) han hecho posible la inferencia no-invasiva de tejido microestructural. En DW-MRI, el contraste de las imágenes es sensible al movimiento del agua (su difusión) sobre el tejido biológico. La geometría microestructural celular restringe el movimiento molecular del agua, a la cual DW-MRI es sensible. En DW-MRI, adquirimos imágenes con distintas codificaciones espaciales de la difusión en múltiples direcciones. Posteriormente combinamos la información de dichas imágenes en modelos (mecánicos-biofísicos o representaciones matemáticas de la señal) para inferir algunas propiedades físicas de la microestructura.

Esta valiosa técnica caracteriza microestructura, conectividad, desarrollo y diversas patologías cerebrales. Por décadas, la necesidad de encontrar biomarcadores clínicos estandarizados que se puedan obtener mediante DW-MRI en tejido cerebral (sano y patológico) ha guiado a la comunidad científica de DW-MRI a desarrollar múltiples técnicas, modelos, adquisiciones, etc (2, 3, 4, 5).

Las técnicas clásicas de DW-MRI (i.e., aquellas que codifican la difusión mediante ecos de gradiente de pulsos cuadrados(6)) muestran gran sensibilidad para daño en tejido nervioso, pero no una buena especificidad a diversas formas histopatológicas (3). La comunidad científica ha propuesto diversos modelos biofísicos (7) para darle especificidad biológica, sin embargo, estos se encuentran limitados por la información disponible en las adquisiciones clásicas de DW-MRI.

Recientemente, las imágenes DW-MRI con codificación de difusión multidimensional (8) (MDE, por sus siglas en inglés) se desarrollaron para resolver estas situaciones. Específicamente, la técnica de codificación mediante el b-tensor (9) ha mostrado robustez para adquirir datos de difusión multidimensionales. Se ha utilizado en investigación en ambientes controlados con simulaciones (10), tejido sano (11) y en patología (12, 13, 14).

Una de las principales ventajas de utilizar adquisiciones con tensor-b es que la compleja información contenida en los datos es adecuada para modelos avanzados o representaciones de señal de difusión. En el modelo de la distribución de tensores de difusión (15), una colección de micro-tensores de difusión con diferentes tamaños, for-



mas y orientaciones describen la microestructura. La imagenología por trayectoria del espacio-Q (9) extrae métricas de las imágenes codificadas con tensor-b que caracterizan el comportamiento del modelo de la distribución de tensores de difusión. Estos modelos complejos microestructurales no son adquiribles mediante las adquisiciones estándar de DW-MRI. Por ello, DW-MRI con MDE potencialmente describen cambios neuropatológicos en detalle. Sin embargo, relativamente pocos estudios han utilizado esta técnica con este propósito (16, 17).

Adicionalmente a los métodos novedosos de adquisición en DW-MRI, los algoritmos de aprendizaje de máquina (ML, por sus siglas en inglés: *Machine Learning*) han revolucionado el avance científico y tecnológico en prácticamente todas las áreas. En las imágenes biomédicas, hay múltiples ejemplos de aplicaciones de ML como segmentación de imágenes automática, procesamiento de datos, reconstrucción de MRI etc. En DW-MRI, las técnicas de ML se han utilizado para preprocesamiento de datos (18, 19), estimación de parámetros de difusión (20, 21, 22, 23, 24, 25), segmentación automática de cúmulos de materia blanca (26), entre otras aplicaciones (27). Aun así, existen diversas oportunidades para desarrollar nuevas aplicaciones clínicas y para mejorar la detección de histopatología.

Este trabajo apunta a evaluar el alcance de un algoritmo de ML para clasificar varios niveles de degeneración en materia blanca dañada basándose en métricas de difusión derivadas con QTI en un modelo animal. Para este fin, realizamos manipulaciones experimentales (isquemia retiniana e inyecciones de agentes infecciosos) que indujeron cambios histopatológicos en el nervio óptico, y posteriormente adquirimos imágenes con codificación de b-tensor *ex vivo*. Se obtuvo una evaluación histológica de los especímenes para poder evaluar los resultados obtenidos mediante el clasificador de ML, evaluando la severidad y la extensión espacial del daño histopatológico. También se identificaron las características más relevantes utilizadas por el clasificador. Finalmente, mostramos la utilidad del modelo para detectar daño neurológico mediante un mapa anatómico de clasificación.

### 1.1. Estructura de la tesis

Este trabajo está dividido en 7 capítulos, siendo el primer capítulo la presente introducción. El capítulo 2 describe características relevantes de la microestructura celular del tejido nervioso y su degeneración, el cual es objeto de estudio en esta tesis. En el capítulo 3 se detallan los principios y técnicas de las imágenes de resonancia magnética pesadas por difusión, introduciendo la codificación de difusión multidimensional. Utilizar esta codificación avanzada para estudiar degeneración es una de las mayores aportaciones de este trabajo. El capítulo 4 discute la justificación para realizar este proyecto. El capítulo 5 detalla la metodología utilizada en este trabajo: El modelo animal, los parámetros para obtener las imágenes de resonancia pesadas por difusión, el proceso histológico y la implementación del algoritmo de clasificación por aprendizaje de máquina. El capítulo 6 resume los resultados obtenidos mediante esta investigación.

Finalmente, el capítulo 7 se narran y discuten los resultados y aportaciones científicas derivadas en esta tesis.



# Microestructura del tejido cerebral

---

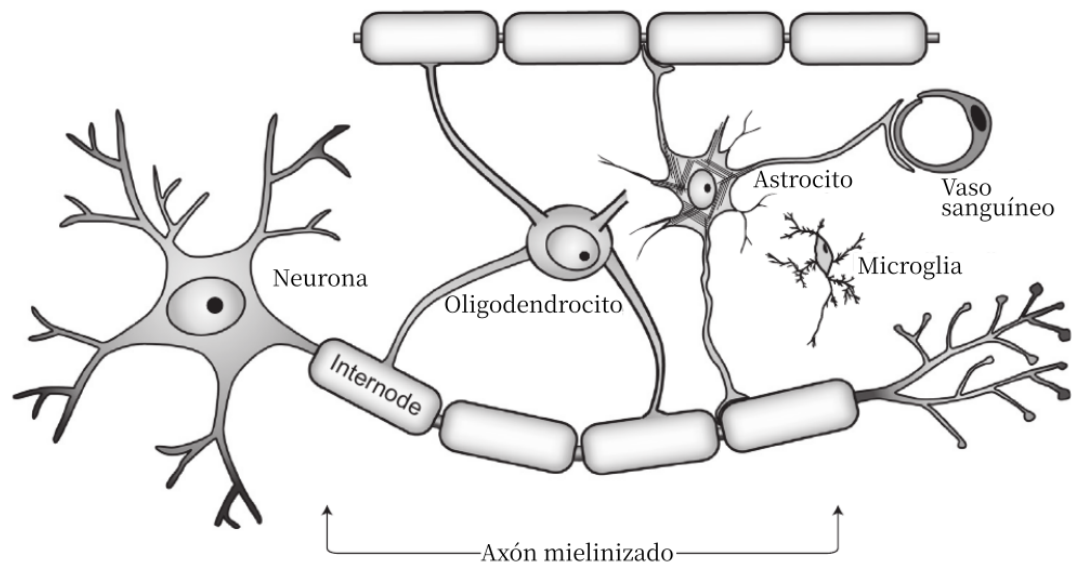
Este capítulo introduce los elementos de la microestructura celular en tejido nervioso, con énfasis en la sustancia blanca en degeneración, la cual es objeto de estudio en este trabajo.

## 2.1. Elementos de Microestructura

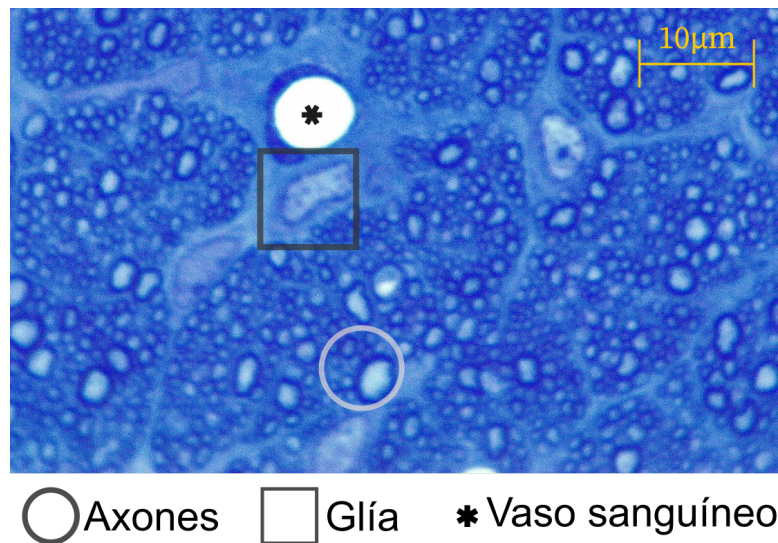
El sistema nervioso se encuentra dividido en dos grupos: el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico. El sistema nervioso central (SNC) se compone del cerebro y la médula espinal. Esta tesis se enfoca en los componentes y la degeneración de la microestructura del tejido cerebral del SNC. El sistema nervioso periférico concierne aquellas estructuras nerviosas que conectan el SNC con el resto del cuerpo. Su estudio es muy relevante para las neurociencias, aunque se encuentran fuera del alcance del estudio realizado en esta tesis.

El campo de la microestructura de tejido cerebral concierne el estudio de la forma y densidad de las membranas celulares en el tejido del SNC. Este tópico combina la neuroanatomía (que estudia la estructura del tejido nervioso en una escala de milímetros a centímetros) y la ultraestructura de tejido cerebral (que estudia las estructuras en una escala de nanómetros) (28). Esta sección describe la microestructura cerebral en la escala de la neuroanatomía (micrómetros-milímetros), que corresponde a la escala que es posible cuantificar utilizando la resonancia magnética pesada por difusión (la resonancia magnética convencional tiene una resolución a nivel de milímetros, pero la imágenes pesadas por difusión interrogan la estructura a nivel mesoscópico de micrómetros, véase sección 3.1).

Los principales componentes celulares microestructurales en tejido cerebral son: 1) La neurona. Compuesta de un soma neuronal, dendritas y un axón. 2) La glía. Concretamente hay tres tipos de glía: astrocitos, oligodendrocitos y microglía. 3) Vasos sanguíneos. Una red especializada en transportar sangre, la cual supe de nutrientes y oxígeno al tejido nervioso. Todos estos elementos se encuentran ilustrados en la Figura 2.1.



**Figura 2.1: Ilustración de los componentes de microestructura en tejido cerebral.** Materia gris: compuesta de los cuerpos neuronales (soma) y sus procesos dendríticos. El soma de la neurona extiende sus procesos en múltiples dendritas y un largo proceso axonal. Materia blanca: Compuesta de axones y glía (oligodendrocitos, astrocitos y microglía). El axón está envuelto mediante vainas de mielina. Estas vainas de mielina son producidas mediante los oligodendrocitos, el cual extiende sus procesos a varias vainas a lo largo de diversos axones. Los astrocitos tienen forma de estrella y realizan múltiples funciones. Principalmente brindan soporte nutricional a las neuronas mediante su conexión con vasos sanguíneos. La microglía es considerada las células inmunológicas del sistema nervioso, las cuales ayudan a eliminar células muertas y residuos de tejido. Figura adaptada de (29).



**Figura 2.2: Fotomicrografía de histología materia blanca sana.** Este corte coronal en azul de toluidina permite apreciar algunos elementos celulares de tejido en materia blanca. En el círculo se aprecian axones de múltiples tamaños, todos rodeados por una vaina de mielina (de un contraste más oscuro). En el cuadrado se observa un cuerpo de una célula glial. El resto de la célula glial (con un contraste distinto al del cuerpo glial) se extiende a lo largo de la imagen. Con la tinción de toluidina no podemos distinguir entre distintos tipos de células gliales, pero dada su forma y proximidad con un vaso sanguíneo (asterisco) podemos intuir se trata de un astrocito.

Las microfotografías de histología (véase A.3) nos permiten observar estos elementos de microestructura cerebral *ex-vivo*. La Figura 2.2 contiene un ejemplo de histología con azul de toluidina de un corte coronal en nervio óptico (utilizado en este estudio) donde se aprecian varios de estos elementos.

### 2.1.1. Materia gris y materia blanca

Los componentes microestructurales del tejido en SNC se clasifican en dos tipos: materia gris y materia blanca.

La materia gris se compone de los somas neuronales, sus dendritas y células gliales (principalmente astrocitos). También hay axones de rango corto intra-corticales y la raíz de axones de largo alcance que se extienden a la materia blanca. La substancia genética oscura del núcleo en el soma neuronal es lo que da a la materia gris su color grisáceo a vista directa. La materia gris puede encontrarse formada en capas, como los que encontramos en la corteza cerebral, o como en pequeñas colecciones de cuerpos

nerviosos celulares, conocidos como núcleos.

La materia blanca se compone principalmente axones (usualmente mielinizados en el SNC) densamente empaquetados provenientes de los somas de la materia gris. También encontramos a células gliales (principalmente oligodendrocitos). El alto contenido lipídico de la mielina es lo que le da a la materia blanca su color a simple vista. Los axones se encuentran empaquetados en pequeños manojos, conocidos como fascículos. Algunos casos de grandes manojos se les llama tractos.

### 2.1.2. Neurona

La neurona es la célula fundamental del sistema nervioso que, formando una red con el resto de las neuronas, se encarga de todo el procesamiento funcional cognitivo consciente e inconsciente del sistema. La neurona se compone de un soma neuronal, dendritas y un axón (que en tejido cerebral suele estar mielinizado).

#### 2.1.2.1. Soma neuronal

El soma es el cuerpo celular de la neurona. El tamaño y morfología del soma son específicos a la región del sistema nervioso donde se encuentran, pero pueden variar de algunos micrómetros o hasta 10/100  $\mu\text{m}$  en células piramidales (28). La característica más prominente del soma es el núcleo, el cual suele ser ovalado y céntrico a la estructura del soma. Del soma surgen diversos procesos membranosos para comunicación con otras neuronas: Múltiples pequeños procesos para recibir señales (dendritas) y uno largo para conducir señal (el axón).

#### 2.1.2.2. Dendritas

Las dendritas son pequeñas (0.2 a 0.3  $\mu\text{m}$  en humanos(30)) extensiones del soma neuronal. Cada neurona puede tener múltiples dendritas, las cuales reciben señales otras neuronas (mediante axones u otras dendritas) que transmiten al soma. Las dendritas tienen proyecciones de tipo árbol como se observa en la figura 2.1. La estructura del árbol y sus ramas depende del tipo de neurona. Generalmente las neuronas tienen pocas dendritas (de una a cinco) que se extienden del soma, pero se pueden ramificar de 4 hasta 400 ramas(30).

#### 2.1.2.3. Axón

El axón es una extensión/proceso largo de la neurona por el cual se transmite el potencial eléctrico de neurona a otra neurona o región. Cada neurona posee sólo un axón que se origina de una sección del soma sin organelos (31). El axón es algo único de las neuronas, ninguna otra célula posee esta característica (32). Los axones pueden medir desde unos cuantos milímetros (en conexiones intra-corticales en materia gris) o

hasta un metro en ciertas especies (como las conexiones corticoespinales en humanos (33)). El diámetro del axón, el cual es casi constante a lo largo del mismo, puede ir desde 0.1  $\mu\text{m}$  y hasta 10  $\mu\text{m}$  en vertebrados (29). La capacidad de conducción del axón es proporcional a su diámetro y largo. En el SNC la mayoría de los axones se encuentran mielinizados, lo cual ayuda a la conducción del potencial eléctrico.

#### 2.1.2.4. Mielina

La mielina se compone de un 70-80% de lípidos y 30-20% de proteínas y agua (31). Se encuentra enrollada alrededor del axón en capas de 10 nm de ancho. Estos enrollamientos forman una vaina que se divide en pequeños segmentos alrededor del axón. Los espacios entre cada vaina se les conoce como nodos de Ranvier. La mielina aumenta la conducción del axón a un factor de 10 hasta 100 veces en función a su diámetro axonal (29). Cada nodo de mielina está siendo constantemente reformado mediante un proceso de un oligodendrocito.

#### 2.1.3. Glía

Las células gliales se encargan de múltiples funciones como dar soporte y nutrientes a las neuronas, apoyo a las redes sinápticas, mielinización de axones, fagocitosis entre otras cosas. La glía se compone de tres distintas células: los astrocitos, los oligodendrocitos y la microglía.

##### 2.1.3.1. Oligodendrocito

Los oligodendrocitos producen y enrollan la mielina en los axones dentro del SNC. Tienen un cuerpo celular con un tamaño 6-8 $\mu\text{m}$  (29). Sus procesos membranosos pueden producir hasta 60 vainas de mielina(29) en distintos nodos de hasta 30 axones (31). Existen en materia gris y en materia blanca, sin embargo, son mucho más numerosos en materia blanca donde componen el 75% de la glía (32).

##### 2.1.3.2. Astrocito

Los astrocitos poseen este nombre por su característica forma de estrella, ya que tienen muchos procesos que se expanden de manera isotrópica. Su cuerpo celular mide aproximadamente 9  $\mu\text{m}$  en diámetro (34). Sus procesos se extienden a neuronas y elementos vasculares, formando un puente entre ellos (35). En materia gris envuelven a las terminales sinápticas, brindando soporte a la actividad sináptica y regulando el balance de iones y neurotransmisores (36). En materia blanca se les conoce como astrocitos fibrosos y corresponden al 20% total de la glía (32). Ocupan el espacio extracelular entre axones y brindan soporte nutricional a ellos mediante los nodos de Ranvier (36).



### 2.1.3.3. Microglía

La microglía son pequeñas células macrófagas consideradas el sistema inmunológico del SNC. Suelen estar en estado de reposo (libre de procesos infecciosos o inflamatorios) cerca de los capilares. Se ha observado que la microglía en reposo se encuentra en constante inspección de su ambiente mediante cambios morfológicos en sus procesos (37). La microglía es muy sensible a algún daño celular o enfermedad, lo cual las pone en un estado “activo” para realizar labores de fagocitosis. La microglía se encuentra en materia gris como en materia blanca, aunque su concentración varía mucho dependiendo de la zona. En materia blanca, la microglía en reposo corresponde al 5% del total de la glía (31).

## 2.2. Microestructura de materia blanca en degeneración

Desde hace tiempo se sabe que las lesiones de materia blanca producen déficits motores dependiendo del fascículo afectado. Avances tecnológicos y nuestro entendimiento de las neurociencias fueron demostrando que las lesiones en materia blanca también causan efectos cognitivos y emocionales. Actualmente, se han identificado múltiples enfermedades en materia blanca, tal que ha sido necesario asignar múltiples categorías en función de su neuropatología (38). Sin embargo, todos estos desórdenes comparten tres eventos neurodegenerativos presentes de alguna forma y/o en distintos sitios con mayor o menor intensidad: degeneración axonal, desmielinización e inflamación. Esta sección enumera algunas características patológicas microestructurales de materia blanca en estos tres casos patológicos.

### 2.2.1. Degeneración axonal

La degeneración axonal se puede activar por diversos factores. Por ejemplo, sucede en enfermedades neurodegenerativas como esclerosis múltiple o Alzheimer, también acontece en zonas de daño localizado como consecuencia de un evento traumático a la espina dorsal o secundario a un golpe cerebral (29). Los cambios morfológicos en la degeneración axonal son muy variados dependiendo de la causa, ya que pueden ocurrir de manera no controlada y heterogénea según la patogénesis de cada enfermedad. Sin embargo, es típico el fenómeno de la hinchamiento axonal, donde se forman “perlas” a lo largo del axón degenerado (39). Estas perlas se forman debido a los neurofilamentos, microtúbulos, mitocondrias y cuerpos celulares que se van acumulando por flujo ectoplásmico que continúa a pesar del daño axonal (40). Los axones más pequeños son más vulnerables a la degeneración, aunque no se tiene clara la causa (29).

### 2.2.1.1. Degeneración Walleriana

La degeneración Walleriana se refiere a una serie de eventos que ocurren a lo largo de un axón que fue separado del cuerpo somático de la neurona, caracterizada principalmente por la degeneración axonal que ocurre en la parte más distal del axón con respecto a la región de separación (41). Dicha separación del axón con el soma puede ocurrir por lesiones, toxinas, inflamación o en algunos casos eventos isquémicos. Fue nombrada como tal en honor al científico August V. Waller quien describió por primera vez este proceso en 1850(42). La degeneración Walleriana ha sido relevante en el estudio de las enfermedades de neurodegeneración debido a que este proceso comparte muchas características con la degeneración axonal ocurrida en algunas enfermedades (41). A diferencia de la degeneración axonal general, donde la degeneración ocurre de manera no controlada y heterogénea, la degeneración Walleriana puede producirse de manera precisa a partir de un evento controlado (daño en el axón en un sitio preciso) (43) donde se sabe que la degeneración ocurre de manera retrógrada (44), i.e. de la parte más distal del segmento de axón separado hacia la parte más proximal a la zona lesionada. En general, el proceso de degeneración Walleriana en humanos y roedores es muy similar, con la principal diferencia de que el tiempo de los eventos de la degeneración Walleriana en humanos es mucho mayor, muy posiblemente relacionada al tamaño de los axones (41).

El modelo de degeneración Walleriana tiene al menos tres etapas definidas con respecto al tiempo transcurrido desde el inicio de la lesión (44). La Figura 2.3 resume las principales características de estas etapas que se describen brevemente a continuación:

**Etapas I** En los primeros 5-30 minutos después de la lesión los segmentos más próximos y distales del axón a la lesión exhiben rasgos de degeneración axonal aguda, aunque sólo en la “punta” de estas secciones.

**Etapas II** En el lapso de algunas horas, los organelos membranosos (e.g. mitocondria) empiezan a acumularse en las regiones adyacentes de la lesión. Entre 12 y 24 horas, los microtúbulos están más desorganizados, lo cual anuncia la disolución del citoesqueleto del axón a largo plazo. Esto es producto de la acumulación de calpaína en la zona. Sin embargo, durante este periodo los axones aún conservan su capacidad de poder transmitir impulsos eléctricos, y el resto del cuerpo axonal se encuentra morfológicamente intacto. Entre las 24 y 48 horas de este periodo, se empiezan a observar “perlas” sobre el segmento del axón desconectado, producto del efecto de la degradación causada en el medio que debilita el citoesqueleto y organelos del axón, pero sin presentar enteramente signos de fragmentación física definitiva. En este momento a pesar de la estructura amorfa y granular del medio, las capas de mielina que rodean al axón que, aunque estiradas por la irregularidad del medio, siguen estructuralmente funcionales.

**Etapas III** Esta etapa se caracteriza por la completa fragmentación del segmento axonal. La fragmentación sucede cuando se forman ovoides de mielina sobre las perlas que se formaron en la etapa II, debido a que la acumulación de calpaína termina por romper el citoesqueleto. Posterior a la destrucción del citoesqueleto hay una infiltración glial en el medio (principalmente astrocitos y microglía). Los ovoides de mielina y restos

del axón se fragmentan cada vez más a lo largo de los siguientes días, hasta que son eliminados por la microglía de manera rápida y efectiva.

### 2.2.2. Desmielinización

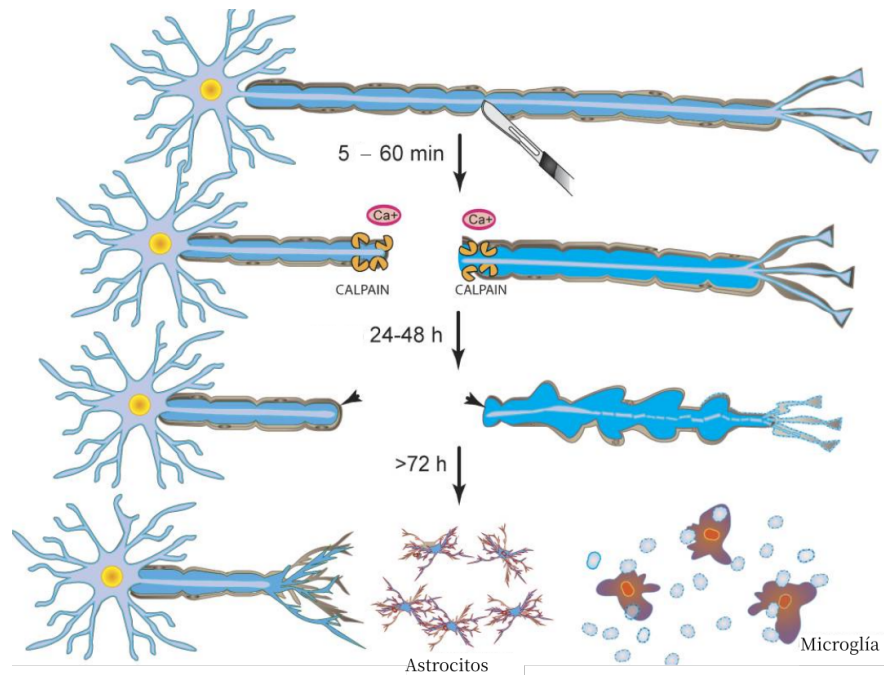
La desmielinización es la pérdida de las vainas de mielina mientras el axón se mantiene estructuralmente (40). La desmielinización produce una alteración de la conducción del potencial de acción en el nervio (39), lo cual puede desencadenar en serios efectos cognitivos y motores. Una de las principales causas de la desmielinización es el daño a los oligodendrocitos, los cuales se pueden ver afectados por toxinas, metabolitos dañinos, infecciones virales o isquemia (45). La esclerosis múltiple es el desorden más común de desmielinización. Se caracteriza por un ataque del sistema inmunológico a la mielina, de la cual la etiología es desconocida (38).

### 2.2.3. Glía reactiva en la inflamación

La inflamación es un evento que acompaña a la neurodegeneración en el SNC. Su propósito es combatir agentes externos, eliminar residuos celulares o activar vías de reparación de tejido. Es principalmente mediada por las células gliales del SNC (astrocitos y microglía), aunque también participan células endoteliales y aquellas derivadas de células inmunológicas. La inflamación es un proceso complejo y multifacético (46). En esta sección sólo nos enfocamos a respuestas gliales que son común denominador de los procesos inflamatorios en el SNC.

#### 2.2.3.1. Astrogliosis y cicatriz glial

La astrogliosis es el proceso de crecimiento, ya sea de tamaño (hipertrofia) o cantidad (hiperplasia), de los astrocitos como respuesta al daño en el SNC (39, 40). En la hipertrofia, los astrocitos alargan su cuerpo celular, volviéndose redondos, con un citoplasma homogéneo y con un núcleo en estado anormal. En este estado se les conoce como astrocitos gemistocitos, y son prominentes por ejemplo en tumores (39). En la hiperplasia, lo cual sucede en daño severo o de largo plazo (>48 horas), los astrocitos proliferan y forman una capa de procesos citoplasmáticos ricos en filamentos gliales (39). Esto se conoce como “gliosis fibrosa” que eventualmente forma una cicatriz glial. Esta cicatriz actúa como barrera que previene células inflamatorias y agentes infecciosos de acrecentar la neurodegeneración (36). Aunque estas dos características son muy prominentes de la astrogliosis, los astrocitos tienen diversas respuestas a la etiología de múltiples enfermedades (47).



**Figura 2.3: Etapas de la degeneración Walleriana.** En los primeros 5 a 30 minutos de la lesión, los segmentos axonales próximos y distales a la lesión sufren degeneración axonal aguda (sólo en una pequeña región). Posteriormente estos segmentos de axones (cabezas de flechas) se retraen en una especie de bulbos. Para las 24 horas el axón sigue funcional y sin cambios bruscos, aunque el citoesqueleto del segmento separado empieza a debilitarse formando un “rosario”. Después de 72 horas una rápida fragmentación del citoesqueleto sucede a lo largo del segmento distal del axón, seguido de una infiltración de glía que se fagocita los restos. Esta etapa también se muestran indicios de regeneración de la neurona. Figura adaptada de (44).

### 2.2.3.2. Microglía activa

La microglía, que en estado de reposo se encuentra percibiendo cambios del tejido cerebral en su territorio, tiene una capacidad de respuesta rápida a la neurodegeneración. La microglía puede cambiar rápidamente de su estado de reposo ramificado a un estado activo ameboide, el cual puede ir desde un estado agudo (sin fagocitosis) a un estado crónico (con fagocitosis) (39). En la fase aguda la microglía da soporte neuronal y posee una función regulatoria protectora, que facilita la reparación/regeneración neuronal (40). En un estado crónico, la microglía funge como célula citotóxica para eliminar agentes infecciosos o residuos, comúnmente adquiriendo la capacidad de hacer fagocitosis, aunque en algunos casos puede liberar sustancias tóxicas en el medio. En estado de fagocitosis, la microglía se vuelve larga y redonda, el núcleo anormal y el citoplasma se llena del material fagocitado por la microglía, que en materia blanca degenerada suelen ser residuos de la mielina. A la microglía en este estado se le conoce como “fagocitos lípidos” o “microglía espumosa” (40).

# Principios y técnicas de DW-MRI

---

Las imágenes de resonancia magnética pesadas por difusión (1) (DW-MRI, por sus siglas en inglés: *Diffusion Weighted - Magnetic Resonance Imaging*) sensibilizan las imágenes de resonancia en función al fenómeno de difusión del agua en el tejido. En tejido biológico, las estructuras membranosas de la microestructura restringen el movimiento molecular libre del agua, e.g., en una fibra nerviosa elongada hacia una sola dirección, el agua se desplaza preferentemente a lo largo del interior de la fibra en dicha dirección. El contraste de las imágenes DW-MRI depende del movimiento del agua (a mayor desplazamiento del agua, menor será el contraste resultante). Debido a que la geometría de la microestructura restringe el desplazamiento del agua, el contraste de las imágenes DW-MRI nos permite inferir dicha microestructura.

Este capítulo explica el fenómeno de difusión, las adquisiciones, y los modelos en el estado del arte para cuantificarla. Inicia con una breve descripción de la física de la difusión. Posteriormente describe el experimento clásico de DW-MRI para codificar la difusión del agua y el modelo del tensor de difusión, el cual nos permite extraer métricas que informan características de la microestructura. Después se describe el estado del arte en las adquisiciones de DW-MRI, la codificación b-tensorial, con el cual podemos expandir el modelo del tensor al modelo de la distribución de tensores de difusión. Finalmente, se describe brevemente la imagenología por trayectorias del espacio  $Q$ , el cual hace uso de la codificación b-tensorial y del modelo de distribución de tensores para extraer métricas avanzadas de microestructura.

## 3.1. La física de la difusión

La difusión (formalmente la auto-difusión) es el movimiento intrínseco de las moléculas de agua debido a la energía térmica almacenada en ellas. Este movimiento resulta en colisiones constantes e impredecibles entre las moléculas, el cual resulta en trayectorias con caminatas aleatorias en el medio. A estas caminatas aleatorias también se les conoce como movimiento browniano, ya que en Robert Brown lo reportó al observar el comportamiento de granos de polen sobre agua que se movían sin razón aparente (48).

### 3. PRINCIPIOS Y TÉCNICAS DE DW-MRI

---

Posteriormente Albert Einstein describió la teoría física/probabilística para modelar el movimiento browniano de un conjunto de moléculas en difusión (49). Einstein formalizó una “distribución de desplazamiento” para los caminantes aleatorios en un medio sin restricciones, el cual cuantifica la fracción de caminantes que se desplazan a cierta distancia en un determinado lapso de tiempo. Para el caso tridimensional corresponde a la relación:

$$\langle r^2 \rangle = 6D\Delta, \quad (3.1)$$

donde

- $\langle r^2 \rangle$  Es el desplazamiento (cuadrático) promedio de los caminantes (en  $m^2$ ).
- $\Delta$  El tiempo de difusión en el que se desplazaron (en  $s$ ).
- $D$  El coeficiente de difusión (en  $m^2/s$ ).

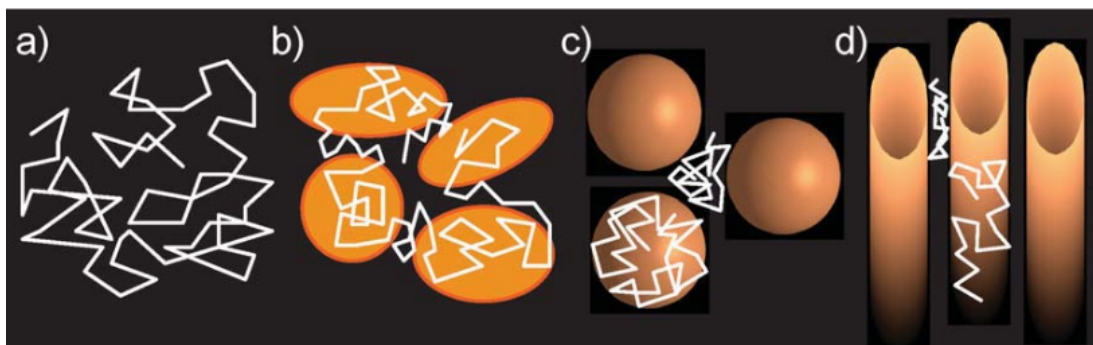
El coeficiente de difusión  $D$  es una propiedad intrínseca del sistema. Este se determina por el tamaño de las moléculas en difusión y la temperatura del ambiente, de la cual depende linealmente. Por ejemplo, el coeficiente de difusión del agua a una temperatura de  $37^\circ C$  corresponde a  $3 \times 10^{-9} m^2/s$  (50, 51).

En un ambiente restringido los caminantes no se pueden desplazar a zonas donde existan barreras que lo impidan. El desplazamiento promedio de los caminantes en una zona restringida nos permite inferir de manera indirecta la geometría del medio que los contiene. La Figura 3.1 ilustra un ejemplo de un caminante aleatorio desplazándose en un medio libre y en medios restringidos. Saber la distribución de desplazamiento de millones de caminantes nos permitiría inferir restricciones del medio que los contiene.

### 3.2. DW-MRI

Las DW-MRI sensibilizan el contraste de las imágenes de resonancia a la difusión de las moléculas del agua en tejido biológico. Las DW-MRI logran este contraste mediante un par de gradientes en el campo magnético en el resonador. Dichos gradientes modifican el campo magnético de manera lineal en una orientación espacial concreta (o en orientaciones simultáneas, como veremos más adelante en esta tesis), la cual es capaz de codificar el desplazamiento del agua en dicha orientación.

El núcleo del hidrógeno en las moléculas de agua posee un spin el cual está precesando de manera innata. Cada spin produce un pequeño campo magnético que en su estado natural (fuera de un campo magnético externo), se encuentran en equilibrio. Este estado de equilibrio implica que la precesión entre los spins se encuentra fuera de fase (desfasados), y que la suma de los todos pequeños campos magnéticos es nula. El campo magnético del equipo MRI alinea la precesión de estos spins poniéndolos en la misma fase. Estas moléculas en fase producen el vector magnético necesario para el efecto de resonancia con el cual obtenemos la señal de MRI. Para más detalles sobre MRI, se recomiendan la siguientes lecturas (53, 54, 55).



**Figura 3.1: Movimiento browniano.** El movimiento browniano sucede de manera aleatoria debido a la energía térmica innata de las moléculas de agua. Esta figura ilustra la caminata aleatoria de algunas partículas en distintos medios: A) En un medio libre es isotrópico y homogéneo. B) En un medio complejo, con barreras permeables y geometrías, el movimiento se encuentra más restringido pero en promedio es isotrópico. C) En este caso el movimiento se encuentra aún más restringido sin barreras permeables, el movimiento es isotrópico pero muy restringido. D) En este escenario el movimiento es anisotrópico, pues va a la par de las barreras alineadas que lo limitan. Figura tomada de (52).

En DW-MRI, los gradientes de difusión realizan un experimento de desfasamiento y refasamiento sobre los spins (Un gradiente para desfasar y otro para refasar). El desplazamiento de las moléculas aumenta linealmente el desfasamiento de los spins en la orientación(es) que de los gradientes de difusión.

En el caso de que las moléculas no se desplazaran, dicho experimento de desfasamiento/refasamiento produciría la misma señal de resonancia como si no hubiera habido gradientes, dado que las moléculas terminarían con la misma fase que al inicio del experimento. Sin embargo, el desplazamiento de las moléculas, posterior al primer gradiente de difusión, produce un desfasamiento que el segundo gradiente no puede compensar. Este desfasamiento descompensado produce una caída en la señal medida de resonancia. Dado que esta caída de señal corresponde al nivel de desfasamiento, el cual es proporcional al desplazamiento de agua, podemos concluir que la caída de señal en cierta orientación corresponde al nivel de movimiento de agua en dicha orientación.

La geometría de la microestructura en tejido biológico restringe el movimiento libre de las moléculas de agua. Por lo tanto, la difusión de las moléculas de agua se ve afectada por las barreras celulares que lo limitan (56). Por ejemplo, en una fibra nerviosa el agua se mueve con mayor libertad sobre la orientación paralela a los axones que en la orientación perpendicular, el cual está restringido por las barreras axonales y células en el espacio extra-axonal.

En DW-MRI sondeamos el desplazamiento del agua en múltiples orientaciones. Ya sea orientación por orientación (codificación lineal en sección 3.3) o en adquisiciones



capaces de sondear múltiples orientaciones en un experimento (codificación multidimensional en sección 3.5). Distintos experimentos de DW-MRI sobre tejido biológico (restringido) producirían múltiples señales de resonancia. Esta diversidad de información es la que nos permite inferir, mediante modelos matemáticos (ver secciones 3.4 y 3.6), distintas propiedades microestructurales.

### 3.3. La codificación unidimensional de difusión (lineal)

El experimento estándar de DW-MRI utiliza una secuencia de pulsos<sup>1</sup> que consiste en un par de gradientes rectangulares diseñados para codificar la difusión en una sola orientación. Los gradientes rectangulares suceden de manera simétrica alrededor del pulso de radiofrecuencia, requerido para obtener el eco de spin en MRI (57). Por esta razón, en la literatura clásica se le conoce como “Eco de Spin por Gradientes pulsados” (PGSE, por sus siglas en inglés: (Pulsed Gradient Spin-Echo)) (58). Inicialmente fue descrita por Stejskal y Tanner (6), por lo cual también se le llama la secuencia Stejskal–Tanner. Actualmente, esta secuencia es conocida como “Codificación unidimensional de difusión” (SDE, por sus siglas en inglés: *Single Diffusion Encoding*). Esta convención fue establecida en (59) para homogeneizar la nomenclatura de las distintas metodologías de adquisición DW-MRI modernas (sección 3.5). Utilizaremos la convención de SDE para referirnos a esta secuencia en el resto de la tesis.

En SDE podemos parametrizar los gradientes pulsados de la secuencia con las siguientes variables

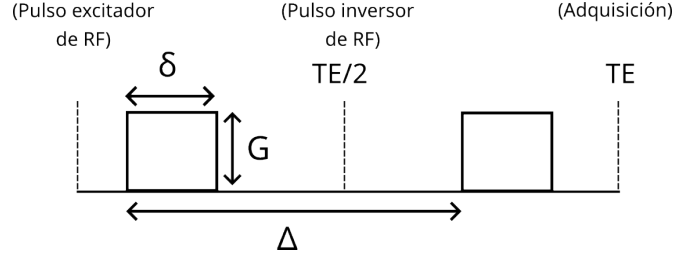
- $G$ . Magnitud del gradiente (en T/m).
- $\vec{g}$ . orientación del gradiente (Vector unitario).
- $\Delta$ . Tiempo de separación entre los pulsos de gradiente (en s).
- $\delta$ . Tiempo de duración de los pulsos de gradientes (en s).
- TE (Tiempo eco). En el tiempo eco se adquiere la señal de resonancia magnética para formar la imagen (en s)

En la Figura 3.2 se ilustra una secuencia de gradientes SDE con sus respectivos parámetros. Mediante estos parámetros podemos controlar el experimento SDE: Desde el tiempo efectivo de difusión (mediante la relación  $\Delta - \delta/3$  (58)), la orientación del experimento ( $\vec{g}$ ) y la magnitud del gradiente ( $G$ ), la cual controla la sensibilidad con la que sondeamos la difusión.

Los gradientes en SDE tienen una sola orientación y magnitud definida a lo largo del experimento de desfasamiento/refasamiento. Por lo tanto, están codificando la difusión

---

<sup>1</sup>Secuencia de pulsos: Instrucciones en el equipo MRI de cómo y cuando encender/apagar sus gradientes y pulsos de radiofrecuencia lo largo del tiempo.



**Figura 3.2: Secuencia de pulsos para la codificación unidimensional de difusión.**

Esta figura ilustra la secuencia de pulsos y sus parámetros utilizados en la codificación unidimensional de difusión. La secuencia estándar de difusión se modula mediante la magnitud del gradiente ( $G$ ), la duración del gradiente ( $\delta$ ) y el tiempo de separación entre los gradientes ( $\Delta$ ). En el tiempo eco ( $TE$ ) se realiza la adquisición de la imagen, ya que aquí se maximiza el eco de spin producido mediante los pulsos de radiofrecuencia (RF).

en una sola dimensión (orientación) a la vez. La Figura 3.3B muestra la trayectoria que recorre el gradiente en tres dimensiones al codificar en una sola orientación, colores más rojizos indican mayor tiempo transcurrido en este punto. La magnitud en  $G$  se cuantifica mediante el valor  $q$  (60) definido como:

$$q(t) = \gamma \int_0^t g(t') dt' \quad (3.2)$$

donde  $\gamma$  es la constante giromagnética del agua (42.57 MHz/T). En el caso particular de SDE, el valor máximo en la función  $q(t)$  corresponde a (60):

$$q = \gamma \delta G \quad (3.3)$$

La magnitud de  $q$  (en  $m^{-1}$ ) modula linealmente el desfase de los spins en el experimento de difusión. En un ambiente sin restricciones y dado un coeficiente de difusión, aumentar  $q$  provoca una mayor caída de la señal. La figura 3.3C ilustra la acumulación en  $q(t)$  en una dimensión, donde para SDE el máximo de esta función corresponde al valor  $q$ .

En la figura 3.3D observamos la trayectoria realizada por  $q$  para muestrear solo un punto (definido por la orientación y magnitud en  $q$ ) en el espacio  $Q$  durante el tiempo de difusión efectivo de la codificación SDE. El espacio  $Q$  es discutido con más detalle en la sección A.1.

Estos parámetros usualmente se engloban en una sola medición conocida como el b-valor (61, 62). El b-valor colapsa la información del tiempo de difusión y magnitud de  $q$  en un valor unitario. Este corresponde a la magnitud del b-vector, el cual se construye mediante el vector  $q$  en la que su orientación corresponde a la misma orientación unitaria

que  $\vec{g}$ . Formalmente el b-valor se define mediante(58):

$$b = \int_0^\tau q(t)^2 dt \quad (3.4)$$

donde la solución para SDE corresponde a (62):

$$b = (q)^2(\Delta - \delta/3) \quad (3.5)$$

o de manera equivalente

$$b = (\gamma\delta G)^2(\Delta - \delta/3) \quad (3.6)$$

donde el b-valor tiene unidades en  $\text{s m}^{-2}$ . En el campo de la investigación en DW-MRI moderna se suelen utilizar las unidades de  $\text{ms}/\mu\text{m}^2$  para estar a la misma escala del fenómeno de difusión que medimos(63). En la figura 3.3E ilustra la integral correspondiente al área sobre la función  $q(t)$  y su definición analítica para el caso SDE. La figura 3.3F ilustra el b-vector con su magnitud/tamaño (b-valor) y orientación con el cual estamos sensibilizando la señal de resonancia a la difusión en este experimento teórico.

En resumen, en SDE la codificación se define mediante el b-vector, en donde su **orientación** indica el sentido donde vamos a codificar la difusión y donde su **tamaño** (b-valor) denota el nivel de sensibilidad al experimento a la difusión.

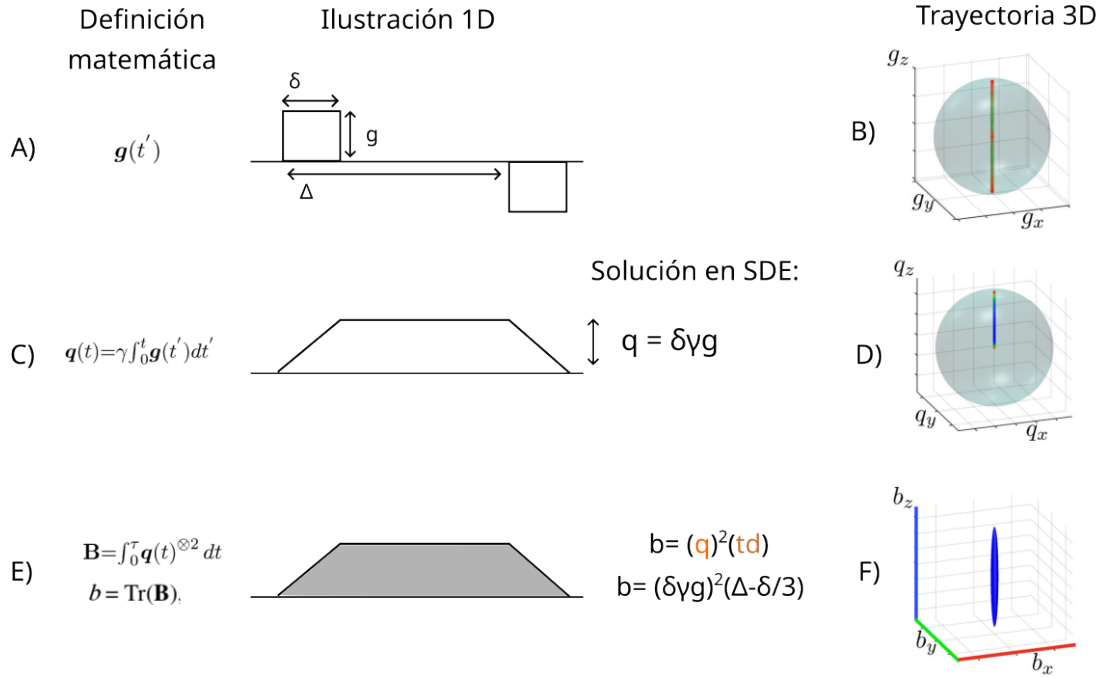
#### 3.4. Imagenología por tensor de difusión

En la imagenología por tensor de difusión (64) (DTI, por sus siglas en inglés: *Diffusion Tensor Imaging*) utiliza varias señales SDE en diferentes orientaciones para calcular un tensor que representa el fenómeno de difusión en tres dimensiones dentro de un voxel.

El tensor es una matriz numérica con unidades físicas (en este caso las unidades de difusividad  $\text{m}^2/\text{s}$ ) que obedecen ciertas reglas matemáticas para poder caracterizar un fenómeno físico. El objetivo de DTI es obtener el tensor simétrico de segundo orden que caracteriza el fenómeno tridimensional de difusión representado mediante:

$$D = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{xy} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{xz} & D_{yz} & D_{zz} \end{pmatrix}. \quad (3.7)$$

Donde los elementos diagonales de la matriz corresponden a la difusividad sobre los tres ejes principales y los otros elementos corresponden a la correlación de desplazamientos entre los ejes principales. El tensor de difusión se puede ver como la matriz de covarianza tridimensional del desplazamiento de los caminantes en cierto tiempo (ver sección 3.1).



**Figura 3.3: La relación entre el gradiente de difusión  $g$ , el vector  $q$  y el b-valor en DW-MRI.** A) Representación matemática y esquema de una secuencia de pulsos con codificación unidimensional (SDE). En este esquema se utiliza el gradiente inverso para decodificar la difusión el cual no requiere un pulso de radiofrecuencia (eco de gradiente). B) Representación tridimensional de la trayectoria recorrida por un gradiente sobre el eje  $z$ . La intensidad del color rojo representa mayor tiempo en ese punto espacial. C) Definición matemática e ilustración de la función  $q(t)$  del gradiente en el panel A. Para SDE, el valor máximo de esta función corresponde a  $\delta\gamma g$ . D) Trayectoria tridimensional del vector  $q$ . El valor  $q$  llega a su máximo valor y se mantiene por el tiempo de difusión definido mediante  $\Delta$ . E) Definición matemática del b-valor y su ilustración que muestra el área bajo la curva de la función  $q(t)$ . Para SDE existe una solución analítica que se puede obtener directamente de los parámetros del gradiente. F) Representación del tamaño (b-valor) y orientación (b-vector) de esta adquisición SDE. Las figuras en la última columna se adaptaron de (9).

El modelo<sup>1</sup> en DTI asume que la difusividad en el medio se puede modelar mediante una distribución gaussiana (i.e. los caminantes se desplazan en un medio libre), y que por ende su relación con la señal de resonancia magnética también es gaussiana (65). Formalmente, DTI establece la siguiente relación para la señal de resonancia

$$S(b) = e^{-b^T D b}, \quad (3.8)$$

donde:

- $b$ . El b-valor-vector que parametriza la adquisición SDE.
- $S(b)$ . La señal de resonancia obtenida para ese  $b$ .
- $D$ . El tensor de difusión.

Para obtener el tensor  $D$  se construye un sistema de ecuaciones (66) que nos permita extraer los valores de  $D$  de un conjunto de señales de resonancia por difusión. Dado que el tensor tiene seis elementos únicos, requerimos al menos seis adquisiciones con diferentes b-vectores para resolver el sistema. En la práctica, se hacen más adquisiciones (30-45) para hacer más robusta la solución computacional al ruido y otros artefactos. Para cumplir con la suposición de Gaussianidad el b-valor debe estar dentro del régimen donde la caída de la señal es gaussiana(65), lo que para tejido in-vivo tiene un valor máximo de  $1\text{ms}/\mu\text{m}^2$ .

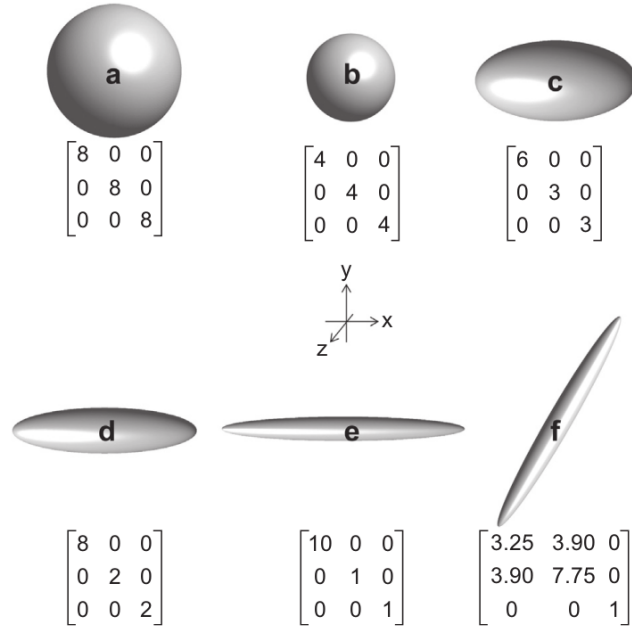
El tensor de difusión se puede visualizar mediante un elipsoide que representa la difusividad tridimensional desde su origen. Los ejes principales de la elipsoide corresponden a los eigenvectores del tensor, mientras que los tamaños corresponde a sus eigenvalores (denotados como  $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ ) (65). Si el tensor de difusión es sólo una diagonal, estos corresponden a sus eigenvalores, los cuales indican la difusión sobre cada eje principal. La Figura 3.4 se muestran algunos ejemplos de tensores y sus correspondientes elipsoides.

#### 3.4.1. Métricas del tensor de difusión

Al tensor de difusión se le pueden extraer métricas que nos informan sobre su tamaño y forma. Estas métricas dan una medida indirecta sobre la microestructura latente del medio. Las métricas son invariantes rotacionales y se construyen a partir de los eigenvalores del tensor. Dado que el tensor de difusión es positivo y simétrico, se cumple que  $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \lambda_3 \geq 0$ , definimos los siguientes cuatro escalares:

---

<sup>1</sup>Hay dos tipos de modelaje de DW-MRI: 1. Los modelos biofísicos, que parametrizan directamente propiedades microestructurales basándose una “caricatura” que captura propiedades específicas del tejido y 2. Los modelos fenomenológicos o representaciones de señal, los cuales son modelos matemáticos que nos permiten operar sobre la señal sin suposiciones del tejido. DTI es una representación de señal pues sólo asume gaussianidad en la señal sin realizar suposiciones de microestructura. Por simplicidad usaremos el término modelo para las representaciones discutidas en esta tesis. Para mayor información recomiendo (7).



**Figura 3.4: Tensores de difusión y sus elipsoides correspondientes.** Los tensores (a) y (b) son isotrópicos (difusión libre), con sus elementos en la matriz iguales. Nótese (a) duplica el tamaño de (b), lo que resulta en un tensor el doble de grande. Los tensores (c), (d) y (e) están alineados con respecto al eje  $x$ , donde tienen un mayor valor. El tensor en (f) ha sido rotado sobre el eje  $z$  en un ángulo de  $60^\circ$ , lo que se refleja en que valores relacionados con  $x, y$  fuera de la diagonal sufren cambios. Figura tomada de (65).

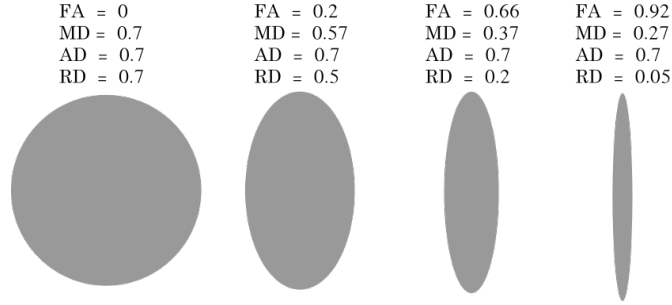
**Difusividad media** (MD, por sus siglas en inglés: *Mean diffusivity*): Nos indica el tamaño del tensor de difusión. Es el promedio de sus tres eigenvalores:  $MD = (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3)/3$  o equivalentemente la traza de  $D$ .

**Difusividad axial** (AD, por sus siglas en inglés: *Axial diffusivity*): Es la difusividad en el eje principal del tensor:  $AD = \lambda_1$ .

**Difusividad radial** (RD, por sus siglas en inglés: *Radial diffusivity*): Es la difusividad promedio en el plano perpendicular al eje principal del tensor:  $RD = (\lambda_1 + \lambda_2)/2$ .

**Fracción de anisotropía** (FA, por sus siglas en inglés: *Fractional Anisotropy*): Es un escalar normalizado que indica el nivel de anisotropía del tensor. Indirectamente está relacionado con la forma del tensor. Cuando FA vale 0 el tensor es enteramente isotrópico y en 1 es un tensor deformado con anisotropía máxima con forma de “cigarrillo”.

El modelo en DTI es muy utilizado en la clínica e investigación en DW-MRI. Ha sido muy útil para el estudio de isquemia o estructura en materia blanca (2, 68). Sin embargo, la suposición de gaussianidad limita su uso pues la difusión en tejido biológi-



**Figura 3.5: Ejemplos de las métricas del tensores de difusión.** Cuatro elipsoides de tensor de difusión que van de poca a mucha anisotropía. La difusividad axial es la misma para todos los ejemplos. Conforme se reduce progresivamente su difusividad radial su difusividad media también baja y aumenta su fracción de anisotropía. Figura adaptada de (67).

co no ocurre de manera gaussiana. Además, aunque DTI es muy sensible a cambios microestructurales, no es muy específico en distinguir sobre el tipo de cambio microestructurales que afectaron los valores del tensor, i.e., varios perfiles microestructurales. Por ejemplo, métricas obtenidas de DTI como decremento en FA se han observado en modelos de Alzheimer, Parkinson y esclerosis múltiple(69).

#### 3.4.2. El tensor de kurtosis

En tejido biológico, dado por la celularidad presente en el medio, es un sistema obstaculizado/restringido para que haya difusión libre. Por lo tanto, en tejido biológico la difusión no ocurre de manera gaussiana. Esta complejidad del tejido resulta en una distribución de difusión con kurtosis, la cual cuantifica que tanto se aleja una distribución de una gaussiana.

La imagenología por tensor de kurtosis (70) (DKI, por sus siglas en inglés: *Diffusion Kurtosis Imaging*) se desarrolló para cuantificar los efectos de kurtosis en el medio. El modelo en DKI es una extensión el modelo del tensor, donde además de calcular el tensor de segundo orden  $D$ , obtenemos el tensor de cuarto orden  $K$  el cual denota la no gaussianidad del medio.

Formalmente, DKI extiende el modelo tensor y su relación con la señal de resonancia con:

$$S(b) = e^{-bD+b^2D^2K/6}, \quad (3.9)$$

donde  $K$  es el tensor simétrico de cuarto orden de Kurtosis. En este caso el tensor  $K$  contiene 15 elementos únicos, que sumando los 6 elementos requeridos para calcular al tensor, se requieren al menos 21 adquisiciones para poder realizar DKI. Adicionalmente, para sensibilizar a la señal a los efectos de kurtosis, es necesario obtener más

orientaciones en b-valores más elevados (71). Los protocolos de DKI usualmente utilizan 30 orientaciones para dos b-valores en  $1 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  (para sensibilizar a gaussianidad) y  $2 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  (para kurtosis).

El origen de la kurtosis en tejido neurobiológico puede resultar de varias fuentes (72): la heterogeneidad celular del medio, los ambientes micro anisotrópicos, u otros eventos de difusión complejos como la dependencia de la difusión en el tiempo (73). La métrica de kurtosis en DKI nos puede dar algo de información sobre todo estos eventos. Sin embargo, con SDE no es posible saber con especificidad cuál de los casos la origina.

### 3.5. La codificación multidimensional de difusión (b-tensorial)

La secuencia SDE (sección 3.3) se ha utilizado extensivamente en los últimos cincuenta años para estudiar el proceso de difusión. Las adquisiciones SDE han demostrado mucha utilidad gracias a su sensibilidad a la difusión en la investigación y en algunas aplicaciones clínicas. Sin embargo, la secuencia SDE está limitada en el nivel de información que pueden adquirir debido a que no es específica a ciertas propiedades microestructurales. Por ejemplo, en el campo del modelaje biofísico, las secuencias SDE están limitadas a solo obtener un número limitado de parámetros. Hacer modelos más complejos, que a veces resulta necesario para poder capturar las características específicas del tejido, puede resultar en un problema degenerado, i.e., hay varias combinaciones de parámetros que explican la misma señal de difusión sin que haya forma de distinguir el verdadero valor biológico (74). También es muy complejo obtener información a nivel micro-anisotrópico de la celularidad dentro de un voxel. Esto sucede debido a que las adquisiciones SDE colapsan las contribuciones de anisotropía, orientación y tamaños de la celularidad en una sola orientación.

En la última década, avances científicos y tecnológicos en el campo e las adquisiciones DW-MRI han permitido obtener codificaciones de difusión con información adicional no adquirible mediante SDE. Concretamente, la codificación multidimensional de difusión (8) (MDE, por sus siglas en inglés: "Multidimensional diffusion encoding") ha permitido eludir algunas de estas limitaciones para seguir expandiendo la utilidad diagnóstica de DW-MRI.

En SDE cada codificación de difusión ocurre con una magnitud y una orientación específica (sección 3.3). En MDE la codificación sensibiliza la señal a la difusión en varias orientaciones a la vez, i.e., no sólo sensibilizamos la señal a una orientación concreta sino a la correlación de desplazamiento simultánea en varias orientaciones en un espacio tridimensional. Los orígenes de las secuencias de MDE datan a los primeros experimentos con codificación doble de difusión (75), donde se colocaban dos secuencias SDE en una misma adquisición, pero con orientaciones perpendiculares entre sí, y posteriormente la codificación triple de difusión (76), donde se realizan tres adquisiciones SDE continuas en orientaciones ortogonales. Estos experimentos demostraron que había información útil en estas secuencias que era capaz de extraer detalles sobre la micro-anisotropía del medio (8), información que se encuentra colapsada en modelos



basados en SDE(77).

Actualmente el estado del arte en MDE son las adquisiciones por codificación del b-tensor<sup>1</sup> (9, 78). La codificación por b-tensor utiliza ondas de forma de gradiente libres, i.e. no necesariamente rectangulares como las utilizadas en SDE. Esto permite diseñar una plétora de codificaciones MDE bajo el mismo marco de trabajo. Las formas de onda del gradiente se optimizan numéricamente (79) para obtener un b-tensor simétrico que cumpla ciertas características que permitan la codificación multidimensional. El b-tensor es una extensión dimensional al b-vector descrito en la sección 3.3. Mientras que el b-vector se parametriza mediante su tamaño y orientación, el b-tensor se parametriza por su **tamaño, orientación y forma**.

La forma del b-tensor agrega una nueva dimensión que nos permite obtener información adicional a la de SDE. Existen tres formas canónicas del b-tensor las cuales codifican la difusión de manera distinta: Lineal, plana y esférica (LTE, PTE y STE respectivamente. Todas por sus siglas en inglés: *Linear, planar, spherical tensor encoding*). La codificación lineal sensibiliza la señal de difusión en una sola orientación y magnitud, i.e., este es un experimento equivalente al SDE. La codificación plana sensibiliza la señal de difusión sobre todo un plano (2D en el espacio tridimensional) orientado perpendicularmente a la orientación principal del b-tensor. La codificación esférica sensibiliza la señal sobre todo el espacio tridimensional, lo cual retira de manera efectiva cualquier dependencia a la orientación de la adquisición a la anisotropía del medio(80). La Figura 3.6 presenta un esquemático de como sensibilizan a la difusión del medio las tres formas canónicas del b-tensor. La forma del b-tensor construye una manera efectiva de sensibilizar a geometrías específicas, e.g., usar b-tensores lineales en diferentes orientaciones para maximizar la sensibilidad a orientación de los axones o usar b-tensores esféricos de distintos tamaños para sensibilizar al tamaño de la distinta celularidad redonda en el medio. Es posible optimizar las formas de ondas de gradiente para obtener formas del b-tensor intermediarias entre ellas, e.g., un b-tensor con forma de zepelín que es una forma intermedia entre el lineal y la esférica. Estas formas no canónicas están fuera del alcance de esta tesis pero cabe destacar es un área de investigación activa en el campo (81, 82).

El tensor-B se calcula de manera similar al descrito para el b-vector en la sección 3.3, pero generalizado a formas de onda de gradiente arbitrarias. Partiendo de la definición de  $q(t)$ :

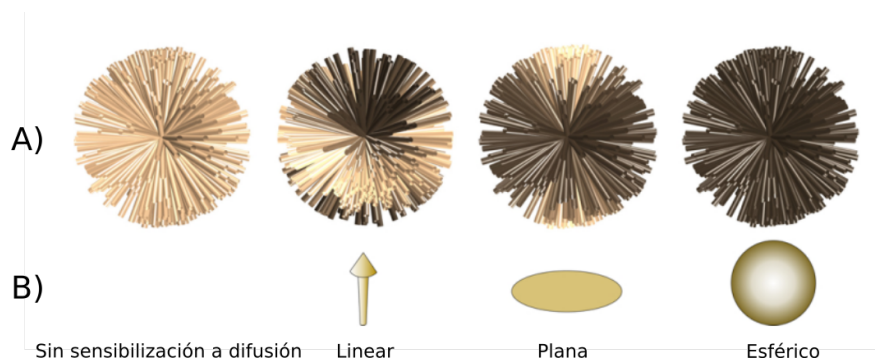
$$q(t) = \gamma \int_0^t g(t') dt' \quad (3.10)$$

El b-tensor se generaliza con(9):

$$B = \int_0^\tau q(t)^{\otimes 2} dt \quad (3.11)$$

---

<sup>1</sup>El b-tensor sólo denota la forma codificación de difusión y sólo depende de la forma de onda del gradiente. No confundir con el tensor de difusión que engloba el proceso de difusión tridimensional, el cual depende de la microestructura del medio.



**Figura 3.6: Formas y sensibilidad del b-tensor** Las diferentes formas del b-tensor (fila B) nos permite sensibilizar al medio (fila A) de maneras distintas. El área grisácea en la ilustración de microestructura fila A corresponde a las orientaciones donde se codificó la difusión mediante el tensor en la fila B. La codificación lineal sucede en una orientación, lo cual resulta en un experimento equivalente al utilizado de manera clásica en DW-MRI. La codificación plana ocurre sobre un plano, en este caso perpendicular al utilizado en la lineal. La codificación esférica sensibiliza la difusión en todas las orientaciones. Figura tomada de (83).

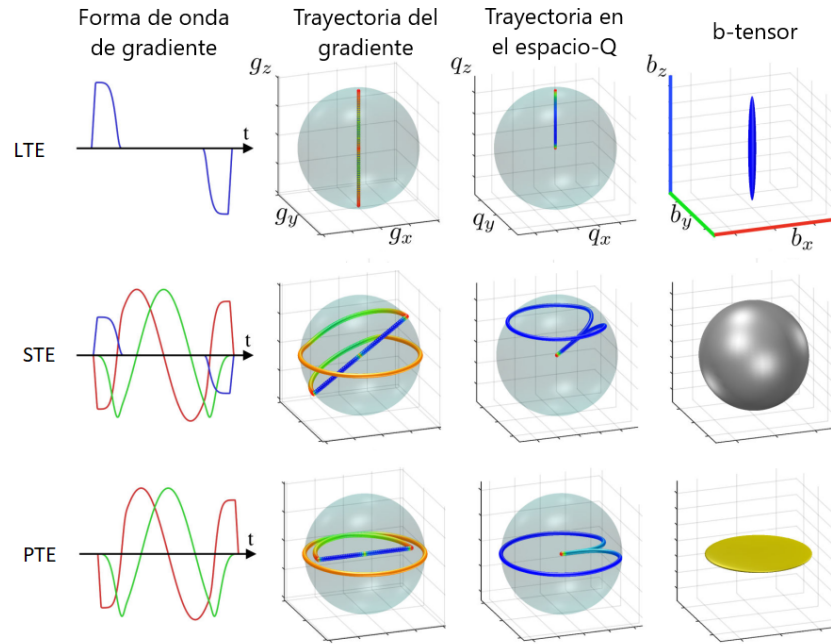
donde  $\otimes 2$  representa el producto exterior de  $q(t)$  consigo mismo. Es importante notar que la forma del b-tensor depende de la trayectoria realizada por la función  $q(t)$ (9). La Figura 3.7 ilustra varios ejemplos de la relación entre la trayectoria tridimensional del gradiente, la trayectoria de  $q(t)$  y sus respectivos b-tensores.

De manera similar a las métricas para el tensor de difusión, los eigenvalores/vectores del b-tensor nos permiten saber su forma, orientación y tamaño. El tamaño corresponde a la traza del b-tensor ( $b\text{-valor} = \text{Tr}(B) = (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3)/3$ ). Su orientación corresponde a la orientación del eigenvector principal más grande ( $b\text{-vector} = e_1$ ). Su forma está definida mediante(84)  $b\text{-forma} = (\lambda_1 - (\lambda_2 + \lambda_3)/2)/b$ , para los cuales un valor de 1 corresponde a un tensor lineal, un valor de 0 es un tensor esférico y un valor de -0.5 es un tensor plano.

### 3.6. El modelo de la distribución de tensores de difusión

El modelo de la distribución de tensores de difusión(15) (DTD, por sus siglas en inglés: *Diffusion Tensor Distribution*) es una expansión del modelo del tensor de difusión en el cual modelamos al fenómeno difusión mediante una distribución de compartimentos gaussianos (i.e. micro-tensores de difusión) los cuales pueden variar en su forma, tamaño y orientación. La Figura 3.8B muestra un ejemplo visual de una DTD.

Como se mostró en la sección 3.4, DTI ajusta un solo tensor de difusión que carac-



**Figura 3.7: Los b-tensores, su gradiente y su trayectoria en el espacio-Q.** Tres ejemplos de formas canónicas del b-tensor (Lineal, esférico y plano - cuarta columna) y sus respectivas forma de onda y trayectoria del gradiente (Primera y segunda columna) y la trayectoria realizada en el espacio-Q requerida para obtenerla (Tercera columna). El color en las trayectorias se vuelve más rojizo mientras más tiempo estuvo la trayectoria en ese punto. Figura adaptada de (9).

teriza el promedio de los desplazamientos de las moléculas en toda la diversa microestructura contenida en un voxel. Aunque DTI ha demostrado ser sensible a cambios microestructurales, no es específico debido a que es posible existan múltiples configuraciones microscópicas que resulten en el mismo tensor de difusión. La DTD ofrece una solución a este problema al modelar en un mismo voxel una colección de micro-tensores de difusión, expandiendo la información (colapsada en un sólo tensor en DTI) en micro-tensores con múltiples formas, tamaños y orientaciones. La diversidad en esta distribución puede explicar diferentes ambientes microscópicos (Figura 3.8D). En la Figura 3.8C se muestra ejemplos de múltiples configuraciones de la DTD las cuales podrían derivarse tejido muy distinto entre sí, que sin embargo resultan en el mismo tensor de difusión de la Figura 3.8A.

El concepto del modelo de la distribución del tensor de difusión se formalizó sólo una década después de DTI (86, 87), lleva en investigación desde entonces mediante perspectivas. Sin embargo, poder extraer la distribución completa en información utilizando solamente información de adquisiciones SDE ha demostrado ser complicado. En

la literatura se han desarrollado varias implementaciones utilizando SDE que estiman algunos parámetros de distribuciones acotadas de tensores de difusión, ya sea mediante modelos multi-tensor que sólo estiman parámetros de un par de tensores a la vez (88, 89) o distribuciones acotadas a ciertas simplificaciones (90).

Fue hasta la introducción de la codificación por tensor-b donde se comenzaron a desarrollar avances considerables en la estimación de la DTD (15). Esto gracias a que la información complementaria en secuencias MDE permite tener un mayor soporte de información contenida en los datos (91), con la cual podemos estimar de manera más completa la DTD.

La señal de resonancia por difusión obtenida al codificar mediante el b-tensor asumiendo una distribución de tensores de difusión se modela mediante(9):

$$S(B) = \langle e^{-B:D_j} \rangle, \quad (3.12)$$

donde  $\langle \cdot \rangle$  es el producto interno tensorial y  $\langle \cdot \rangle$  es el promedio de la señal de resonancia sobre todos los microambientes en el voxel ( $j$ ). De esta expresión podemos intuir la importancia de la forma del b-tensor, ya que el producto tensorial en esta expresión maximiza el cambio en la señal de resonancia cuando la forma del b-tensor y del micro tensor de difusión es parecida (92). En la práctica, buscamos sensibilizar la señal de resonancia utilizando distintas formas, tamaños y orientaciones del b-tensor para poder sondear la diversidad de los microambientes en tejido biológico. Esta diversidad de información con distintos b-tensores es lo que produce señales de resonancia con mayor soporte de información para modelos más complejos como la DTD. Efectivamente, la Figura 3.9 muestra simulaciones de señal generadas con diferentes DTD y codificadas mediante las tres formas canónicas del b-tensor. Esta figura muestra que: 1. La señal de lineal resulta muy similar para los casos b, c y d. Utilizar sólo la señal para distinguir entre los tres es imposible. 2. Las señales obtenidas entre las tres formas canónicas son distintas entre sí. Estas diferencias brindan información que hace factible separar entre los cuatro casos.

### 3.7. Imagenología por trayectoria del espacio-Q

La imagenología por trayectoria del espacio-Q (QTI, por sus siglas en inglés *Q-space trajectory imaging*) es un método que utiliza la codificación de difusión con b-tensor para extraer métricas descriptivas del modelo de la DTD. Su nombre hace referencia a las trayectorias tridimensionales que requieren realizar las formas de onda de los gradientes para construir las distintas formas de los b-tensores. Cabe destacar que mientras en las metodologías SDE buscan muestrear solo un punto del espacio-Q (lo cual determina una orientación y tamaño del b-vector), en QTI se busca muestrear trayectorias continuas en el espacio Q para modular los diferentes orientaciones, tamaños y formas del b-tensor. El espacio-Q se discute más en la sección A.1.

En QTI la señal de resonancia se expande mediante(9):

$$S(B) \approx e^{-B:(D) + \frac{1}{2}(B:C)}, \quad (3.13)$$

donde:

- $\mathbb{B} = B^{\otimes 2}$
- $\mathbb{C} = \langle D^{\otimes 2} \rangle - \langle D \rangle^{\otimes 2}$ .

El tensor de cuarto orden  $\mathbb{C}$  es el tensor de covarianza de  $D$  (93), el cual contiene información de la correlación espacial de la difusividad entre el espacio de orientaciones tridimensionales representadas en el tensor de difusión. QTI es análogo al método de DKI (sección 3.4.2) pero aprovechando la información adicional disponible al utilizar codificación b-tensorial. Esta ganancia de información permite romper algunas de las simetrías en el tensor de kurtosis (i.e., el tensor de kurtosis es simétrico hasta 15 elementos únicos, mientras que el tensor de covarianza es simétrico hasta en 21 elementos únicos(9)), los cuales brindan información útil de la microanisotropía del medio y sobre los distintos mecanismos que producen kurtosis.

Los tensores en QTI contienen un total de 28 elementos únicos (6 para el tensor de difusión, 21 para el tensor de covarianza y uno elemento adicional necesario para estimar la señal sin difusión), por lo tanto, requerimos al menos 28 distintos b-tensores para su estimación. Sin embargo, de manera similar que en DTI, es conveniente utilizar más adquisiciones para hacer más robusta la implementación. En el caso de codificaciones b-tensoriales, es preferible utilizar una combinación de b-tensores de distintas formas, tamaños y orientaciones para tener mayor separabilidad entre las señales de resonancia (véase Figura 3.9). El protocolo estándar de referencia para una adquisición de QTI es el mostrado en (11), donde utilizan las tres formas canónicas del b-tensor, en cuatro tamaños distintos ( $b=.2, .5, 1, 2 \text{ms}/\mu\text{m}^2$ ) y en múltiples orientaciones, las cuales se van incrementando en función del b-valor para una mayor robustez al rudo. Un protocolo óptimo para QTI es un campo de investigación activo (94, 95).

#### 3.7.1. Métricas para la distribución de tensores de difusión

Dado que en QTI también calculamos el tensor de difusión, es posible extraer las cuatro métricas clásicas de DTI (3.4): Anisotropía fraccional, difusividad media, radial y axial. Debido a las contribuciones del tensor de covarianza, QTI nos permite calcular cuatro métricas adicionales, las cuales capturan el comportamiento del ensamble de la DTD(9):

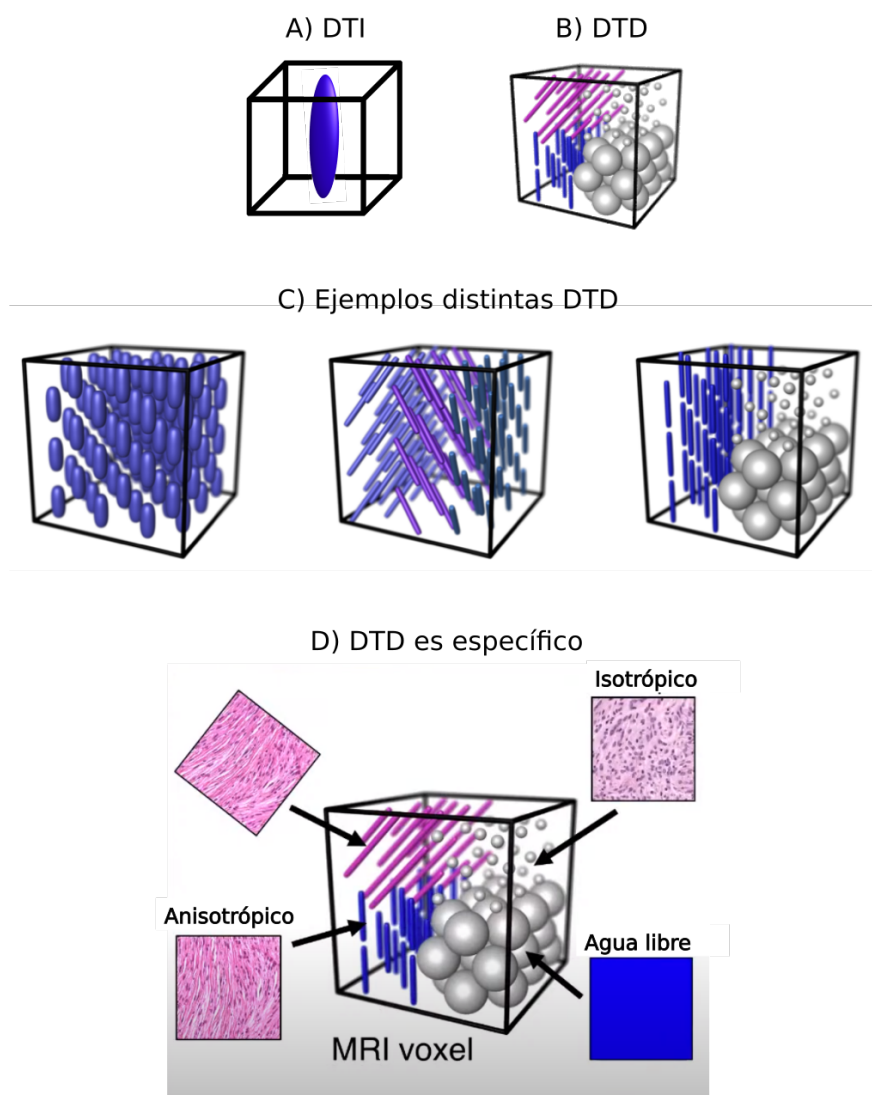
**Microanisotropía fraccional** ( $\mu\text{FA}$ , por sus siglas en inglés *micro Fractional Anisotropy*): Mide la anisotropía microscópica promedio de todos los tensores de la DTD. A diferencia de FA, la dispersión en el medio no tiene efecto sobre la medida de anisotropía en  $\mu\text{FA}$  (Figura 3.10).

**Coherencia de la orientación** ( $C_c$ ): Mide el nivel de coherencia en la orientación de los micro tensores en la DTD.

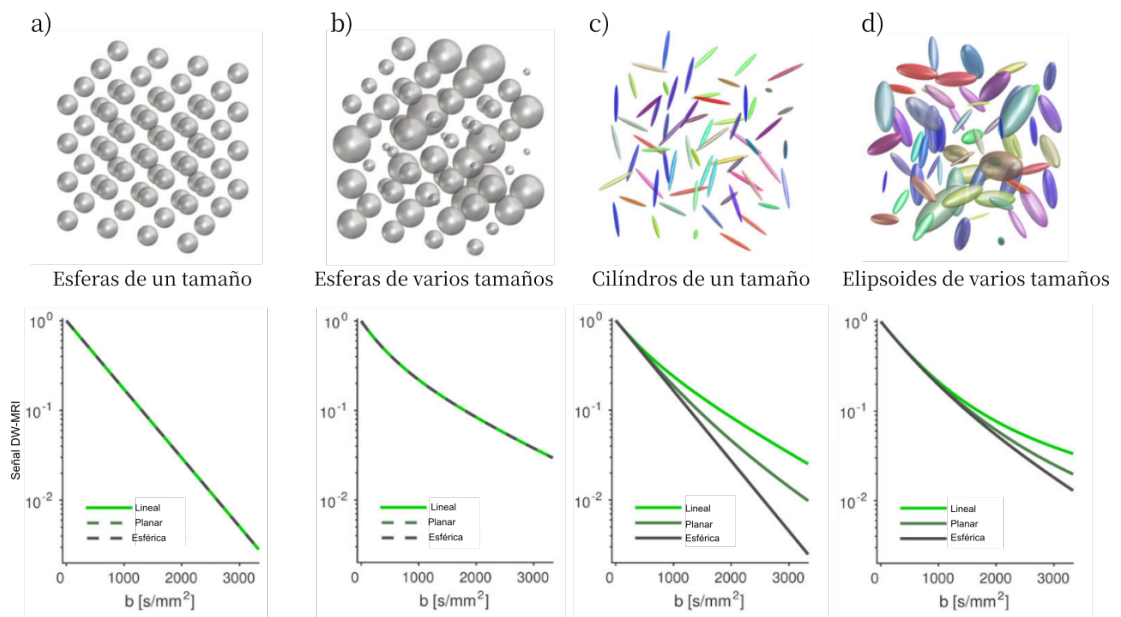
**Kurtosis isotrópica** ( $K_i$ ): Cuantifica la kurtosis producida por la varianza en los tamaños de los micro-tensores en la DTD.

**Kurtosis anisotrópica** ( $K_a$ ): Cuantifica la kurtosis producida por la anisotropía microscópica.

Las métricas de QTI, que sólo se pueden calcular mediante métodos MDE(8, 9), nos permiten obtener un nivel de especificidad que expande información colapsada en las métricas de DTI. Concretamente, ahora es posible medir los efectos de la dispersión del medio ( $\mu$ FA) y la orientación ( $C_c$ ) de los micro-tensores, los cuales estaban colapsados en FA (Figura 3.10). De manera similar, es posible extraer específicamente los efectos de kurtosis provenientes de la varianza de tamaños ( $K_i$ ) y la microanisotropía ( $K_a$ ) de los tensores, antes colapsados en la métrica de kurtosis. La Figura 3.11 ilustra ejemplos características de la DTD que cuantifican las 8 métricas adquiribles mediante QTI.

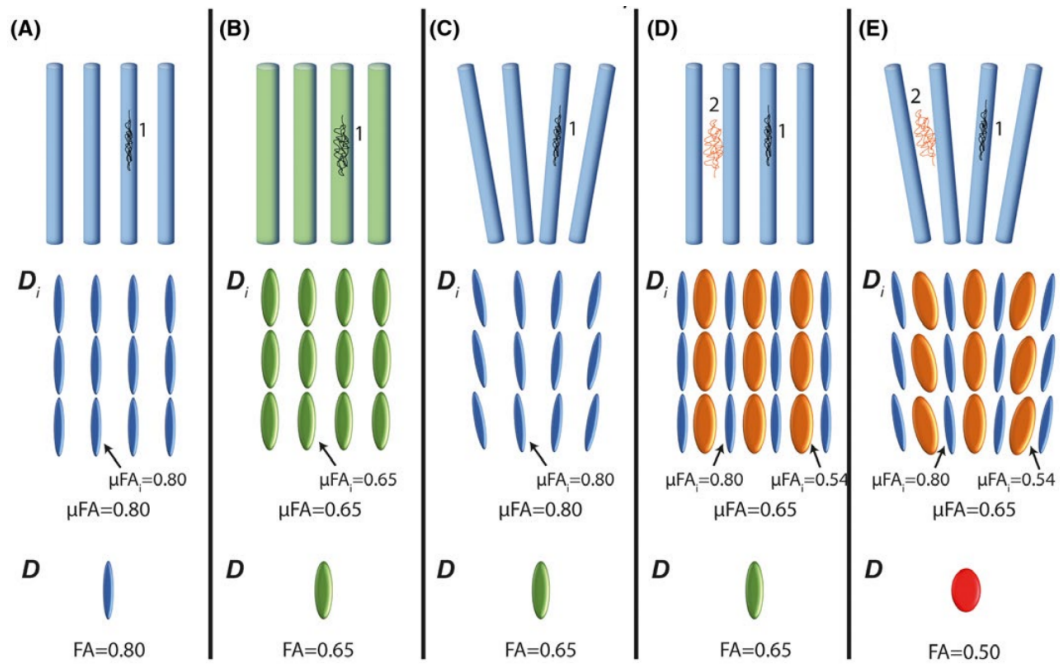


**Figura 3.8: El modelo de la distribución de tensores de difusión.** A) Ejemplo de un tensor de difusión de la imagenología por tensores de difusión (DTI). B) Ejemplo de una distribución de tensores de difusión (DTD). C) Distintos DTD. Estas distribuciones son indistinguibles para DTI ya que resultan en un mismo tensor parecido al de panel A. Figura tomada de (8). D) El modelo DTI no siempre es suficiente para capturar todas las múltiples características relevantes de un mismo voxel. DTD aproxima mejor la complejidad del medio biológico. Figura adaptada de (85).

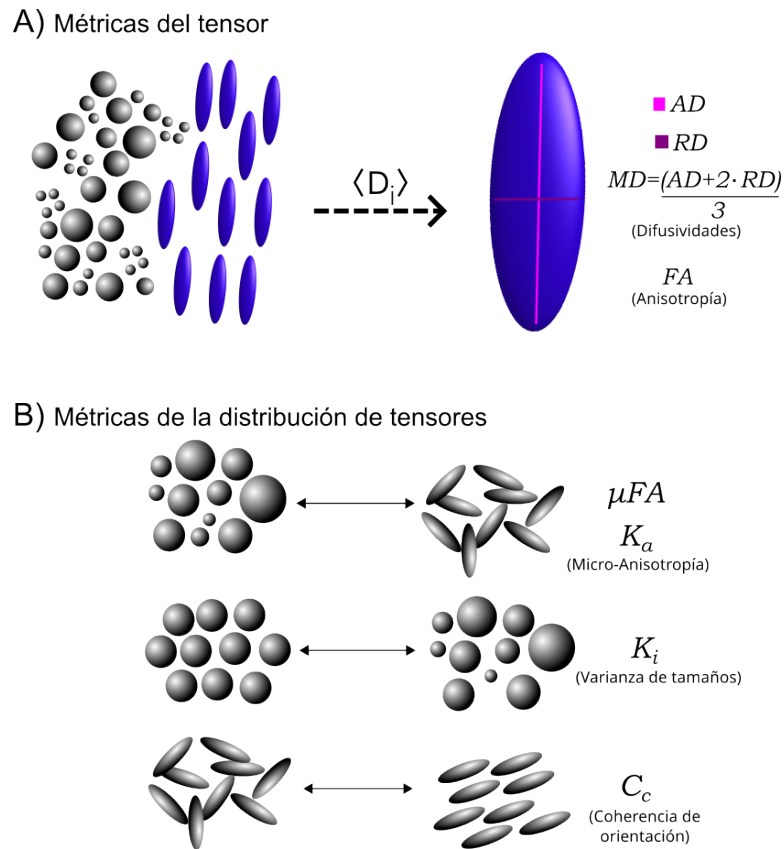


**Figura 3.9:** La señal de DW-MRI para varias casos de microambientes y distintas formas del  $b$ -tensor. La señal es simulada para cuatro distintos casos de microambientes con las tres formas canónicas de  $b$ -tensor para diferentes  $b$ -valores (tamaños). Note que la señal lineal para el caso b,c y d son muy similares, lo cual sugiere la complejidad de distinguir entre estos tres distintos casos utilizando sólo la señal lineal. Las formas plana y esférica dan perfiles de señal distintos entre sí. Esta nueva información nos permite distinguir entre los distintos tres casos. Figura adaptada de (9).





**Figura 3.10: La diferencia entre la anisotropía fraccional y la microanisotropía fraccional.** Esquemático de cinco micro ambientes distintos, su tensor de difusión y su distribución de tensores. Los ambientes son cilindros donde hay difusión adentro del cilindro (1) y afuera (2). Mientras FA es afectada por cambios en la microanisotropía (diferencias entre A y B) y por cambios de la dispersión (diferencia entre A y C), la  $\mu$ FA sólo depende de la microanisotropía. E y D demuestran que ambas son dependientes del promedio de anisotropía de los microambientes, pero  $\mu$ FA no le afecta la pérdida de coherencia entre ellos. Figura tomada de (96).



**Figura 3.11: Las métricas de QTI.** Panel A) El promedio de los micro-tensores en la DTD es el tensor de difusión de DTI, del cual podemos extraer sus métricas estándar. Panel B) Adicionalmente podemos extraer cuatro métricas sólo disponibles para métodos con codificación multidimensional.  $\mu FA$  y  $K_a$  son sensibles a la microanisotropía de los micro-tensores.  $K_i$  es sensible a la varianza de los tamaños de los tensores. Finalmente,  $C_c$  es sensible a la coherencia en la orientación de los micro-tensores en el medio.



# Justificación del proyecto

---

## 4.1. Motivación

La detección de neurodegeneración no invasiva en tejido nervioso es uno de los objetivos más anhelados en el campo de las imágenes biomédicas. Una herramienta que permita realizar una “microscopia virtual” no invasiva tiene un enorme potencial clínico. Las imágenes de resonancia pesadas por difusión son una excelente candidata para obtener dicha “microscopia virtual” pues, con un uso de modelos matemáticos adecuados, podemos extraer métricas que cuantifican características relevantes sobre la microestructura del tejido. Y aunque la DW-MRI ha demostrado una alta sensibilidad a cambios microestructurales en degeneración desde su concepción, las metodologías estándar carecen de especificidad para diferenciar distintos procesos histopatológicos. Sin embargo, recientes avances tecnológicos han dotado de mayor especificidad a las DW-MRI que, aunque prometedores, requieren validación rigurosa mediante experimentación en laboratorio e histología.

Por otra parte, los algoritmos de aprendizaje de máquina han revolucionado el progreso científico en los últimos años. Su uso en el campo de las imágenes biomédicas ha mejorado diversas aplicaciones y es cada vez más utilizado en la clínica.

Este trabajo demuestra una aplicación para detección de neurodegeneración utilizando el estado del arte en imágenes de difusión y métodos con aprendizaje de máquina en un modelo experimental de degeneración de materia blanca. Se realizan histologías para guiar y corroborar los resultados. Este trabajo muestra evidencia de que estas técnicas son buenas candidatas para lograr la deseada microscopía virtual, que colocan a las imágenes de difusión como una herramienta de alta especificidad histopatológica para su uso clínico.

### 4.2. Objetivos

#### General

Identificar el nivel de daño microestructural en materia blanca de manera no invasiva mediante DW-MRI.

#### Específicos

- Implementación y estandarización de las adquisiciones por codificación b-tensorial.
- Construir un clasificador mediante aprendizaje de máquina capaz de separar tejido sano de dañado utilizando métricas de difusión en el estado del arte en DW-MRI.
- Construir una base de datos libres de imágenes de resonancia y de histología para su uso por la comunidad científica.

# Métodos / Diseño del experimento

---

En este capítulo, se presentan los métodos y el diseño experimental realizado en esta investigación. Primero se introduce el modelo animal, con el cual se genera alguna neuropatología en el nervio óptico de un roedor. Posteriormente se describe el protocolo DW-MRI con codificación b-tensorial con el cual se extrajeron las métricas de difusión. Se describe la metodología de la histología que se siguió para adquirir las microfotografías con los datos histopatológicos. Finalmente, se reportan los métodos computacionales utilizados para construir el clasificador con aprendizaje de máquina usado en este trabajo para distinguir el nivel de daño histopatológico.

## 5.1. Modelo animal

Utilizamos ratas Wistar macho adultas (peso:  $354 \pm 59$  g). Los animales estuvieron en un cuarto del bioterio del Instituto de Neurobiología bajo un ciclo de luz/obscuridad con temperatura y humedad controladas. Las animales tuvieron acceso *ad libitum* a agua y comida. El estudio fue aprobado por el comité de bioética del Instituto de Neurobiología bajo el protocolo número 096A bajo la ley mexicana NOM-062-ZOO-1999.

### 5.1.1. Modelo experimental

Se utilizaron estas ratas para estudiar dos formas de patología de materia blanca: degeneración axonal e inflamación (ver sección 2.2). Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal con una mezcla de ketamina/xylazina (70mg/kg y 10mg/kg). Para cada animal, el procedimiento experimental consistió en lesionar el nervio óptico derecho y dejar el nervio óptico izquierdo intacto. Es posible exista una respuesta inflamatoria a los procedimientos que afecte el nervio izquierdo (aunque sea en menor medida), por lo cual incluimos un grupo sin ningún procedimiento experimental para comparación. Las ratas fueron divididas en cuatro distintos grupos:

1. Degeneración axonal (n=6). Inducido mediante isquemia retinal unilateral (97). En este procedimiento los roedores son colocados en un marco estereotáxico con el

cráneo fijo para tener libre acceso a sus ojos. Se vierten gotas de hidratación ocular en el ojo para evitar se resequen con la luz de las lámparas de soporte. Posteriormente una aguja calibre 32 es insertada en la cámara anterior en el ojo derecho, la cual está conectada a un reservorio con solución salina que se encuentra a una presión de 120 mmHg (más elevada que la presión sistólica). Esta presión es mantenida por aproximadamente 90 minutos, lo cual provocará un daño severo en la mayoría de los cuerpos neuronales y subsecuente necrosis retrógrada (ver degeneración walleriana en sección 2.2.1.1) a lo largo de los axones en la vía ocular.

2. Inflamación (n = 9). Producida mediante una inyección de  $1\mu\text{l}$  de lipopolisacárido (LPS,  $4.5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; Sigma-Aldrich) en el nervio óptico (98). En este procedimiento una pequeña incisión lateral detrás del ojo es realizada. Posteriormente, las glándulas lacrimales y músculos extraoculares son diseccionados para exponer el nervio óptico. Mediante una punta de calibre 32 (para uso dental), acoplada con una jeringa tipo Hamilton, se realiza la inyección aproximadamente a 1 cm de distancia del quiasma óptico. Después de una lenta y cuidadosa inyección, la aguja se dejó en esta posición aproximadamente por un minuto para evitar posible reflujo del líquido. La presencia de LPS en el sistema produce una respuesta glial e inflamación en el tejido (sección 2.2). Después del procedimiento la piel es suturada. Las ratas se encuentran en observación hasta que se recuperan de la anestesia y subsecuentemente son devueltos a sus cajas hasta el día de su perfusión.

3. Inyección de solución salina (n = 9). Este grupo se utilizó para evaluar el daño mecánico producido meramente por la inyección con la jeringa. El procedimiento es idéntico al descrito para el grupo anterior pero la inyección consiste en un  $1\mu\text{l}$  de solución salina.

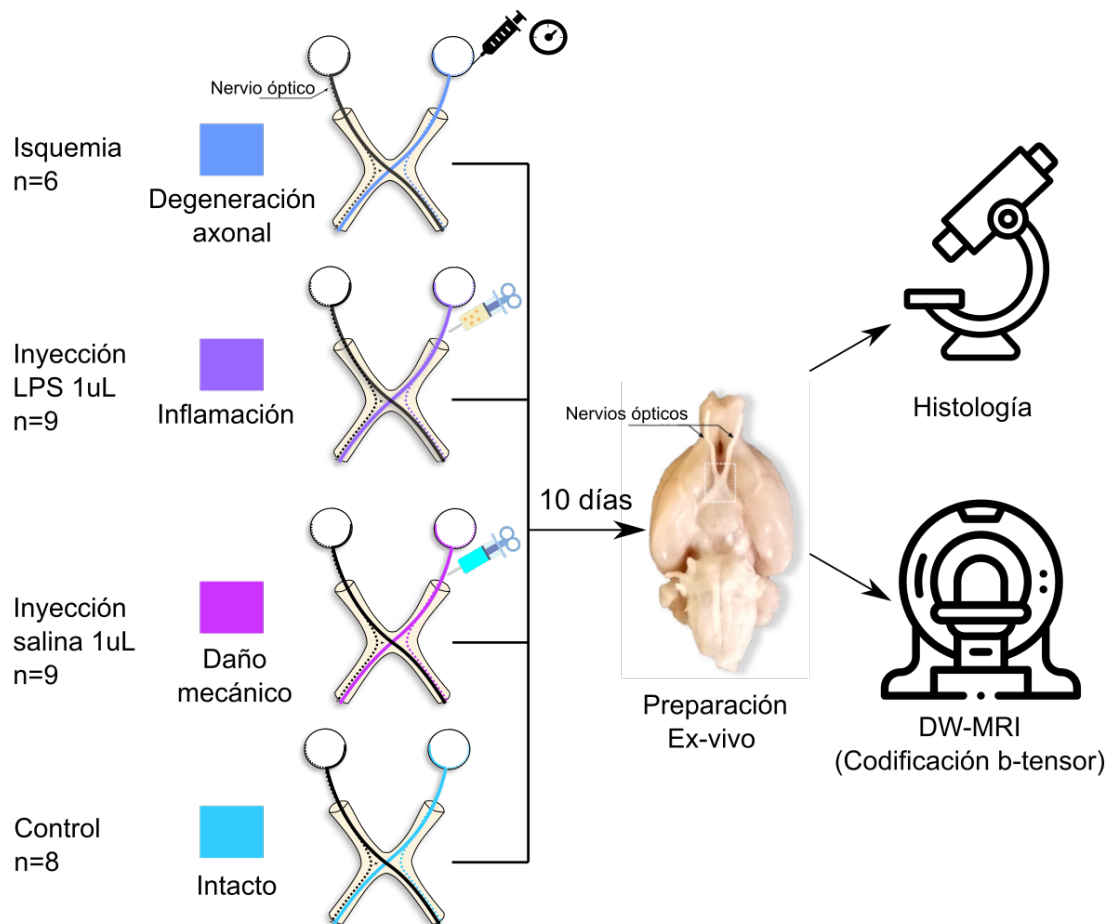
4. Control (n =8). Animales saludables con ambos nervios ópticos intactos.

La figura 5.1 ilustra el diseño general del modelo experimental y de adquisición.

### 5.1.2. Extracción cerebral

Diez días después del procedimiento quirúrgico, todos los animales son profundamente anestesiados mediante una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico. Los animales son perfundidos con una solución de cloruro de sodio (0.9 %) seguido de una solución de paraformaldehído(4 %) glutaraldehído(2.5 %). Los cerebros son extraídos cuidadosamente dejando al menos un centímetro de los nervios ópticos intacto. Los especímenes fueron post-fijados en una solución fresca de paraformaldehído(4 %) a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta el día de escaneo.

Siguiendo reportes previos del laboratorio (e.g., (99)) no realizamos un proceso de rehidratación al tejido previo al escaneo. Un proceso de rehidratación de tejido consiste en sumergir la muestra en solución de fosfatos salinos y refrigerar durante varias horas. Trabajos recientes muestran que un proceso de rehidratación aumenta los tiempos de T2 en el tejido ex vivo (100, 101) . Esto tiene el potencial de lograr un aumento en la razón ruido-senal (SNR, por sus siglas en inglés: "Signal to noise ratio") lo cual puede ser ventajoso en múltiples estudios. En nuestro estudio en particular, dado el extenso



**Figura 5.1: Diseño experimental.** Inducimos degeneración axonal o inflamación del nervio óptico derecho *in vivo* mediante isquemia retinal o inyección de LPS respectivamente. Adicionalmente, se le inyecta solución salina a un grupo de animales para evaluar el daño mecánico producido en la inyección. Los animales fueron sacrificados diez días después del experimento, el tejido fue fijado, y los cerebros y nervios ópticos fueron extraídos. Posteriormente se adquirieron datos DW-MRI con codificación b-tensorial *ex-vivo*.



tiempo de adquisición pero de alta calidad, el SNR que obtenemos es suficientemente bueno como para que la rehidratación produzca una mejora de SNR considerable. En (100) mostraron que la rehidratación produce un aumento en el coeficiente aparente de difusión. Este aumento en el coeficiente de difusión se cree acerca al tejido a un estado más similar a un estudio *in vivo*. Por lo tanto, para la mayoría de los casos es preferente realizar estas rehidrataciones. Sin embargo, también reportaron que no hubo cambios relevantes en el coeficiente de difusión para materia blanca. En este estudio, dado el alto SNR obtenido y que estamos trabajando en materia blanca, optamos por no realizar rehidrataciones al tejido. Esto simplificó la planeación de los escaneos y representó un ahorro considerable de tiempo.

## 5.2. DW-MRI

### 5.2.1. Preparación de muestra

Los cerebros/nervios ópticos fueron escaneados  $15 \pm 10$  días después de la extracción. Se prepararon los nervios ópticos para ser escaneados de la siguiente forma: Las partes más distales de los nervios ópticos fueron unidos cuidadosamente a la parte ventral del bulbo olfatorio (utilizando una gota de cianoacrilato) para prevenir que estuvieran flotando durante el escaneo. Para lograr un campo de visión reducido en la adquisición DW-MRI, cuidadosamente disecamos y mantuvimos sólo la parte basal del cerebro. Colocamos estas muestras en una jeringa con Fluorinet (FS-40, Sigma-Aldrich) y los dejamos reposar durante cuatro horas a temperatura ambiente antes del escaneo. El Fluorinet es una sustancia sin hidrógeno que no deja huella de su presencia en una imagen de resonancia. La muestra se sumerge en Fluorinet para evitar artefactos producidos por la presencia de aire(101). Minutos antes del escaneo, se revisa que las muestras estén libres de burbujas de aire agitándolas suavemente.

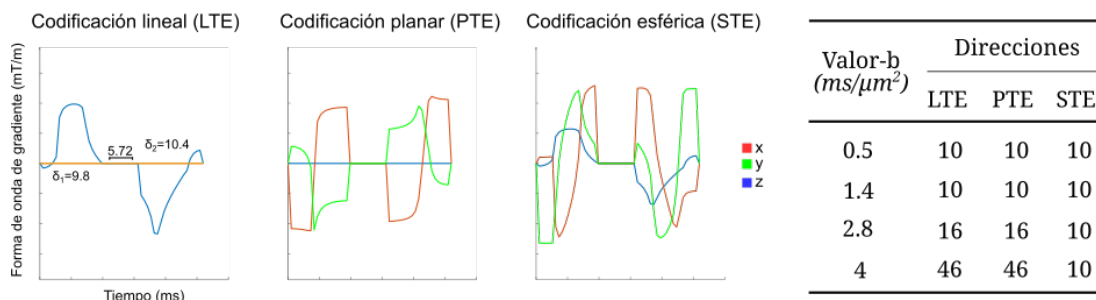
### 5.2.2. Adquisición

Los protocolos de adquisición se llevaron a cabo en el Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM) con un resonador de 7T marca Bruker (modelo Pharmascan) equipado con sistema para generar gradientes magnéticos con una magnitud de hasta 760 mT/m y con una antena de transmisión/recepción criosonda. Tanto la temperatura del cuarto de escaneo como el cabezal de montura de cerámica de la criosonda se programaron a  $21 \pm 1$  °C para el escaneo. Mantener una temperatura constante en un escaneo de difusión es vital pues la temperatura afecta directamente el coeficiente de difusión (ver sección 3.1).

Obtuvimos las imágenes DW-MRI utilizando la secuencia disponible en el repositorio “Preclinical Neuro MRI”<sup>1</sup>. Esta secuencia a ser una adquisición estándar de eco de

---

<sup>1</sup><https://osf.io/ngu4a>



**Figura 5.2: Esquema del protocolo.** El esquema completo del protocolo y ejemplos de forma de onda (para  $b=2.8ms/\mu m^2$ ) utilizados en este estudio.

spin adquiere línea por línea el *espacio k*, lo cual resultan en imágenes de muy alta calidad pero con un tiempo de escaneo extenso. La resolución del voxel fue  $80 \times 80 \times 1000 \mu m^3$ . El Tiempo de repetición (TR) es de 1500 ms, y el tiempo echo (TE) es de 30.9 ms. Se realizaron dos promedios para mejorar el SNR de la adquisición. Las adquisiciones se obtuvieron un un ángulo de desviación de  $79^\circ$ , que equivale al ángulo de Ernst que maximiza la señal en función del TR usado y el T1 del tejido (medido previamente en pruebas piloto). El tiempo total de escaneo fue de 16 horas por espécimen.

Las imágenes DW-MRI fueron obtenidas con codificación b-tensorial (sección 3.5) basadas el protocolo descrito en el repositorio de datos de imágenes en (11). Este protocolo consiste en tres tipos distintos de formas de onda para obtener codificación tensorial lineal, plana y esférica (LTE, PTE y STE respectivamente). Las formas de onda STE y PTE fueron optimizadas y compensadas (mediante términos de Maxwell (102)) utilizando el paquete de software NOW (79). Las formas de onda LTE fueron extraídas de las formas de onda STE para obtener características espectrales similares entre las formas de onda (103). Todas las formas de onda tienen la misma duración ( $\delta_1 = 9.8$ ,  $\delta_2 = 10.4$ , tiempo de separación = 5.72 ms). Cada forma de onda es escalada en la magnitud del gradiente para obtener cuatro valores b distintos (0.5, 1.4, 2.8 y  $4 ms/\mu m^2$ ). Las formas de onda STE son rotadas en 10 direcciones distintas para cada valor b. Rotar las formas de onda STE resulta en el mismo tensor-b esférico, pero esta redundancia asegura un procesamiento de datos más robusto (11). Las formas de onda LTE y PTE son rotadas para obtener [10,10,16,46] direcciones para cada valor-b correspondiente. La Figura 5.2 muestra unos ejemplos de las formas de onda y el protocolo de adquisición usado en este experimento.

### 5.2.3. Preprocesamiento

Las imágenes adquiridas no presentan artefactos considerables debido a que realizamos una adquisición de larga duración basada en eco de spin. El único paso de preprocesamiento requerido fue un algoritmo para remover el ruido, ya que las imágenes de valor-b elevado ( $4ms/\mu m^2$ ) son ruidosas. Esto lo realizamos mediante un algoritmo

en el estado-del-arte, concretamente el análisis de componente principales con distribución Marčenko-Pastur (104, 105) mediante su implementación en *mrtrix3*<sup>1</sup> (versión 3.0.3) (106). Ejemplos de imágenes preprocesadas para cada codificación b-tensorial se muestran en la Figura 5.3. Se dibujaron manualmente regiones de interés para cada nervio óptico para hasta 4 rebanadas de las imágenes obtenidas ( $92 \pm 25$  voxeles para cada nervio).

#### 5.2.4. Análisis b-tensorial

Realizamos el análisis de QTI para extraer ocho distintas métricas microestructurales a las imágenes obtenidas con codificación b-tensorial. Cuatro de ellas capturan el comportamiento macroscópico de la DTD y son equivalentes a aquellas obtenidas mediante DTI (sección 3.4): 1. Anisotropía fraccional (FA). 2. Difusividad media (MD). 3. Difusividad axial (AD) y 4. Difusividad radial (RD).

Las siguientes cuatro métricas de QTI capturan el comportamiento microscópico del conjunto DTD y sólo son obtenibles mediante métodos con codificación b-tensorial (sección 3.7): 5. Micro anisotropía fraccional ( $\mu$ FA). 6. Coherencia de orientación ( $C_c$ ). 7. Kurtosis isotrópica ( $K_i$ ) y 8. Kurtosis anisotrópica ( $K_a$ ).

Obtuvimos las métricas de QTI utilizando la implementación de QTI+. La implementación estándar de QTI está sesgada a microestructura compleja (10), mientras que QTI+ provee una solución más estable al problema de optimización de la DTD obteniendo mapas más suaves, robustos al ruido y precisos que la implementación original de QTI (95). Utilizamos la configuración estándar recomendada para QTI+ (107). Para evitar regiones donde el ajuste de QTI+ es de baja calidad, excluimos los voxeles (6.8 % de todos los datos) donde alguna de las métricas de QTI resultaban en valores fuera de su rango teórico válido: Métricas normalizadas (FA,  $\mu$ FA) deberán estar entre 0 y 1, y las métricas de kurtosis ( $K_i$  and  $K_a$ ) deberán estar entre 0 y 5.

Seguido de la adquisición DW-MRI se regresaron los especímenes a una solución de PFA (4 %) y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento histológico.

### 5.3. Histología

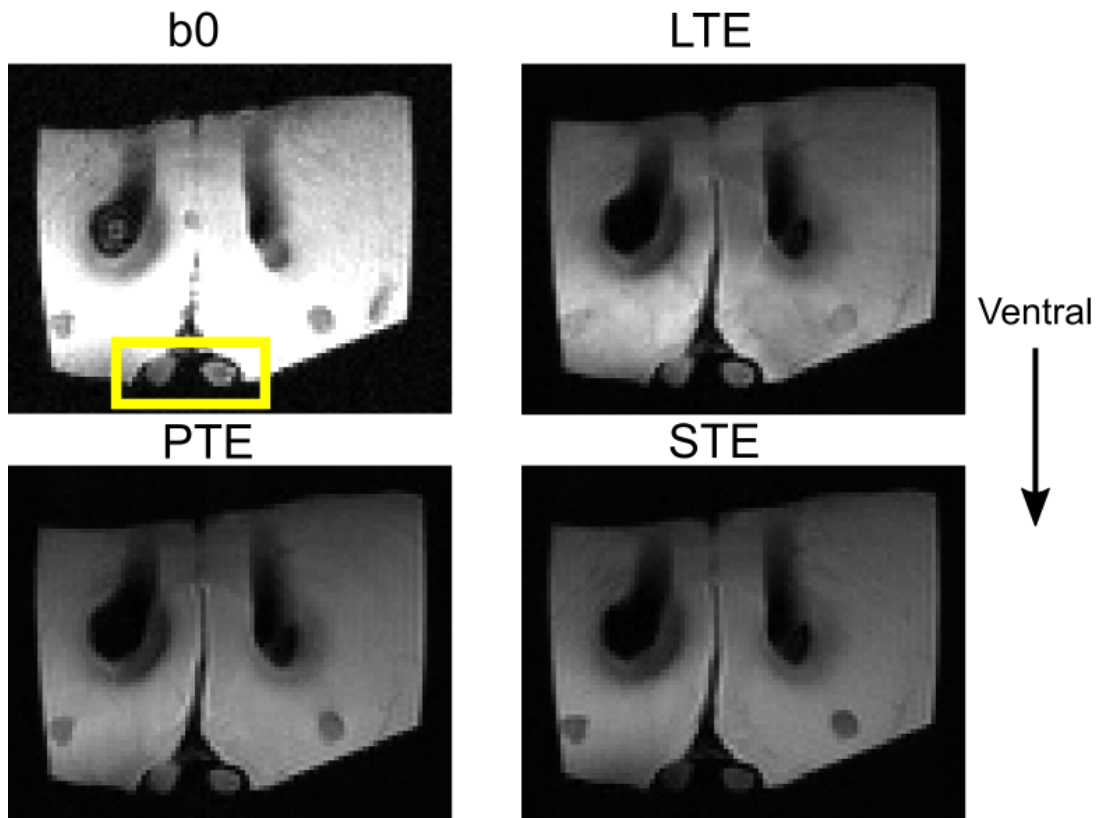
Las histologías se realizaron con una tinción de azul de toluidina (sección A.3). Esto permite que sea sencillo distinguir entre la población axonal, mielina y la glía.

Nuestro procedimiento histológico consiste en tres bloques con los siguientes pasos:

**Fijación** 1) Los nervios ópticos son separados de la parte basal del cerebro y fueron amortiguados con cacodilato de sodio (0.1M) y glutaraldehído (3 %) (1 hora). 2) Fueron tratados con tetraóxido de osmio (1 %) amortiguado con cacodilatos de sodio (0.1M) por 6 horas. 3) Posteriormente se lavaron con cacodilatos de sodio amortiguado (0.2M) y fueron puestos en un recipiente cerrado para su reposo durante 12 horas.

---

<sup>1</sup><https://www.mrtrix.org/>



**Figura 5.3: Ejemplo de imágenes codificadas mediante tensor-b preprocesadas.** Estas son ejemplos de imágenes codificadas mediante tensor-b ( $b=2.8 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) para una sola rebanada de un animal representativo en el grupo de isquemia de retina. Se muestran imágenes de codificación tensorial lineal (LTE), plana (PTE), esférica (STE) y una imagen no pesada a difusión ( $b=0 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ). El rectángulo amarillo indica la zona de los nervios ópticos.

**Deshidratación** Las muestras fueron deshidratadas utilizando alcohol etílico. El procedimiento consiste en sumergir las muestras por diez minutos en diferentes concentraciones de alcohol, comenzando a una concentración de 10 %, con pasos incrementales de concentración de 10 % hasta llegar a alcohol absoluto (100 %).

**Polimerización** 1) Las muestras de tejido son colocadas con óxido de propileno (2 veces por treinta minutos). 2) Las muestras con infiltradas con una resina epóxica/óxido de propileno a 1:1 durante 12 horas. 3) Las muestras son embebidas y rotadas en una resina epóxica durante 5 horas hasta la polimerización. 4) Finalmente, las muestras polimerizadas son colocadas en un molde con resina epóxica y se colocan en un horno de laboratorio a 60 C durante 36 horas.

Los nervios polimerizados son seccionados con un ultra microtomo (RMC Power-Tome PT XL) de manera perpendicular al eje principal del nervio, con un grosor de 600 nm. Finalmente, cada sección es teñida con una solución de azul de toluidina y tetra-borato de sodio (ambos al 0.5 %). La tinción de azul de toluidina nos permite distinguir entre axones, mielina y glía, ya que resultan en diferente coloración, lo cual nos permite observar su morfología (Ejemplos en la figura 6.5). En la sección A.3 se describe la tinción de azul de toluidina.

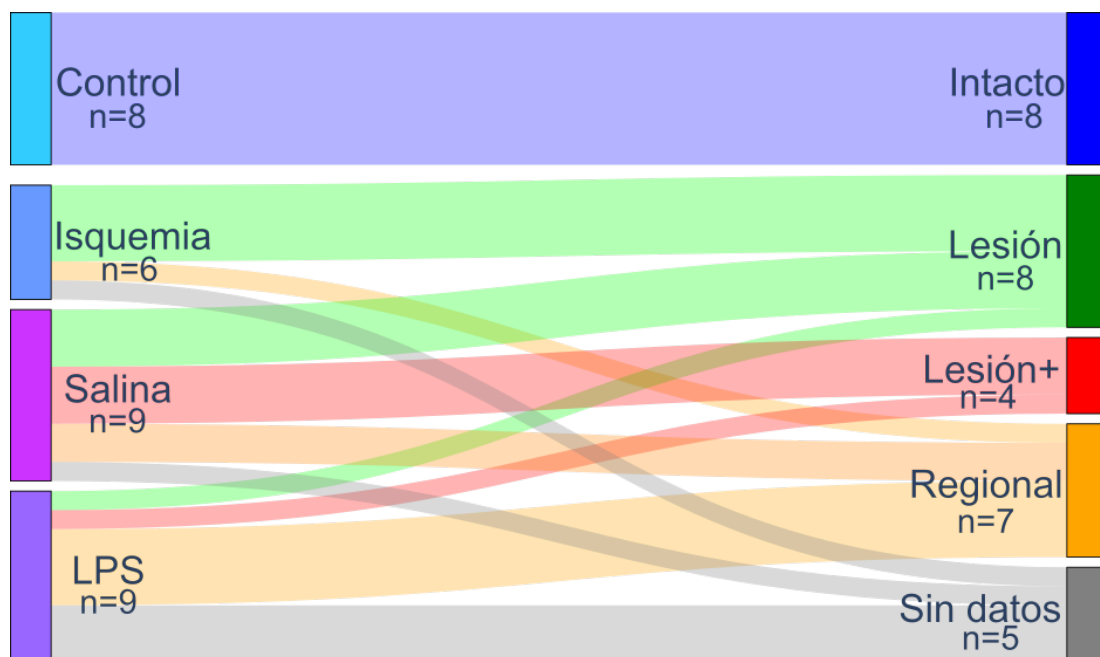
### 5.3.1. Imágenes histológicas

Se obtuvieron fotomicrografías con un microscopio Leica DM750 (equipado con una cámara digital de 5M pixeles) con objetivos a 10x y 100x, y con un microscopio Amscope T690C-PL (equipado con una cámara digital a 10M pixeles) con un objetivo de 40x. Posteriormente transformamos las imágenes crudas a una escala de grises a 16-bits y digitalmente mejoramos su contraste mediante un algoritmo automatizado en Fiji (108) (versión = 2.9.0). Las imágenes obtenidas con el objetivo de 40x fueron unidas mediante el “stitching plug-in” (109) disponible en Fiji.

## 5.4. Análisis/Pipeline de aprendizaje de máquina

Mediante una inspección visual de la fotomicrografías se identificaron patrones histológicos que se entrecruzaban entre los grupos experimentales (véase sección 6.2). Por lo tanto, decidimos (i) reformular nuestras etiquetas de clasificación para el algoritmo de aprendizaje de máquina en clases histológicas que reflejaban diferentes niveles de daño histológico, como Intacto, Lesión y Lesión+, y (ii) analizar voxels de nervios que fueron afectados regionalmente en zonas delimitadas, identificados como patrón Regional (ver Figura 5.4). El número de voxels totales incluido es 821, 561, 374 y 731 (Intacto, Lesión, Lesión+ y regional, respectivamente).

En la Figura 5.5 mostramos el diagrama del algoritmo/pipeline de ML que desarrollamos para este proyecto. Primero, los datos de las métricas extraídas con QTI+ de las clases Intacto, Lesión y Lesión+ son utilizadas para el conjunto de entrenamiento/prueba del ML pipeline a nivel voxel por voxel (A). Posteriormente entrenamos un



**Figura 5.4: Sistema de etiquetado basado en patrones histológicos.** Las clases fueron asignadas a cada nervio después de una examinación visual de las histologías. Basamos esta clasificación en los patrones espaciales y el tipo de características histológicas. La columna izquierda representa los procedimientos experimentales, mientras que la columna derecha indica las etiquetas utilizadas para la identificación el tipo de tejido basado en propiedades de difusión. Hubo cinco especímenes en los que no fue posible discernir a que clase histológica correspondían y no fueron incluidos en el análisis. El grosor de las líneas representa la proporción de los nervios que mapean de las etiquetas experimentales a las histológicas.

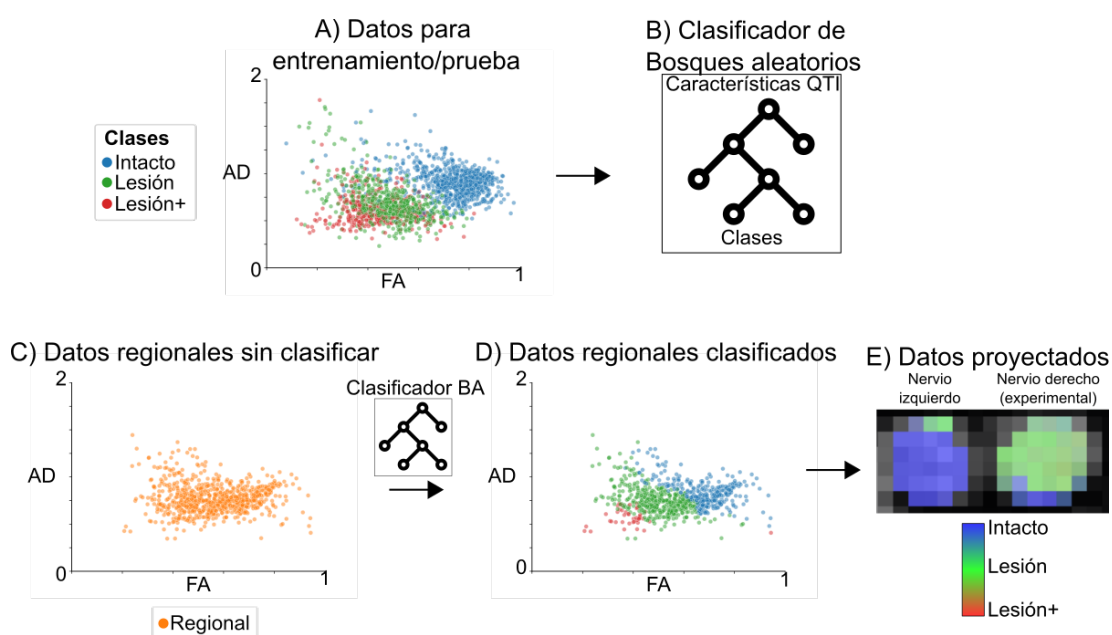
modelo de bosque aleatorio (RF, por sus siglas en inglés: “Random Forest”, ver sección A.2), utilizando el 80 % de los datos para el conjunto de entrenamiento y un 20 % para el conjunto de prueba, y realizamos un análisis de importancia de características mediante importancia de Gini (sección A.2.2) con scikit-learn<sup>1</sup>.

Optimizamos los hiperparámetros para el modelo de bosque aleatorio utilizando el método de “Grid Search” en scikit-learn con validación cruzada (k=4). Los hiperparámetros optimizados resultantes son: número de estimadores (árboles de decisión)=100, profundidad máxima=6, criterio de división por nodo= impureza de Gini, número mínimo de muestras requeridas para ser un nodo hoja=2, número mínimo de muestras requeridas para dividir un nodo interno=7. El resto de los parámetros tienen valores por defecto como son definidos en scikit-learn (versión=1.1.2). Con este modelo clasificamos a cada voxel de los nervios Regionales (C y D). Finalmente, las probabilidades resultantes de pertenencia de clase son visualizadas como un mapa compuesto de rojo-verde-azul (RGB, en sus siglas en inglés) (E), con cada canal representado a cada clase de tejido: Intacto:Azul, Lesión:Verde y Lesión+:Rojo.

Los análisis de importancia de características es un tema complejo con posibles desventajas. En la literatura se ha indicado que la importancia de Gini tiene dos posibles problemas. Primero, tiende a tener un sesgo hacia las características de alta cardinalidad (110). Sin embargo, esto no aplica a nuestros datos dado que se encuentran en el espectro continuo, i.e. todas las características tienen alta cardinalidad. Segundo, la importancia de Gini reporta estadísticas relacionadas al conjunto de entrenamiento (111). Para reforzar que nuestro análisis de características es adecuado, realizamos un análisis por permutaciones en el conjunto de prueba (véase sección A.2.2). Después de que reportamos nuestros resultados con exactitud/F1-Score y el análisis de características, calculamos un estimador con bootstrap para determinar la varianza de las características en un análisis por permutaciones, con la finalidad de verificar si en nuestros resultados el orden de importancia se mantiene igual. Para este propósito, permutamos de manera aleatoria los conjuntos de prueba/entrenamiento para realizar 200 experimentos distintos (utilizando los mismos hiperparámetros optimizados reportados para el modelo de bosque aleatorio) para evaluar la reproducibilidad del análisis de características por permutaciones. Enfatizamos que este análisis fue hecho después del análisis principal con el conjunto de prueba/entrenamiento del cual reportamos los resultados principales, y su único propósito es revisar los posibles sesgos en el análisis de características relacionados a la partición principal de prueba/entrenamiento.

---

<sup>1</sup><https://scikit-learn.org>, versión=1.1.2



**Figura 5.5: Diagrama del pipeline de aprendizaje de máquina.** Utilizamos los datos de las métricas obtenidas con QTI+ para todos los voxels etiquetados acorde a sus histologías (Panel A: Cada punto de datos coloreado representa un voxel) como entrada de entrenamiento/prueba al modelo del bosque aleatorios (B). Posteriormente clasificamos cada voxel de los nervios regionalmente afectados (Regionales) (C) en clases de daño histológico (D). Finalmente, proyectamos los datos clasificados de vuelta a un mapa RGB anatómico que cuantifica el tejido dañado (E).





# Resultados

---

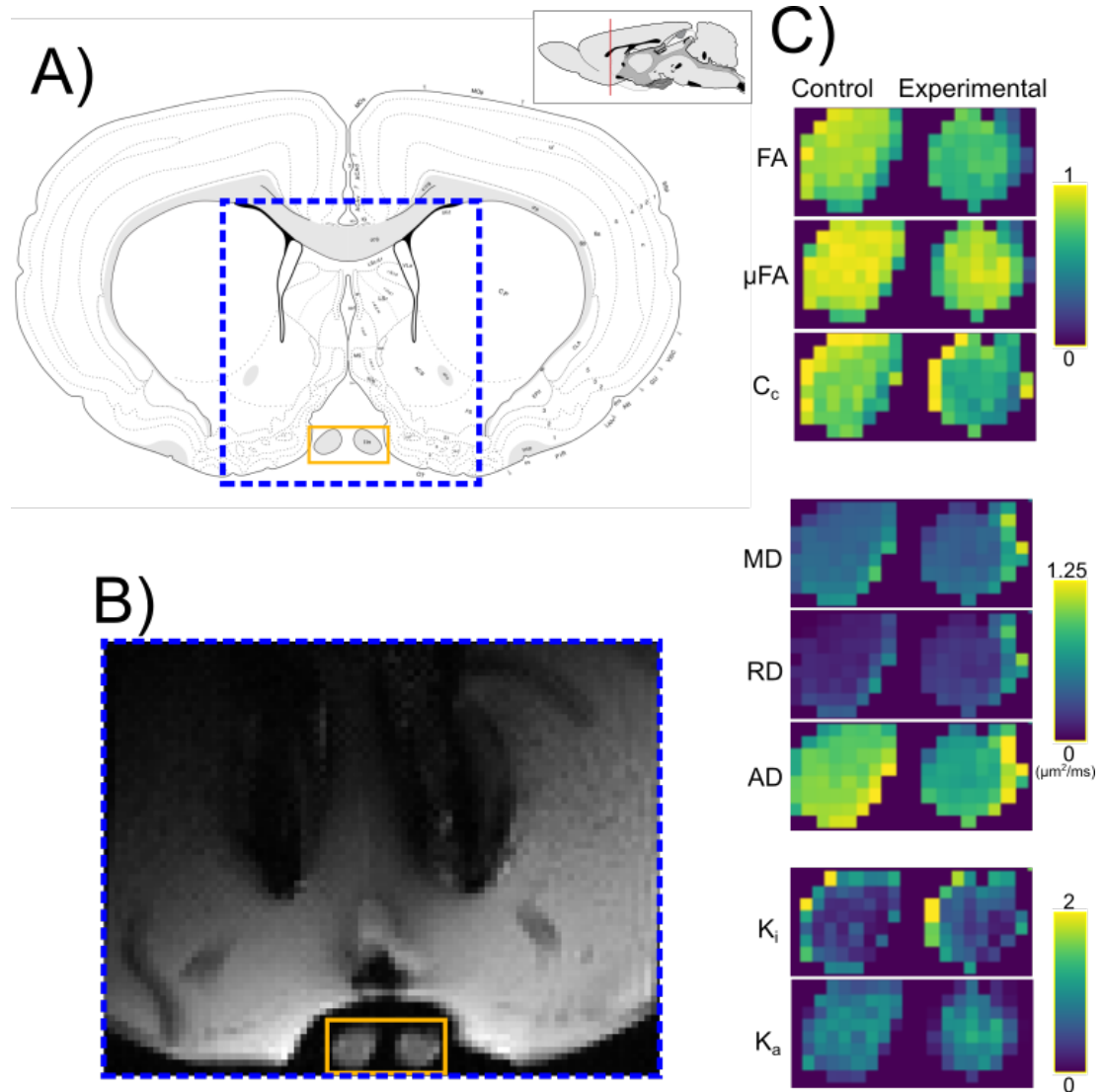
Este capítulo presenta los resultados obtenidos con la metodología descrita en la sección anterior. Primero se describe la evaluación histológica de las microfotografías obtenidas, y se justifica el uso de un sistema de etiquetas para clasificar los diferentes niveles de daño resultante de los experimentos. Se presentan los datos crudos de las métricas obtenidas mediante QTI y algunas imágenes representativas. Finalmente, se describen el desempeño del clasificador con aprendizaje de máquina y se muestran ejemplos de imágenes exitosamente clasificadas por el modelo.

## 6.1. Etiquetas experimentales para datos de DW-MRI

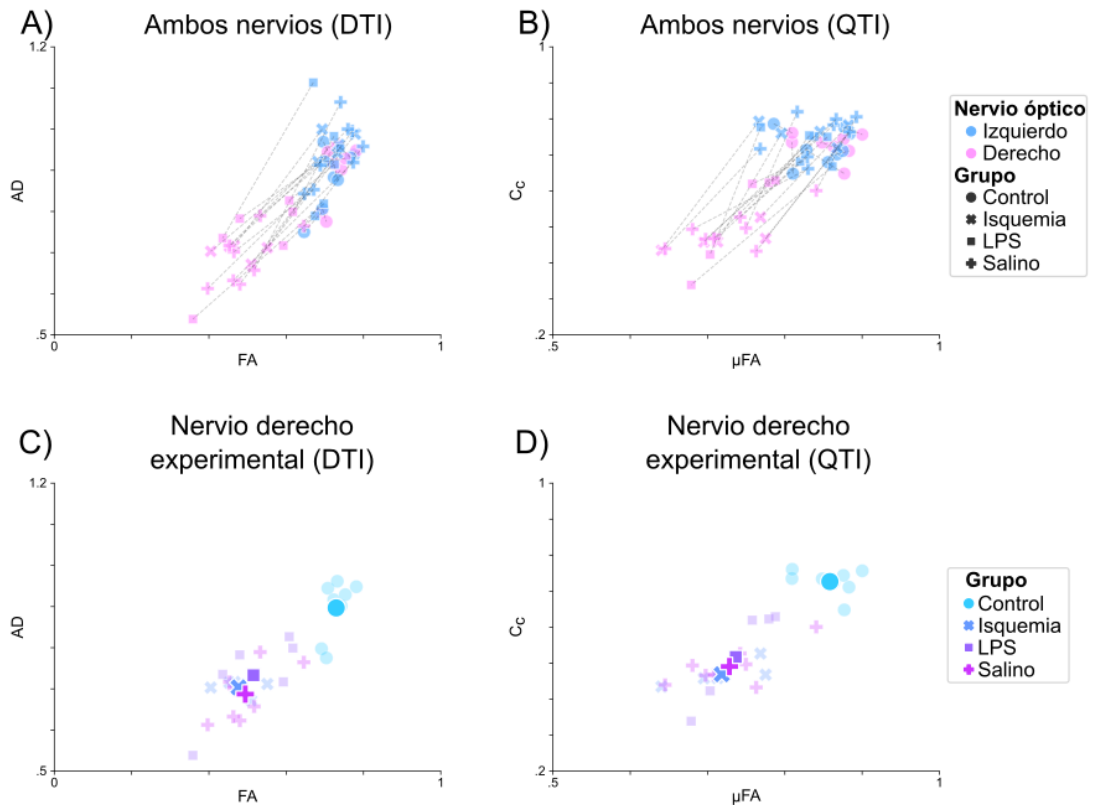
Los mapas derivados de QTI+ mostraron asimetría entre los nervios intactos y los nervios experimentales para la mayoría de las métricas (Figura 6.1). Esto se confirmó con un análisis con valores promediados en cada nervio. La Figura 6.2-A,B muestra la diferencia promedio por animal entre el nervio intacto (izquierdo) y el nervio experimental (derecho, indicando grandes diferencias de FA, AD,  $\mu$ FA y  $C_c$  entre ambos nervios. Sin embargo, las métricas de difusión para los nervios en las condiciones experimentales (nervio derecho) mostraron considerable solapamiento entre ellos (Figura 6.2-C,D). La Figura 6.3 muestra la distribución general de los datos para ambos grupos experimentales.

## 6.2. Evaluación histológica

Una examinación histológica de las secciones teñidas con azul de toluidina (véase A.3) mostraron que la isquemia de retina indujo degeneración axonal y una gliosis media. Los nervios afectados mediante una inyección de LPS también sufrieron reducciones de densidad axonal y mayor infiltración celular glial. Hubo evidencia de que ocurrió daño mecánico independientemente de la sustancia inyectada, dado que las inyecciones con solución salina mostraron degeneración axonal y gliosis en un rango de leve a severo.



**Figura 6.1: Contrastes de Imagenología por trayectoria del espacio-Q (QTI).** A) Referencia de atlas anatómico (adaptado de (112)). La caja delineada azul indica la zona de porción de cerebro donde se obtuvieron datos DW-MRI. B) Ejemplo de imagen DW-MRI sin ruido con codificación esférica b-tensorial ( $b=2.8 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) de un espécimen del grupo isquémico. C) Imágenes agrandadas de los rectángulos naranjas en el panel B. Este panel muestra las métricas de QTI para el nervio óptico control (izquierdo) y experimental (derecho).



**Figura 6.2:** Las métricas Imagenología por trayectoria del espacio Q por grupo experimental. Los puntos corresponden a los valores promediados de todos los voxels de cada nervio óptico, por sujeto. A,B: Nervios ópticos intacto (izquierdo) contra los experimentales (derechos). Las líneas conectan los dos nervios ópticos de cada animal. C,D: Los nervios ópticos derechos agrupados por su procedimiento experimental. Los marcadores semitransparentes muestran los valores promediados por animal; los valores promediados para cada condición experimental se indican mediante marcadores grandes opacos.

## 6. RESULTADOS

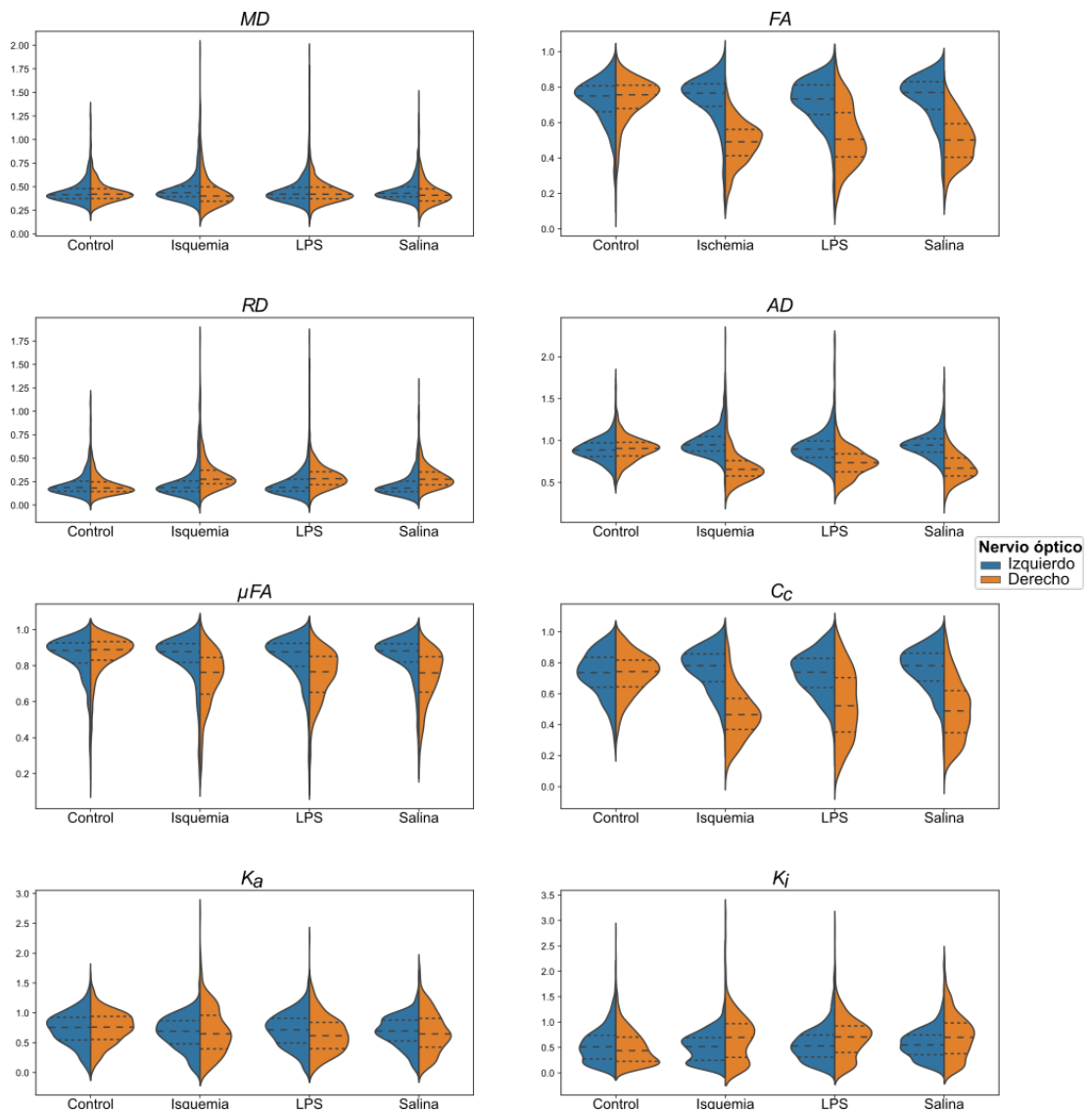


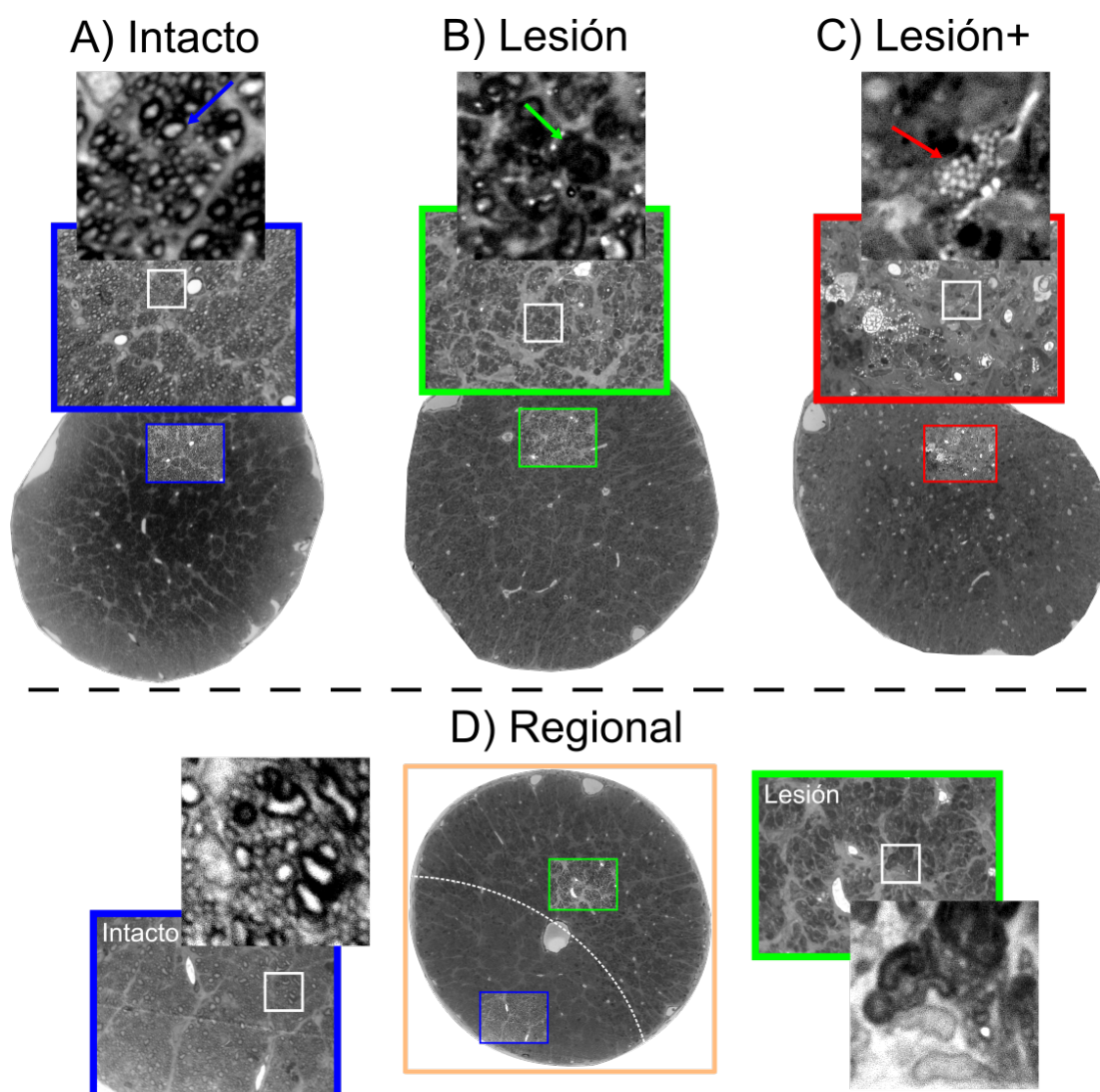
Figura 6.3: Gráficos de violín para los grupos experimentales para las métricas de Imagenología por trayectoria del espacio Q.

Además, mientras que la isquemia de retina produjo principalmente lesiones que eran espacialmente homogéneas a lo largo de todo el nervio, los nervios tratados con algún tipo de inyección produjeron daño que era homogéneo o que solo sucedía en regiones confinadas dentro del nervio: con algunas áreas mostrando daños mientras que otras mostraban una microestructura casi intacta. Por lo tanto, manualmente etiquetamos cada nervio basándonos en el tipo y patrón espacial de histopatología, como (1) *Intacto*, (2) *Lesión*: caracterizado por una reducción global de densidad axonal; (3) *Lesión+*: el cual muestra una profunda pérdida axonal e infiltración de células gliales y macrófagos con apariencia “espumosa”; y un patrón (4) *Regional*, el cual tiene diferentes regiones de los nervios mostrando alguna de los tres tipos de histologías.

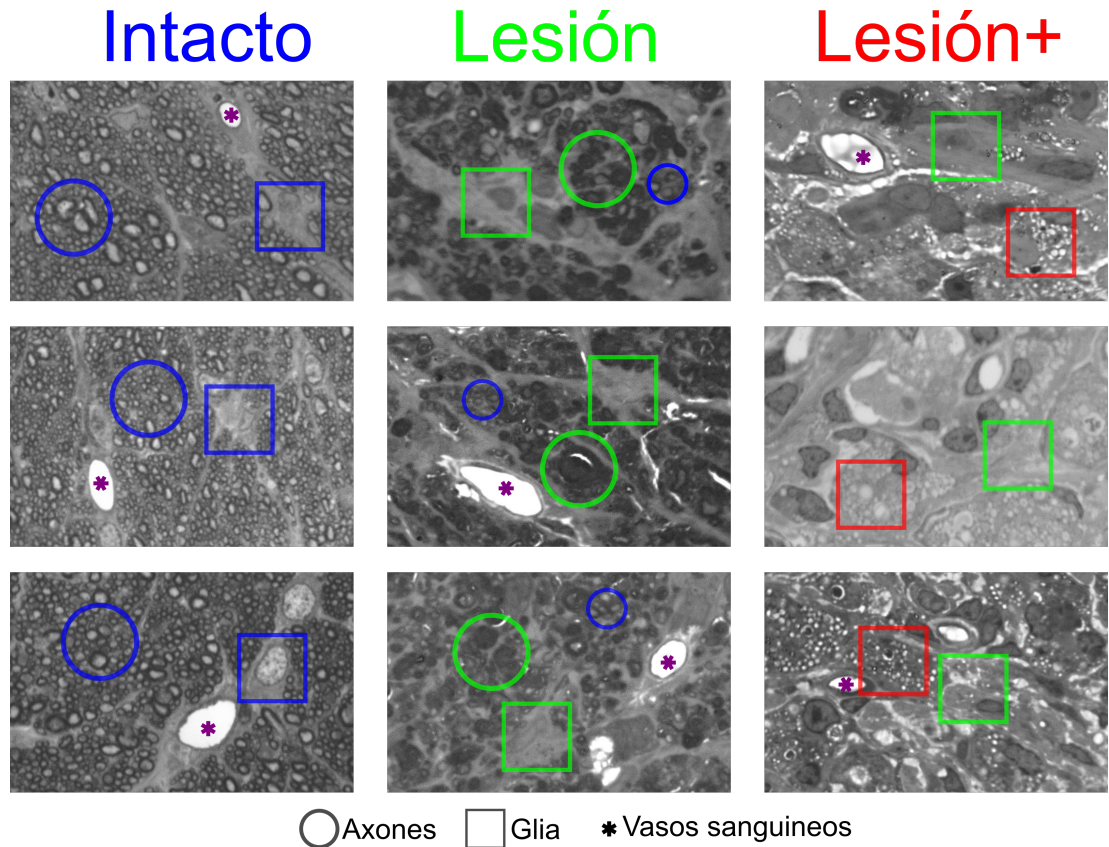
Este sistema de clasificación (véase la Figura 5.4) nos permite realizar una evaluación espacial del daño microestructural producido por los experimentos, i.e., utilizar las propiedades de difusión de las clases *Intacto*, *Lesión*, y *Lesión+* para identificar los patrones histológicos correspondientes en los nervios afectados regionalmente (*Regional*). Hubo cinco sujetos que, debido a artefactos en el proceso histológicos, no fue posible determinar a qué clase histológica pertenecen. Fotomicrografías en la Figura 6.4 muestra ejemplos de los patrones histopatológicos identificados. El panel A muestra un nervio *Intacto* prototípico, caracterizado por un elevado número de axones con vainas de mielina bien definidas y de un espacio intra-axonal brillante, inter espaciado con procesos gliales celulares. El panel B muestra un nervio del tipo *Lesión*, el cual demuestra una densidad axonal reducida, numerosos axones colapsados con un espacio intra-axonal oscuro (flecha verde), y células gliales reactivas con procesos ameboides activados. El panel C muestra un nervio del tipo *Lesión+*, el cual ya no tiene prácticamente axones y con una cantidad considerable de glía en un estado reactivo espumoso (flecha roja). Finalmente, en el panel D mostramos un nervio del tipo *Regional*, con grandes regiones claramente delimitadas que pueden ser descritas con alguna de las tres clases ya mencionadas. La Figura 6.5 muestra más fotomicrografías ejemplares (de otros nueve sujetos incluidos en el estudio) con las características histológicas más relevantes para cada clase. Como se muestra en la Figura 5.5, este sistema de clasificación basado en las histologías es utilizado para realizar a nivel voxel una clasificación con aprendizaje de máquina de las métricas de QTI+.

### 6.3. Etiquetas basadas en histología para datos de DW-MRI

Una inspección por voxel de acuerdo a las clases basadas en histologías del nervio óptico derecho (experimental) relevamos diferencias en las distribuciones de las métricas QTI en los distintos grupos (Figura 6.6). Aunque sigue habiendo sobre lapa, es posible separar visualmente las distribuciones de cada experimento. Análisis por grupo mostraron alteraciones considerables de las métricas de QTI en todos los tipos histopatológicos, caracterizados por una reducción en FA, AD,  $\mu$ FA y  $C_c$ , y un incremento



**Figura 6.4: Patrones histopatológicos después de los procedimientos experimentales.** A: Nervio Intacto con un gran número de axones y procesos gliales normales. Los axones muestran un plasma brillante y están envueltos por vainas de mielina (flecha azul). B: Nervio de la clase Lesión con axones colapsados (flecha verde), un número reducido de axones y signos de gliosis. C: Nervio de clase Lesión+ con muy pocos axones y un grandes procesos gliales reactivos y microglía con signos de “espuma” indicativos de degeneración celular y de mielina (flecha roja). D: Nervio Regional mostrando áreas claramente separadas (con línea blanca punteada) de alguno de los tres patrones histológicos. Las áreas en el nervio regional de ejemplo tienen características de las clases Intacto, Lesión y Lesión+, haciéndolos un buen problema para un algoritmo de clasificación de aprendizaje de máquina. Fotomicrografías de los nervios completos fueron adquiridas con una magnificación a 10x; fotomicrografías en los cuadrados coloreados fueron adquiridas a una magnificación a 100x.



**Figura 6.5: Ejemplos de fotomicrografías de nueve especímenes en el estudio.**

Las columnas comparten características histológicas representativas para cada clase. Intacto: Axones mielinizados densamente empaquetados (círculo azul), y procesos gliales (cuadrado azul) en un estado normal: bien definidas y extendidas a lo largo del espacio extra-axonal. Lesión: Hay múltiples colapsos axonales (círculo verde) inter espaciados con pequeñas poblaciones axonales (pequeño círculo azul), rodeados por procesos gliales ameboides (cuadrados verdes). Lesión+: Ya no hay población axonal, hay abundantes procesos gliales (cuadrados verdes), muchos de los cuales tienen interiores espumosos (cuadrados rojos). Los asteriscos morados corresponden a vasos sanguíneos.



en RD y  $K_i$  (REF). MD muestra ligeras reducciones para las condiciones Lesión y Lesión+. Las distribuciones para las clases basadas en histología se observan en la Figura 6.7.

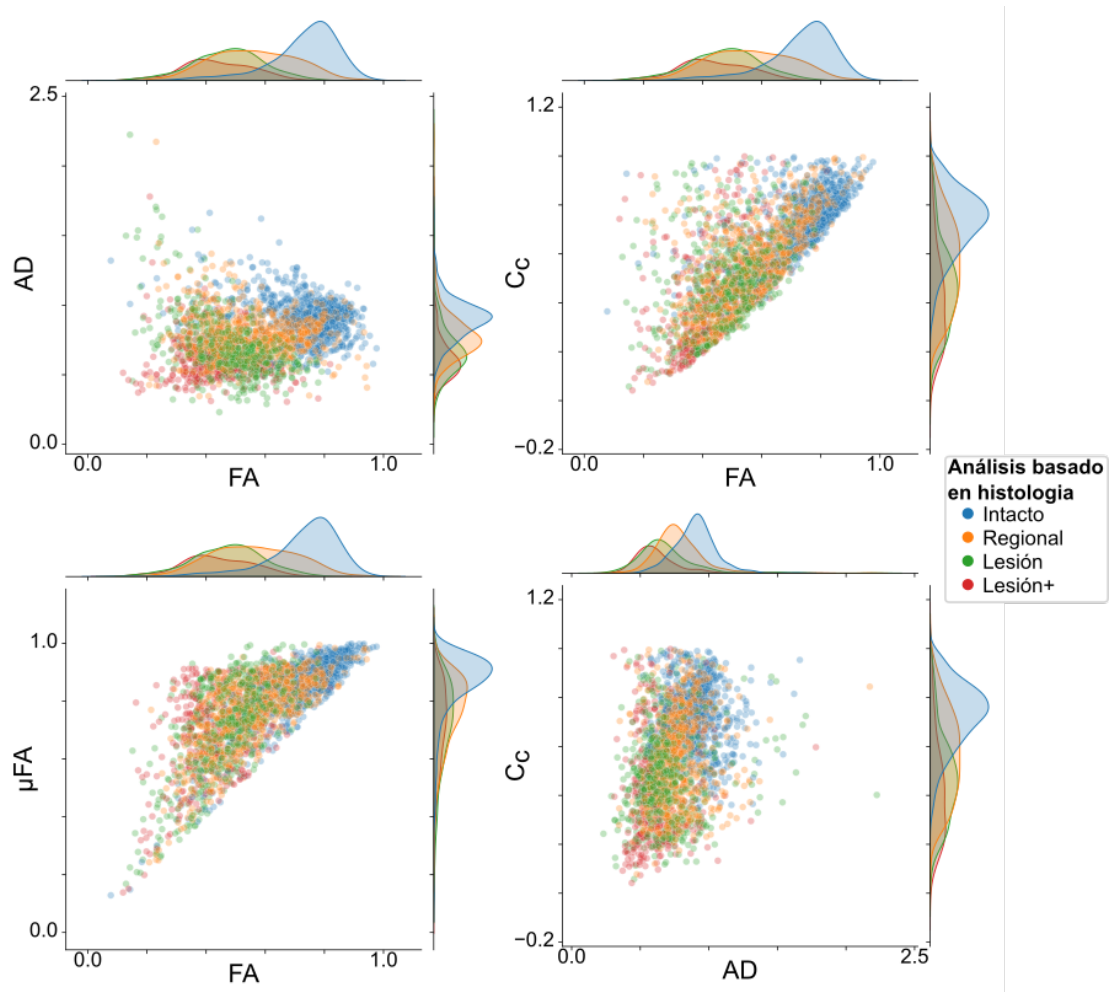
### 6.4. Clasificación por aprendizaje de máquina

Entrenamos un modelo de bosque aleatorio (sección A.2) para realizar una clasificación a nivel voxel de las clases histopatológicas en nervios identificados con el patrón Regional, de acuerdo al pipeline mostrado en la Figura 5.5. La optimización de los hiperparámetros para el modelo de bosque aleatorio está descrita en la sección 5.4. La precisión de clasificación obtenida fue de un 80.11% con un F1-score de 79.4% (con un promedio pesado para clasificación multiclase) al distinguir entre las tres clases histopatológicas.

La matriz de confusión de clasificación para tres clases resultante para el conjunto de prueba se encuentra en la Figura 6.8A. Esta figura muestra que es fácil distinguir la clase intacta de las lesionadas, aunque no es tan sencillo discernir las clases lesionadas la una de la otra (esquina inferior derecha de la matriz). Los resultados del análisis de características se encuentran en la Figura 6.8B. FA y AD- métricas que pueden ser derivadas de DTI - son las dos más importantes características para el modelo de ML. La siguiente métrica en importancia es coherencia de la orientación  $C_c$ . En la Figura 6.9 se muestran los resultados del análisis por permutaciones (sencillo y con bootstrap) que fue descrito en la sección 5.4. Este confirma el orden de importancias de las características resultante del otro análisis. La Figura 6.10 muestra el resultado de realizar el análisis de características con el pipeline de ML utilizando sólo métricas de DTI y sólo las exclusivas de QTI. La precisión es buena en ambos casos (alrededor del 76%) aunque la mejor precisión se obtiene usando todas las características (80%).

Además de ilustrar el pipeline de clasificación, la Figura 5.5D muestra los voxeles de los nervios de patrón regional (Figura 5.5C) ya clasificados con el método de aprendizaje de máquina. La Figura 5.5E muestra un ejemplo de los voxeles clasificados como un mapa RGB. La mayoría de los voxeles izquierdos (controles) son clasificados correctamente (azul-Intacto). Hay excepciones donde la periferia del nervio es clasificada como Lesión, consideramos estos casos son efectos de volumen parcial más que del propio nervio. Los nervios derechos (experimentales) muestran a la mayoría de los voxeles identificados como del tipo clase Lesión, con patrones espaciales que corresponden con la histología (véase Figura 6.5).

Un claro ejemplo de una clasificación realizada a nivel voxel se encuentra en la Figura 6.11. Este es un caso de un par de nervios (inyección LPS identificada como regional, véase Figura 5.4) donde se muestra claramente que el algoritmo es sensible a degeneración microestructural. Los voxeles que son identificados como clase Lesión y Lesión+ son en gran número en las rebanadas rostrales (cerca del sitio de inyección), con las rebanadas caudales mostrando gradualmente más voxeles clasificados como Intactos. Notablemente, en cortes coronales que se encuentran a niveles espaciales aproximados



**Figura 6.6:** Métricas QTI a nivel voxel según el etiquetado basado en histología. Los datos de las métricas QTI provenientes de la clase Intacto (azul) son claramente distintos de aquellos de las clases experimentales. Hay sobre lapso en las métricas de las clases Lesión y Lesión+ pero aún son separables. La clase regional, siendo compuesta de áreas con características de la clase Intacto y de ambas clases lesionadas, muestra métricas de difusión distribuidas sobre todo el espacio de las métricas.

## 6. RESULTADOS

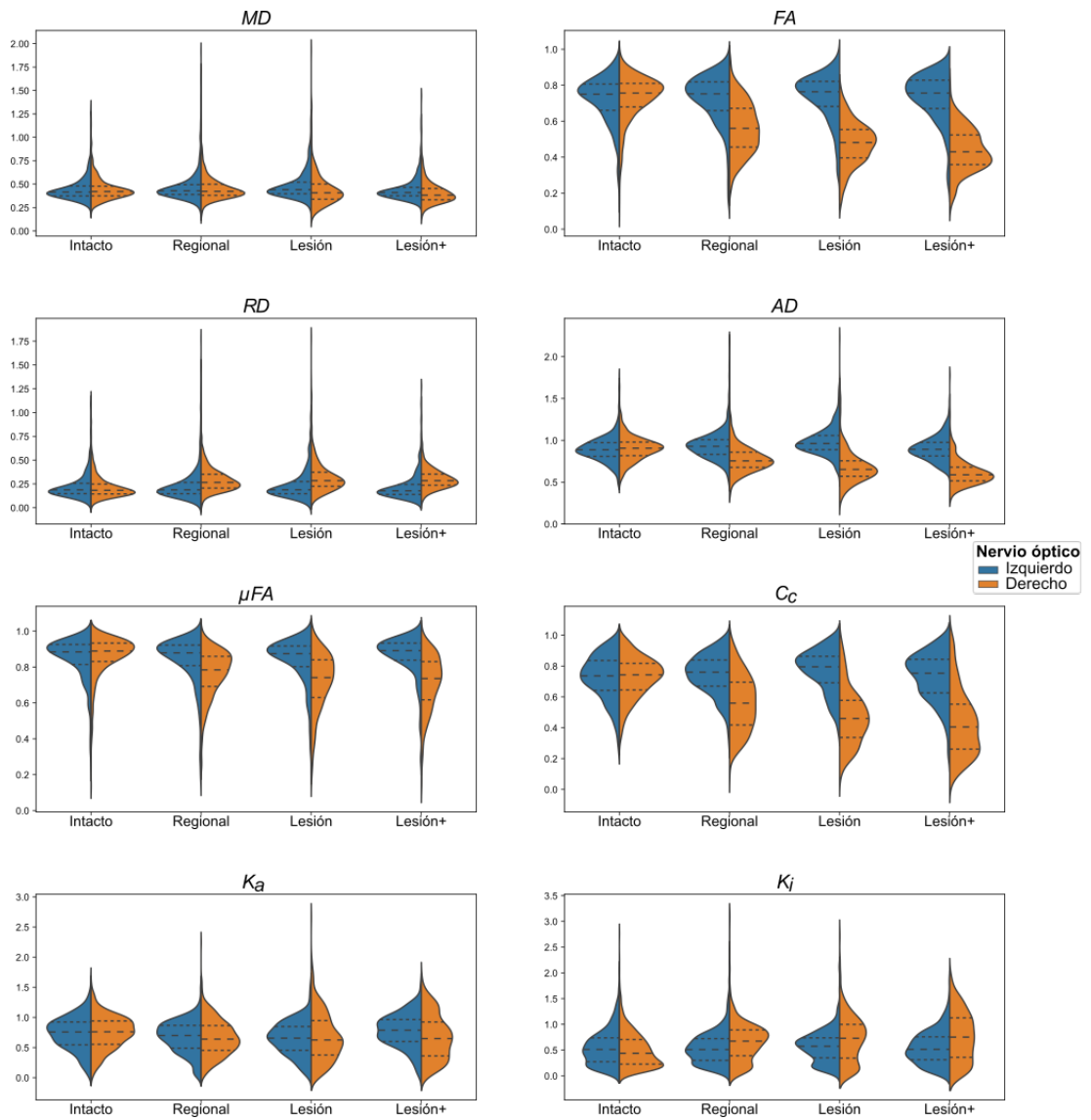
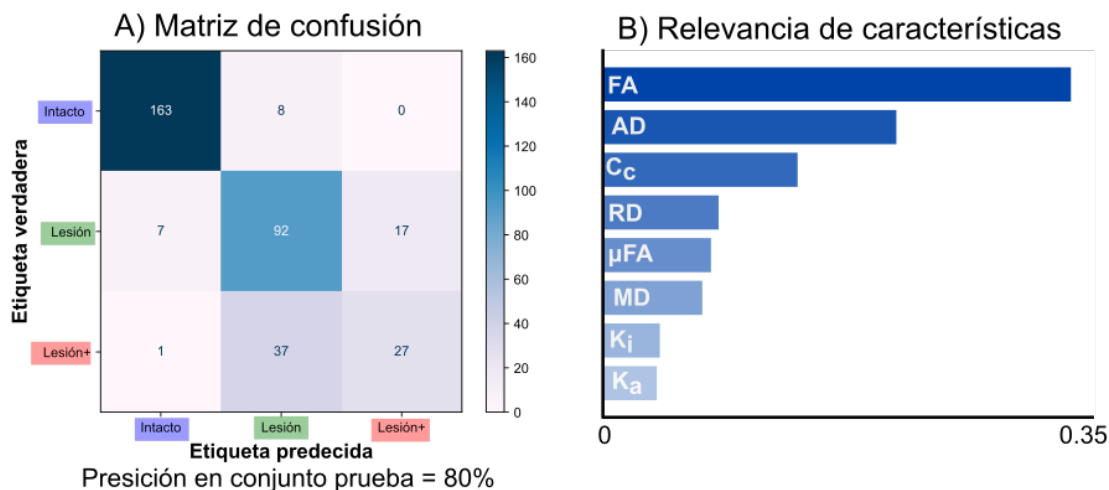
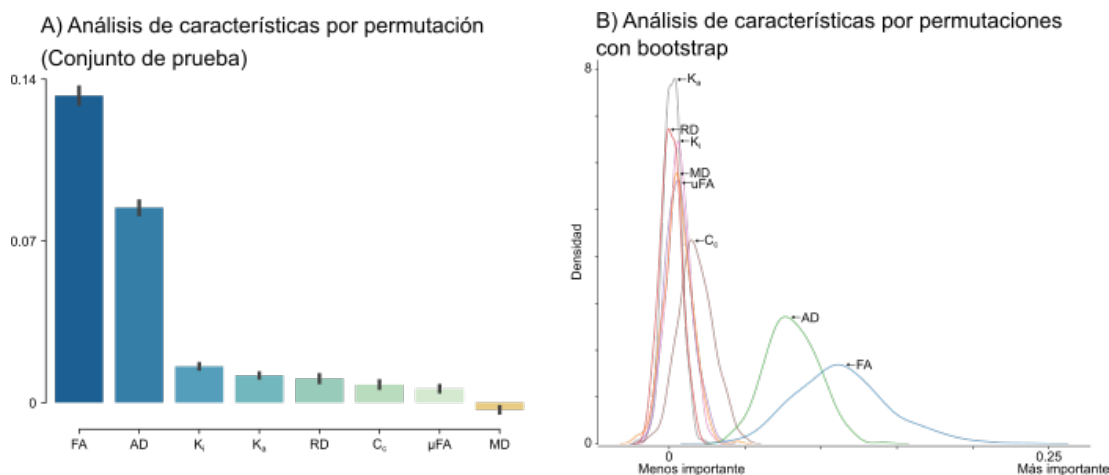


Figura 6.7: Gráficos de violín para las tres clases de nervio y el patrón regional definidos por examinación histológica.



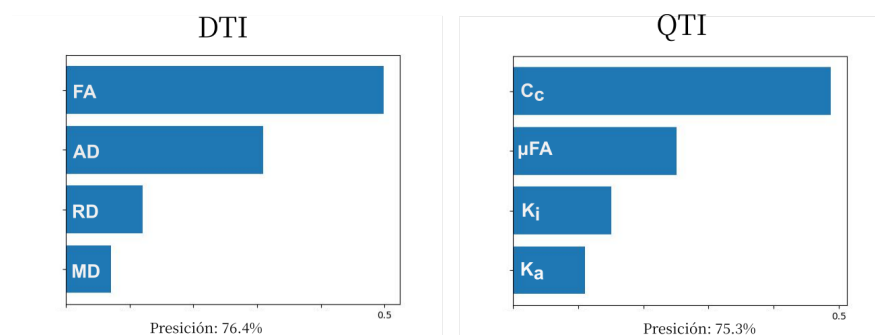
**Figura 6.8: Resultados del algoritmo de aprendizaje de máquina.** A: La matriz de confusión para la clasificación en el conjunto de prueba. B: Análisis de relevancia de características del árbol aleatorio. FA y AD, características que también pueden ser derivadas por DTI, son de suma importancia para la importancia. Con la excepción de  $C_c$ , las métricas exclusivamente derivadas por QTI son menos relevantes para el algoritmo.



**Figura 6.9: Resultados complementarios para el análisis de importancia características.** A) El análisis de importancia de características por permutación para el conjunto de prueba. B) El análisis de permutación con bootstrap. Este análisis confirma FA y AD como las características más relevantes para este experimento. Nótese la tercera característica en el análisis por bootstrap es  $C_c$ .

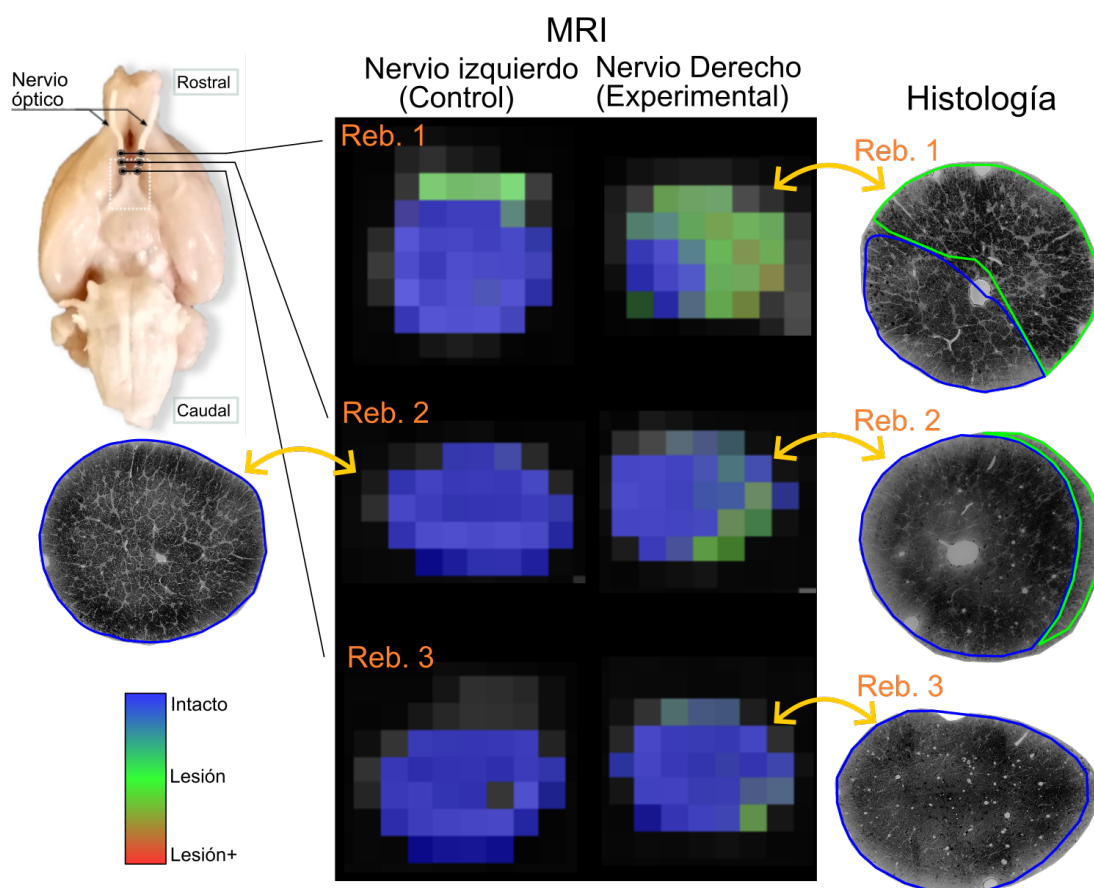
## 6. RESULTADOS

---

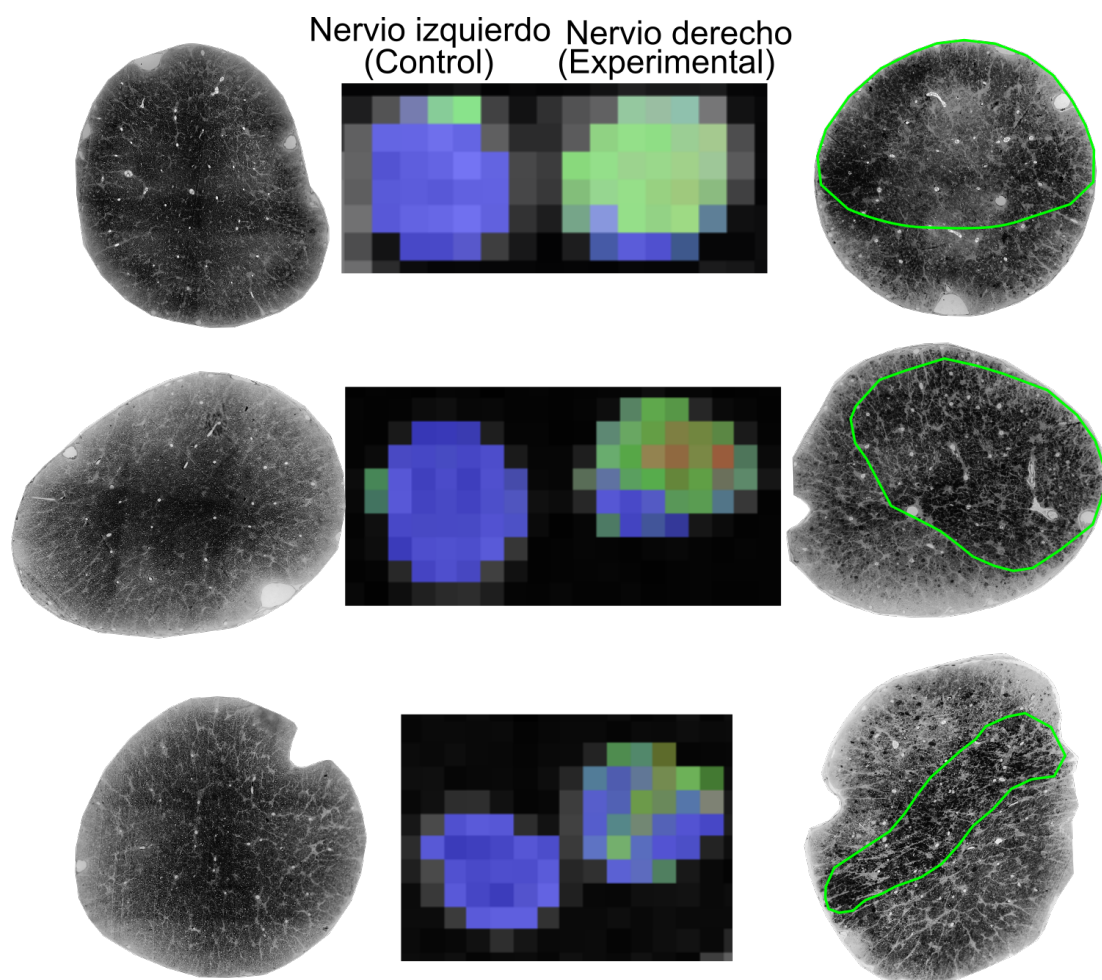


**Figura 6.10: Relevancia de características en subconjuntos métricas.** Al repetir el pipeline de aprendizaje de máquina utilizando sólo métricas de DTI y sólo métricas exclusivas a QTI resulta en una precisión menor (alrededor del 76 %) que utilizar el conjunto completo (80%). FA y  $C_c$  capturan la pérdida de coherencia en el medio, lo que las hace la característica más relevante de cada subgrupo.

en el mismo nervio, podemos observar hay una coherencia entre la región lesionada vista en las micrografías y la zona clasificada como lesionada por el algoritmo de ML en los datos de DW-MRI. La gran mayoría de los voxels en el nervio izquierdo (control) son adecuadamente clasificados como Intacto. La Figura 6.12 muestra tres ejemplos más de una clasificación de daño histopatológico para otros tres nervios categorizados como regionales. Note como el algoritmo es capaz de capturar los patrones espaciales de la región de lesión en el nervio.



**Figura 6.11: Clasificación a nivel voxel de los patrones histológicos.** Un ejemplo con histologías y datos MRI de una rata mostrando datos del nervio izquierdo y del nervio derecho (experimental). Los dos nervios ópticos se muestran en tres diferentes rebanadas en un orden rostro-caudal. Fotomicrográficas de el mismo nervio experimental aproximadamente a la misma ubicación muestra claramente áreas delimitadas de clases histológicas Intacto y Lesión, que corresponden a la clasificación a nivel voxel de los datos DW-MRI del nervio experimental.



**Figura 6.12:** Ejemplos de daño histopatológico del patrón regional y su correspondiente clasificación con aprendizaje de máquina basado en datos con MDE DW-MRI.

## Discusión y conclusiones

---

Este capítulo incluye la discusión relevante de los resultados obtenidos en la sección pasada. Se recapitula la metodología, se discuten los avances científicos propuestos en este trabajo y se enlistan las limitaciones del estudio. Finalmente, la conclusión describe brevemente el hallazgo de este trabajo.

### 7.1. Puntos importantes

En este trabajo, exploramos la sinergia de las métricas obtenidas con QTI y el aprendizaje de máquina para la identificación no invasiva de daño histológico en materia blanca. Nuestros datos muestran que estas métricas son sensibles a patrones histológicos de daño. Tres métricas (dos que también pueden ser derivadas de DTI y una exclusiva de métodos con codificación multidimensional) son las más relevantes para la clasificación adecuada del daño en tejido. Notablemente, la métrica obtenida sólo mediante codificación con tensor-b mejoró el resultado obtenido por el pipeline de ML.

### 7.2. Discusión

El nervio óptico ha sido utilizado ampliamente para evaluar cambios en materia blanca en la literatura de DW-MRI. Un enfoque común es inducir isquemia de retina que resulta en degeneración Walleriana de las células retinales ganglionares y sus respectivos axones a través del nervio lesionado (sección 2.2.1.1), lo cual se ve reflejado en patrones específicos anormales de difusión (99, 113). Distinguir entre inflamación y pérdida axonal mediante DW-MRI es un tema activo de investigación. Ambos procesos están presentes con diferente severidad en varios desordenes neurológicos. Obtener metodologías precisas para diferenciarlos mediante DW-MRI puede mejorar diagnósticos clínicos. Sin embargo, no observamos mayores diferencias entre nervios ópticos dañados mecánicamente por la inyección de solución salina, de aquellos inyectados con LPS (que buscaban producir inflamación), pues ambos mostraron degeneración axonal



## 7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

---

y gliosis en varios niveles de severidad. Por esta razón, en este estudio nos enfocamos en examinar los niveles de severidad histopatológica mediante métodos de ML, con la intención de mejorar el poder de diagnóstico de DW-MRI.

Inyecciones en el nervio produjeron suficiente daño en el tejido para reducir a FA, de manera similar a las reducciones causadas por isquemia (Figura 6.2) (99, 113). También se observó una caída en  $\mu$ FA en todas las condiciones experimentales, esto es un posible indicativo de un aumento en perfiles de difusión isotrópica debido a la pérdida axonal producida por la isquemia y el daño al tejido producido por la inyección de los nervios ópticos. Esta observación se encuentra alineada con literatura previa que sugiere que la pérdida axonal reduce  $\mu$ FA (9, 12, 114). La coherencia del medio, cuantificada mediante  $C_c$ , también se vio reducida en todos los nervios afectados, lo cual se ajusta al desorden de tejido observado en todos los nervios experimentales. Hipotetizamos que, aparte del efecto de pérdida de coherencia en el medio, la infiltración de células gliales puede reducir ambas métricas de anisotropía. En general, las métricas derivadas de QTI se sobrelapan entre las condiciones experimentales (Figura 6.2C,D). Esto evitó que pudiéramos establecer una diferenciación clara entre la inflamación y la degeneración axonal. Sin embargo, como fue discutido en la sección 6.2, nuestros grupos experimentales compartieron características histopatológicas con perfiles de difusión que se sobreponen. Por esta razón, no podemos concluir si QTI es capaz de diferenciar entre los dos eventos histopatológicos.

Observamos que el daño mecánico variaba de una sutil degeneración axonal a la aniquilación completa de la población axonal (Figura 6.4). Por lo tanto, re-etiquetamos nuestros datos basándonos en los hallazgos histológicos y su relación espacial (Figura 5.4), con los nervios de tipo Lesión (caracterizados por una población axonal reducida) y de tipo Lesión+ (caracterizados por una fuerte pérdida axonal y presencia de glía reactiva en estado espumoso que usualmente aparece sólo en estados avanzados de degeneración (115, 116, 117)). Además, varios nervios inyectados mostraron mosaicos de histologías Intacto, Lesión y Lesión+, los cuales etiquetamos como Regionales y nos propusimos a clasificar de manera automática basándonos en los perfiles de difusión derivados de los nervios con características de tejido espacialmente homogéneas. Debido a que nuestros datos se encuentran un espacio de ocho dimensiones con miles de puntos (voxels), este es un escenario ideal para una aplicación de ML.

Decidimos utilizar el modelo de bosque aleatorio porque:

- Son menos propensos a hacer sobre ajuste de los datos en comparación a otros métodos.
- Tienen mayor interpretabilidad que otros modelos de aprendizaje de máquina como las redes neuronales, dado que es posible inspeccionar e interpretar estimadores individuales (árboles de decisión) en el modelo.
- La varianza de los distintos estimadores del bosque aleatorio nos permite tener resiliencia a ruido y datos de pobre calidad.
- El análisis de importancia de características es directo.

Cabe mencionar que obtuvimos resultados similares probando otros métodos de aprendizaje de máquina en el estado del arte, tales como XGBoost (118) (con una exactitud de 80.38 %) y redes neuronales (119) (con una exactitud de 80.68 %). Esto es un indicativo de que el desempeño del algoritmo de clasificación está más relacionado a la naturaleza de nuestros datos que al algoritmo de clasificación utilizado.

El desempeño de la precisión de la clasificación automática utilizando árboles aleatorios es elevada (80 %). Mientras que la mejor distinción de desempeño sucede entre la clase Intacto y ambas clases Lesión, sólo hubo un éxito moderado en la diferenciación entre las clases Lesión y Lesión+ (Figura 6.8A). La confusión entre los dos grados de daño puede deberse a la pérdida axonal (presente en ambos casos) actuando como la principal característica microestructural que modula las propiedades medibles por difusión. La principal diferencia entre estos dos tipos se encuentra en el nivel de gliosis que atraviesan, el cual no está siendo modelado explícitamente en QTI. Otras modalidades de DW-MRI específicas a células gliales (120) o combinadas con otras modalidades de MRI como espectroscopia (121) pudieran diferenciar mejor entre estos casos.

El análisis de importancia de características (Figura 6.8B) muestra que FA y AD son las métricas de difusión más importantes para diferenciar entre los tipos de tejido. Esto era esperado, pues ambas son sensibles a la pérdida general de anisotropía en materia blanca, el cual captura el mayor efecto de la degeneración. En regiones de materia blanca con axones alineados coherentemente (como el nervio óptico), FA puede verse reducida por la pérdida de anisotropía microscópica, o la pérdida de coherencia del ambiente, o ambas. Por ello, las métricas provenientes de DTI son sensibles a distintos cambios microestructurales, pero no son específicas a que tipo de cambio los pudo provocar. Teníamos la expectativa de que las métricas exclusivas a codificación por tensor-b mejoraran el algoritmo de clasificación al proveer información adicional, dada su especificidad a ciertas propiedades de la microestructura (16). Por ejemplo,  $C_c$  debería capturar el incremento de dispersión axonal debido a la degeneración en materia blanca (como estudios previos de DW-MRI con adquisiciones estándar han sugerido (122)) mientras que  $\mu$ FA informaría sobre la reducción en la anisotropía microscópica. Efectivamente,  $C_c$  es la tercera característica más importante en el análisis de características. Sin embargo,  $C_c$  correlaciona con FA (por su definición matemática derivada en QTI es la razón entre  $FA^2$  y  $uFA^2$  (9)) y por lo tanto contribuye menos al problema de clasificación si FA ya es incluida en las características del análisis. De hecho, repetir el mismo pipeline utilizando métricas exclusivas de QTI, muestra que es  $C_c$  la métrica más relevante en el análisis, seguida de  $\mu$ FA, preservando un desempeño similar en clasificación (Figura 6.10). Hipotetizamos que la gliosis reduce  $\mu$ FA en un patrón similar en todos los experimentos, reduciendo su eficiencia como predictor. También teníamos expectativas que  $K_i$  (relacionado a la varianza en los tamaños del modelo de la DTD, véase sección 3.6) aumentara como resultado de la infiltración glial. Así como  $K_a$  pudiera explicar la pérdida de micro anisotropía en el medio y pudiera estar relacionada a la pérdida axonal. La relativa baja varianza explicada en los datos por las métricas de kurtosis pudiera deberse al sesgo secundario de la suposición del modelo de la DTD de que la  $\mu K$  es igual a cero (72), el cual no es el caso para neurodegeneración (123),

y por lo tanto  $K_i$  y  $K_a$  pudieran estar siendo homogeneizadas por este efecto. En este trabajo utilizamos un algoritmo de ML entrenado con datos de materia blanca con una sola población axonal coherentemente alineada, las características adquiribles con DTI (FA y AD) capturaron las principales propiedades de neurodegeneración relevantes a la clasificación. Sin embargo, la coherencia de la orientación ( $C_c$ ) y  $\mu$ FA pueden ser factores importantes para la detección y clasificación de neurodegeneración en otras regiones de materia blanca con cruces de fibras o materia gris, donde FA es revuelta por la complejidad de la arquitectura del tejido.

Existen otras posibilidades de análisis de datos con codificación con b-tensor. En la imagenología de la distribución de tensores de difusión (15) se pretende extraer directamente características de la DTD o inclusive extenderlo a análisis de MRI multi-dimensionales que capturen efectos de relaxometría (124, 125). Aunque la inversión de los parámetros de la DTD no es un problema resuelto, estos trabajos demuestran que existe un gran potencial de aplicaciones. Otros métodos que utilizan modelaje biofísico utilizando codificación por tensor-b (91, 126) se pueden utilizar para extraer propiedades microestructurales que no se pueden obtener sin utilizar fuertes suposiciones de modelaje que se requieren con adquisiciones lineales de difusión (un experimento clásico PG-SE). Sin embargo, estos se encuentran basados en el modelo estándar de materia blanca (3) que es aplicable para tejido sano, y no es conocido si es adecuado para la detección adecuada de desviaciones severas (i.e., daño en tejido) sin modificaciones a las suposiciones del mismo modelo. Mas trabajo es requerido para saber si estas metodologías de DW-MRI pudieran identificar daño en el tejido con alta sensibilidad y especificidad.

Los métodos de aprendizaje de máquina proveen un paradigma para entender y utilizar los métodos avanzados en el campo de DW-MRI. La visualización directa de las probabilidades del tipo de tejido como un mapa de colores descrita en este trabajo (Figura 6.11), aunque una prueba de concepto, nos sirve como una evaluación directa cualitativa del tipo de daño en cada voxel. La combinación de especificidad espacial y el acceso a las métricas cuantitativas de difusión pueden ser una poderosa herramientas para evaluar y diagnosticar cambios microestructurales en desordenes neurológicos.

### 7.3. Limitaciones del estudio

Hay algunas limitaciones en este estudio. Primero, los procedimientos experimentales (particularmente aquellos relacionados a la inyección directa en el nervio óptico) produjeron un sobre lape de las histopatologías que se pretendían estudiar. Esto dificultó la distinción entre degeneración axonal e inflamación, lo cual limita la interpretabilidad de algunos de nuestros resultados. En particular, no podemos concluir de nuestro análisis si QTI es capaz de distinguir entre ambos procesos histopatológicos. Sin embargo, una examinación cuidadosa de las histologías nos permitió diferencias entre las clases Lesión y Lesión+ basándonos en la presencia de células gliales en estado espumoso y también basado en la extensión de muerte axonal observada, las cuales

podieron ser identificadas con el algoritmo de aprendizaje de máquina basándose en las métricas de difusión. El trabajo futuro se va a enfocar en minimizar los factores confusores introducidos por el daño mecánico utilizando otros diseños experimentales.

Segundo, otros métodos histológicos pueden mejorar la distinción entre los diferentes procesos histopatológicos. Usamos azul de toluidina por su habilidad para dar detalles morfológicos precisos, como hemos visto en trabajos previos en el laboratorio (99). Sin embargo, la preparación del tejido para esta tinción es incompatible con otros métodos histológicos, como inmunohistoquímica o inmunofluorescencia de células gliales, lo cual podría dar información adicional para la clasificación de histopatologías.

Tercero, el grosor de la rebanada fue grande (1mm). Adquirimos rebanadas gruesas para mejorar el SNR de la adquisición, pero posibles efectos de volumen parcial pudieran introducir errores de precisión en la estimación de las métricas de difusión, particularmente para el patrón Regional ya que las regiones dañadas varían a lo largo del nervio.

Cuarto, las forma de onda en los gradientes para STE y LTE están sincronizadas (11, 103), pero esto no asegura que estén en la misma ventana de tiempo efectivo de difusión (81). La dependencia de la difusión al tiempo sucede si el perfil de difusión cambia considerablemente con respecto al tiempo. En adquisiciones estándar los tiempos de efectivos de difusión son suficientemente grandes para evitar la dependencia en el tiempo i.e. el perfil de difusión ya no cambia si dejamos más tiempo de difusión efectivo. Sin embargo, en formas de onda libres (como las utilizadas en la codificación por b-tensor) el contenido frecuencial de la forma de onda afecta su tiempo de difusión efectivo (103). Este contenido frecuencial es difícil de manipular y no fue controlado o investigado de manera directa en este estudio. Sin embargo, la dependencia del tiempo de difusión puede ser un factor importante en neurodegeneración (3) y es un área de investigación activa.

Por último, las aplicaciones de aprendizaje de máquina se benefician de conjuntos de datos son muy extensos. Y aunque nuestros datos a nivel voxel no es un conjunto pequeño, el desempeño general de la precisión puede ser mejorado con más datos en el estudio.

## 7.4. Conclusiones

En esta tesis, exploramos la habilidad de métodos de DW-MRI con codificación del b-tensor para detectar y diferenciar distintos niveles de degeneración en materia blanca. Específicamente, exploramos las métricas derivadas de QTI utilizando algoritmos de aprendizaje de máquina en el estado del arte. Nuestros resultados fueron guiados y validados mediante una evaluación histológica como referencia. Varias de las métricas de QTI son sensibles a cambios microestructurales inducidos por neuropatología. Mientras que las métricas clásicas de DTI fueron las características más importantes en la fase de entrenamiento para el algoritmo de aprendizaje de máquina, las características exclusivas a la codificación con b-tensor mejoraron su precisión. Este trabajo muestra

## 7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

---

evidencia del potencial para posibles aplicaciones biomédicas de estas técnicas para su uso clínico en detección de neuropatología.

## Anexo de métodos

---

Este apéndice contiene información relevante del concepto del espacio-Q, los bosques aleatorios y la técnica de histología utilizados en la investigación descrita en esta tesis.

### A.1. El espacio-Q

El espacio-Q es una abstracción de espacio tridimensional que describe el experimento de desfasamiento/refasamiento de los spins de las moléculas de hidrógeno realizado en DW-MRI. Cada punto en este espacio implica una dirección y “potencia” de desfasamiento en un experimento de difusión (definidos mediante el vector  $q$ ). Se navega el espacio-Q modulando la intensidad de los tres gradientes del equipo de resonancia magnética, lo cual define la dirección y orientación del vector de muestreo  $q$ . Formalmente la trayectoria de los gradientes define a la trayectoria en el espacio-Q mediante:

$$q(t) = \gamma \int_0^t g(t') dt' \quad (\text{A.1})$$

donde:

- $q(t)$ . El vector  $q$  en el punto  $t$ .
- $g$ . El vector de gradiente.

El origen en el espacio-Q implica un experimento sin difusión. Alejarse del origen resulta en un desfasamiento de los spins, mientras regresar al origen es un refasamiento. Un experimento válido de DW-MRI implica que un muestreo del espacio Q, inicie y termine en el punto de origen (desfasamiento/refasamiento por igual). Un experimento clásico de difusión implicar navegar el vector de muestro  $q$  a un punto del espacio-Q (desfasamiento), muestrear dicho punto un tiempo efectivo de difusión (el cual tiene que ser suficientemente largo para que las moléculas de agua se hayan desplazado en todo su microambiente), y navegar de regreso al origen (refasamiento).

La imagenología el espacio Q establece la relación(60):

$$E(q) = \int P(r)e^{-i2\pi q^T r} dr, \quad (\text{A.2})$$

donde:

- $E(q)$ . Señal de resonancia magnética dado un vector de muestreo  $q$ .
- $P(r)$ . La probabilidad de que las moléculas se hayan desplazado a una distancia en el vector  $r$ .

Esta definición relaciona directamente la señal de resonancia magnética mediante el espacio-Q y la distribución de desplazamientos ( $P$ ) de los caminantes aleatorios de un proceso de difusión (sección 3.1). Métodos como la Imagenología por espectro de difusión(127) explotan esta relación al realizar la transformada de Fourier directa del espacio Q para obtener la distribución de desplazamiento.

Las secuencias SDE muestrean punto a punto el espacio-Q (sección 3.3). Los diferentes métodos/modelos tratan de inferir información de estas muestras. Las metodologías MDE muestran trayectorias en el espacio-Q (sección 3.5). Estas trayectorias sensibilizan al muestreo de difusión a las correlaciones de desplazamiento que ocurren en todas las direcciones que recorre la trayectoria, lo cual brinda información adicional para métodos/modelos de DW-MRI más complejos.

## A.2. Bosques aleatorios

El bosque aleatorio (111) (RF, por sus siglas en inglés: *Random forest*) es un algoritmo de aprendizaje de máquina supervisado diseñado para resolver problemas de clasificación <sup>1</sup>. El RF consiste en un ensamble de árboles de decisión (sección A.2.1) que se entrenan para realizar la clasificación de nuevos datos de manera conjunta. Cuando llega un dato nuevo a clasificar, todos los estimadores (cada árbol de decisión) en el RF le asignan una etiqueta de clasificación. Posteriormente, la etiqueta con mayor número de coincidencias en el ensamble es el resultado final de clasificación que asigna el RF.

El conjunto de estimadores del RF es entrenado mediante técnicas de bagging(128). El bagging (término corto para “*Boostrapping agregating*”) consiste en entrenar a cada estimador del ensamble (i.e. cada árbol de decisión) con una muestra aleatoria con reemplazo del conjunto de datos original. Esto implica que cada estimador es entrenado con una submuestra distinta, lo cual puede influir en su resultado final individual. El bagging introduce más diversidad de datos en los subconjuntos de cada estimador entrenado, lo que en general mejora el desempeño del modelo.

Los algoritmos de RF tienen dos grandes ventajas:

---

<sup>1</sup>También se puede plantear para problemas de regresión. Esta tesis nos enfocaremos en clasificación.

- Mientras los árboles de decisión por si mismos tienden a hacer sobreajustar<sup>1</sup> la base de datos de entrenamiento, estas técnicas ceden a cada elemento estadísticas del conjunto de datos de entrenamiento distintas que le permiten al RF generalizar a datos no vistos.
- La varianza de los distintos estimadores del bosque aleatorio permite tener mayor resiliencia a ruido y datos de pobre calidad.

La publicación inicial del RF (111) muestra que el ensamble de estimadores mediante estas técnicas tiene una probabilidad menor de cometer errores en la clasificación y sin caer en sobreajuste en la base de entrenamiento. Estas características han colocado a los RF en el estado del arte para algoritmos de clasificación.

### A.2.1. Árbol de decisión

Los árboles de decisión es un algoritmo de aprendizaje de máquina popular por su fácil interpretación e implementación. El árbol de decisión se compone de nodos que van dividiendo la base de datos hasta llegar a las hojas (nodos finales) que definen la clase a la que pertenecen los datos (determinada por cual es la clase con mayor número de elementos en la hoja). Cada nodo en el árbol implica una pregunta de respuesta binaria (*Falso/Verdadero* y en el caso de características numéricas definido mediante un límite) que divide los datos del nodo en dos nodos menores. Los datos se van dividiendo hasta un nivel de profundidad (número de niveles) determinada como un hiper parámetro o hasta que los nodos llegan a cierto nivel de pureza. El nivel de pureza cuantifica si los datos en ese nodo pertenecen exclusivamente a una clase o no. Usualmente se cuantifica mediante el índice de Gini, definido por

$$G_i = 1 - \sum_{k=1}^n p_{i,k}^2 \quad (\text{A.3})$$

donde  $p_{i,k}$  es la razón del número de elementos de la clase  $k$  entre las entradas de dicha clase en el nodo  $i$  (129). De esta forma, un índice de Gini igual a 0 indica que los datos en ese nodo pertenecen exclusivamente a una clase. La Figura A.1 muestra un sencillo un árbol de decisión para ilustrar estos conceptos.

Para evaluar un dato a clasificar recorreremos el árbol de decisión respondiendo las preguntas de cada nodo hasta llegar en una hoja la cual define la clase a la que pertenece. Por ejemplo, supongamos queremos clasificar una flor nueva (que tiene un largo de pétalo de 3 y un ancho de 2) con el árbol de decisión de la Figura A.1. La respuesta al límite establecido en la pregunta del primer nodo es que es falso, lo cual nos lleva al segundo nodo del cual también su respuesta es falsa, por lo tanto, esta flor pertenece a

<sup>1</sup>El sobreajuste sucede cuando un modelo para clasificación acierta de manera casi ideal sus datos de entrenamiento (predicciones correctas) pero tiene pobre desempeño con datos nuevos (predicciones falsas).



la clase Virginica. El nivel de pureza de las hojas no permite calcular la probabilidad de pertenencia a esa clase. Primero se atraviesa el árbol hasta llegar una hoja, donde la probabilidad de pertenencia es la razón de instancias de la clase sobre los elementos del nodo(129). Para nuestro ejemplo, la probabilidad de que pertenezca a la clase Virginica es del 97.98 % (45/46).

Los árboles de decisión se construyen mediante algoritmos que optimizan cual es la característica (y el límite óptimo en caso de las numéricas) que minimiza el índice de Gini en los dos nodos resultantes de dividir el nodo actual. Esto implica que los nodos iniciales se construyen con aquella característica que resulta en una mayor separabilidad de clase entre los datos.

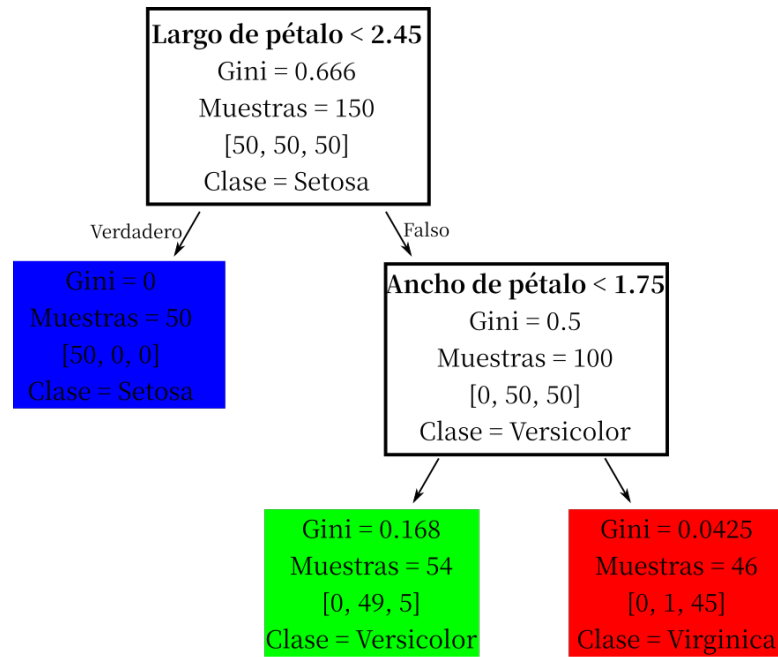
Aunque los árboles de decisión son intuitivos y de fácil interpretación, tienden a sobreajustar la base de datos con la que entrenan, lo que resulta en una pobre generalización para clasificar adecuadamente datos nuevos.

### A.2.2. Importancia de características

El objetivo de los análisis de importancia de características es identificar aquellas características que fueron más relevantes para la construcción de un algoritmo de clasificación, i.e., aquellas características que aportaron más separabilidad entre las clases. Esto puede ser relevante ya que dichas características pueden correlacionar con factores definitivos en aplicaciones reales, e.g. identificar que la obesidad es la principal característica que aumente la probabilidad de padecer alguna enfermedad. El análisis de importancia de características es un tema complejo e inclusive en algunos algoritmos de ML (e.g. en las redes neuronales) es inviable. Sin embargo, los RF tienen un mecanismo muy práctico para identificar la importancia de características mediante el índice de Gini.

En los RF la relevancia de características se calcula mediante la **importancia de Gini(111)**, la cual se define como el promedio (sobre todos los árboles en el ensamble) del decremento total de la impureza de Gini en el nodo (pesado por las muestras en dicho nodo) realizado por una característica. Generalmente, este es un indicativo de aquellas características que suelen estar en el nodo raíz de los árboles, las cuales daban mayor separabilidad a las clases de los datos (al minimizar el índice de Gini para sus nodos hijos). La importancia de Gini tiene la ventaja de ser muy sencilla de calcular, ya que los índices de Gini se calculan en la construcción de los árboles de decisión en la etapa de entrenamiento. Sin embargo, la importancia de Gini tiende a tener un sesgo hacia las características de alta cardinalidad (110) y reporta estadísticas relacionadas al conjunto de entrenamiento (111).

Una alternativa a la importancia de Gini es el método de **importancia de características por permutaciones(111)**. En este método se entrenan varios RF, pero destruyendo activamente (e.g. reemplazando con ruido) características distintas entre ellos. Posteriormente se realiza una comparación del desempeño de dichos árboles contra un caso base (i.e. un árbol entrenado con todas las características) y se identifican aquellas donde su destrucción afectó de manera significativa el desempeño de los RF.



Clases = [Setosa, Versicolor, Virginica]

□ Nodo. Contiene una pregunta.

■ Hoja. Define la clase.

**Figura A.1: Árbol de decisión.** Este sencillo ejemplo ilustra los conceptos básicos de un árbol de decisión. Los nodos contienen preguntas que dirigen los datos a clasificar a otros nodos. Las hojas (nodos finales) clasifican el dato en base al número de datos contenidos en el nodo en la fase de entrenamiento. El índice de Gini indica la pureza del nodo; por ejemplo, la hoja azul tiene un índice Gini de 0 ya que es un nodo puro pues todos sus elementos (50) pertenecen a la clase setosa. Figura adaptada de (129).

Por lo tanto, aquellas variables que afectaron considerablemente el desempeño se consideran importantes y aquellas que no lo afectaron se consideran irrelevantes. Inclusive es posible identificar características que afectan negativamente el desempeño del árbol, i.e. aquellas características que mejoró el desempeño cuando se substituyeron por ruido. La importancia por permutaciones no presenta las desventajas descritas para la importancia de Gini. Sin embargo, es mucho más cara de obtener computacionalmente debido a que requiere entrenar múltiples bosques aleatorios para obtener las estadísticas necesarias para discriminar las características irrelevantes.

### A.3. Histología - Azul de toluidina

La histología es una rama de la ciencia que estudia la composición microscópica de los tejidos y estructuras celulares mediante técnicas de microscopía. Los tejidos celulares no presentan mucho contraste de manera natural en el microscopio, por lo cual son tratados mediante una tinción para dotarlos de mayor especificidad de contraste celular. Las tinciones producen cambios químicos en el tejido que les permite modificar su respuesta a la luz (color) dentro del microscopio. Existe una gran variedad de tinciones que realizan distintos coloramientos (monocromáticos o policromáticos) o que reaccionan sólo con ciertas estructuras celulares específicas.

El azul de toluidina es una tinción monocromática muy utilizada en histología gracias a su costo y fácil implementación. Tiñe una amplia variedad de estructuras nucleares, citoplásmicas e intercelulares(130, 131). Los núcleos y ribosomas se tiñen de un azul profundo, mientras que estructuras membranosas se tiñen de un azul-verdoso. Otros componentes se pintan de un azul profundo (e.g. colágeno) o un de un pálido verde a azul. Añadir tetraóxido de osmio a la solución permite teñir claramente membranas y vainas de mielina(132, 133).

El azul de toluidina con tetraóxido de osmio es muy útil para teñir microestructura en materia blanca (sección 2.1). Las capas de mielina se tiñen de un azul oscuro y profundo, mientras los cuerpos axonales que rodean de un azul claro. La glía se tiñe de un azul intermedio que le permite distinguirse de los axones. Sin embargo, no es posible distinguir entre los tipos de glía con esta tinción. La Figura 2.2 presenta una microfotografía de una tinción de azul de toluidina en materia blanca.

## Productos académicos derivados

---

Esta sección enlista los trabajos académicos derivados en el desarrollo de esta tesis.

### B.1. Publicación

**Rios-Carrillo Ricardo**, Ramírez-Manzanares Alonso, Luna-Munguía Hiram, Regalado Mirelta, Concha Luis (2023) *Differentiation of white matter histopathology using b-tensor encoding and machine learning*. PLOS ONE 18(6): e0282549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282549>.

### B.2. Disponibilidad de datos

Todos los datos de histología y DW-MRI obtenidos en esta tesis se encuentran disponibles de manera libre en un repositorio del “Open Science Framework” con DOI <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/B2K4Z>.

### B.3. Código

El código para el pipeline de aprendizaje de máquina usado en esta tesis, así como los datos en un formato csv, se encuentran de manera libre en un repositorio de GitHub en [https://github.com/RicardoRios46/QTI\\_ML\\_WM\\_paper](https://github.com/RicardoRios46/QTI_ML_WM_paper).

### B.4. Conferencias nacionales

- *Implementación de secuencias avanzadas para imágenes de resonancia magnéticas pesadas difusión en resonador Bruker*. Póster digital. XXII Reunión de Neuroimagen, CIMAT, México.

## B. PRODUCTOS ACADÉMICOS DERIVADOS

---

- *Caracterización de histopatologías mediante imágenes sensibles a difusión adquiridas con tensor B*. Póster digital. XXIII Reunión de Neuroimagen, CIMAT, México.
- *Caracterización de daño en materia blanca a través de DW-MRI con codificación tensorial y aprendizaje de máquina*. Póster. XIV Reunión de Neuroimagen, CIMAT, México.
- *Caracterización de histopatologías mediante el modelo estándar de materia blanca*. Póster digital. Jornadas académicas 2021, INB, México
- *Caracterización de daño en materia blanca a través de DW-MRI con codificación tensorial y aprendizaje de máquina*. Póster. Jornadas académicas 2022, INB, México.

### B.5. Conferencias internacionales

- *Towards differentiation of white matter pathologies through B-tensor encoding*. Charla oral. ISMRM 2021.
- *Characterization of histopathology through B-tensor encoding in white matter*. Charla oral. ISMRM Trainee day 2021
- *Differentiation of white matter histopathology using B-tensor encoding and machine learning*. Charla oral. ISMRM diffusion workshop 2022.
- *DW-MRI B-tensor encoding acquisition and processing on a pre-clinical Bruker scanner*. Póster educacional. ISMRM 2023

## Bibliografía

---

- [1] D. Le Bihan, E. Breton, D. Lallemand, P. Grenier, E. Cabanis, and M. Laval-Jeantet, “MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders.,” *Radiology*, vol. 161, pp. 401–407, Nov. 1986. [1](#), [15](#)
- [2] L. Concha, “A macroscopic view of microstructure: Using diffusion-weighted images to infer damage, repair, and plasticity of white matter,” *Neuroscience*, vol. 276, pp. 14–28, Sept. 2014. [1](#), [23](#)
- [3] D. S. Novikov, E. Fieremans, S. N. Jespersen, and V. G. Kiselev, “Quantifying brain microstructure with diffusion MRI: Theory and parameter estimation,” *NMR in Biomedicine*, vol. 32, p. e3998, Apr. 2019. [1](#), [68](#), [69](#)
- [4] M. Afzali, T. Pieciak, S. Newman, E. Garyfallidis, E. Özarslan, H. Cheng, and D. K. Jones, “The sensitivity of diffusion MRI to microstructural properties and experimental factors,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 347, p. 108951, 2021. [1](#)
- [5] D. C. Alexander, T. B. Dyrby, M. Nilsson, and H. Zhang, “Imaging brain microstructure with diffusion MRI: Practicality and applications,” *NMR in Biomedicine*, vol. 32, no. 4, p. e3841, 2019. [1](#)
- [6] E. O. Stejskal and J. E. Tanner, “Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 42, pp. 288–292, Jan. 1965. [1](#), [18](#)
- [7] D. S. Novikov, V. G. Kiselev, and S. N. Jespersen, “On modeling,” *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 79, pp. 3172–3193, June 2018. [1](#), [22](#)
- [8] D. Topgaard, “Multidimensional diffusion MRI,” *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 275, pp. 98–113, Feb. 2017. [1](#), [25](#), [31](#), [32](#)
- [9] C.-F. Westin, H. Knutsson, O. Pasternak, F. Szczepankiewicz, E. Özarslan, D. van Westen, C. Mattisson, M. Bogren, L. J. O’Donnell, M. Kubicki, D. Topgaard, and M. Nilsson, “Q-space trajectory imaging for multidimensional diffusion MRI of

- the human brain,” *NeuroImage*, vol. 135, pp. 345–362, July 2016. [1](#), [2](#), [21](#), [26](#), [27](#), [28](#), [29](#), [30](#), [31](#), [33](#), [66](#), [67](#)
- [10] A. Reymbaut, P. Mezzani, J. P. d. A. Martins, and D. Topgaard, “Accuracy and precision of statistical descriptors obtained from multidimensional diffusion signal inversion algorithms,” *NMR in Biomedicine*, vol. 33, no. 12, p. e4267, 2020. [1](#), [44](#)
- [11] F. Szczepankiewicz, S. Hoge, and C.-F. Westin, “Linear, planar and spherical tensor-valued diffusion MRI data by free waveform encoding in healthy brain, water, oil and liquid crystals,” *Data in Brief*, vol. 25, p. 104208, Aug. 2019. [1](#), [30](#), [43](#), [69](#)
- [12] K. W. Andersen, S. Lasič, H. Lundell, M. Nilsson, D. Topgaard, F. Sellebjerg, F. Szczepankiewicz, H. R. Siebner, M. Blinkenberg, and T. B. Dyrby, “Disentangling white-matter damage from physiological fibre orientation dispersion in multiple sclerosis,” *Brain Communications*, vol. 2, no. 2, p. fcaa077, 2020. [1](#), [66](#)
- [13] J. Brabec, F. Szczepankiewicz, F. Lennartsson, E. Englund, H. Pebdani, J. Bengzon, L. Knutsson, C.-F. Westin, P. C. Sundgren, and M. Nilsson, “Histogram analysis of tensor-valued diffusion MRI in meningiomas: Relation to consistency, histological grade and type,” *NeuroImage: Clinical*, vol. 33, p. 102912, 2022. [1](#)
- [14] B. Lampinen, A. Zampeli, I. M. Björkman-Burtscher, F. Szczepankiewicz, K. Källén, M. Compagno Strandberg, and M. Nilsson, “Tensor-valued diffusion MRI differentiates cortex and white matter in malformations of cortical development associated with epilepsy,” *Epilepsia*, vol. 61, no. 8, pp. 1701–1713, 2020. [1](#)
- [15] D. Topgaard, “Diffusion tensor distribution imaging,” *NMR in Biomedicine*, vol. 32, p. e4066, May 2019. [1](#), [27](#), [29](#), [68](#)
- [16] M. Afzali, L. Mueller, F. Szczepankiewicz, D. K. Jones, and J. E. Schneider, “Quantification of Tissue Microstructure Using Tensor-Valued Diffusion Encoding: Brain and Body,” *Frontiers in Physics*, vol. 10, 2022. [2](#), [67](#)
- [17] N. Syed Nasser, S. Rajan, V. kumar Venugopal, S. Lasič, V. Mahajan, and H. Mahajan, “A review on investigation of the basic contrast mechanism underlying multidimensional diffusion MRI in assessment of neurological disorders,” *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 102, pp. 26–35, 2022. [2](#)
- [18] S. Fadnavis, J. Batson, and E. Garyfallidis, “Patch2Self: Denoising Diffusion MRI with Self-Supervised Learning,” 2020. [2](#)
- [19] X. Ye, P. Wang, S. Li, J. Zhang, Y. Lian, Y. Zhang, J. Lu, and H. Guo, “Simultaneous Super-Resolution and Distortion Correction for Single-shot EPI DWI using Deep Learning,” 2021. [2](#)

- 
- [20] A. Faiyaz, M. M. Doyley, G. Schifitto, and M. N. Uddin, “Artificial intelligence for diffusion MRI-based tissue microstructure estimation in the human brain: An overview,” *Frontiers in Neurology*, vol. 14, 2023. [2](#)
- [21] M. Reisert, E. Kellner, B. Dhital, J. Hennig, and V. G. Kiselev, “Disentangling micro from mesostructure by diffusion MRI: A Bayesian approach,” *NeuroImage*, vol. 147, pp. 964–975, 2017. [2](#)
- [22] M. Palombo, A. Ianus, M. Guerreri, D. Nunes, D. C. Alexander, N. Shemesh, and H. Zhang, “SANDI: A compartment-based model for non-invasive apparent soma and neurite imaging by diffusion MRI,” *NeuroImage*, vol. 215, p. 116835, 2020. [2](#)
- [23] S. Barbieri, O. J. Gurney-Champion, R. Klaassen, and H. C. Thoeny, “Deep learning how to fit an intravoxel incoherent motion model to diffusion-weighted MRI,” *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 83, no. 1, pp. 312–321, 2020. [2](#)
- [24] N. G. Gyori, C. A. Clark, D. C. Alexander, and E. Kaden, “On the potential for mapping apparent neural soma density via a clinically viable diffusion MRI protocol,” *NeuroImage*, vol. 239, p. 118303, 2021. [2](#)
- [25] J. de Almeida Martins, M. Nilsson, B. Lampinen, M. Palombo, P. T. While, C.-F. Westin, and F. Szczepankiewicz, “Neural networks for parameter estimation in microstructural MRI: Application to a diffusion-relaxation model of white matter,” *NeuroImage*, vol. 244, p. 118601, 2021. [2](#)
- [26] J. Wasserthal, P. Neher, and K. H. Maier-Hein, “TractSeg - Fast and accurate white matter tract segmentation,” *NeuroImage*, vol. 183, pp. 239–253, 2018. [2](#)
- [27] D. Ravi, N. Ghavami, D. C. Alexander, and A. Ianus, “Current Applications and Future Promises of Machine Learning in Diffusion MRI,” in *Computational Diffusion MRI* (E. Bonet-Carne, F. Grussu, L. Ning, F. Sepehrband, and C. M. W. Tax, eds.), Mathematics and Visualization, pp. 105–121, Springer International Publishing, 2019. [2](#)
- [28] B. Lampinen, *Probing brain microstructure with multidimensional diffusion MRI: Encoding, interpretation, and the role of exchange*. PhD thesis, Lund university, Lund, Suecia, 2021. [5](#), [8](#)
- [29] J. M. Edgar and I. R. Griffiths, *Diffusion MRI From Quantitative Measurement to In vivo Neuroanatomy*, ch. White Matter Structure: A microscopist’s view. London, UK: Academic Press Elsevier, 2013. [6](#), [9](#), [10](#)
- [30] J. C. Fiala, J. Spacek, and K. M. Harris, *Dendrites*, ch. Dendrite structure. New York, NY: Oxford University Press, 2007. [8](#)
- [31] M. Patestas and L. P. Gartner, *A textbook of neuro anatomy*. Hoboken, New Jersey: Jhon Wiley and Sons, 2 ed., 2016. [8](#), [9](#), [10](#)
-



- [32] P. Mason, *Medical neurobiology*. New York, NY: Oxford University Press, 2 ed., 2017. [8](#), [9](#)
- [33] A. Schüz and V. Braitenberg, *Cortical Areas Unity and Diversity*, ch. The Human Cortical White Matter: Quantitative Aspects of Cortico-Cortical Long-Range Connectivity. London, UK: CRC Press, 2002. [9](#)
- [34] A. F. H. McCaslin, B. R. Chen, A. J. Radosevich, B. Cauli, and E. M. C. Hillman, “In vivo 3D morphology of astrocyte–vasculature interactions in the somatosensory cortex: Implications for neurovascular coupling,” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 31, pp. 795–806, Mar. 2011. [9](#)
- [35] D. L. Clark, N. N. Boutros, and M. F. Mendez, *The brain and behavior: An introduction to behavioral neuroanatomy*. Cambridge NY: Cambridge University Press, 3 ed., 2010. [9](#)
- [36] M. V. Sofroniew and H. V. Vinters, “Astrocytes: Biology and pathology,” *Acta Neuropathologica*, vol. 119, pp. 7–35, Jan. 2010. [9](#), [12](#)
- [37] A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff, and F. Helmchen, “Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo,” *Science*, vol. 308, pp. 1314–1318, May 2005. [10](#)
- [38] C. M. Filley, *Diffusion MRI Theory, methods, and applications*, ch. Neurobiology of white matter disorders. New York, NY: Oxford University Press, 2011. [10](#), [12](#)
- [39] D. A. Hilton and A. G. Shivane, *Neuropathology simplified*. Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland, 2 ed., 2021. [10](#), [12](#), [14](#)
- [40] D. I. Graham, J. A. R. Nicoll, and I. Bone, *Adams and Graham’s Introduction to Neuropathology*. Euston Road, London: Hodder Arnold, 3 ed., 2006. [10](#), [12](#), [14](#)
- [41] S. L. Carroll and S. H. Worley, “Wallerian Degeneration,” in *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, Elsevier, 2017. [11](#)
- [42] A. Waller, “Experiments on the Section of the Glosso-Pharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres,” *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, vol. 76, no. 189, pp. 369–376, 1851. [11](#)
- [43] L. Conforti, J. Gilley, and M. P. Coleman, “Wallerian degeneration: An emerging axon death pathway linking injury and disease,” *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 15, no. 6, pp. 394–409, 2014. [11](#)
- [44] J. T. Wang, Z. A. Medress, and B. A. Barres, “Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 196, no. 1, pp. 7–18, 2012. [11](#), [13](#)

- 
- [45] M. Bradl and H. Lassmann, “Oligodendrocytes: Biology and pathology,” *Acta Neuropathologica*, vol. 119, no. 1, pp. 37–53, 2010. 12
- [46] D. DiSabato, N. Quan, and J. P. Godbout, “Neuroinflammation: The Devil is in the Details,” *Journal of neurochemistry*, vol. 139, pp. 136–153, 2016. 12
- [47] P. K. Petersons and M. Toborek, *Neuroinflammation and neurodegeneration*. New York, NY: Springer Science+Business Media, 1 ed., 2014. 12
- [48] R. Brown, “A brief account of microscopical observations made in the months of june, july, and august, 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies,” *Phil Mag*, 1828. 15
- [49] A. Einstein, “Über die von der molekularkinetischen theorie der wärme gefordete bewegung von in ruhenden flüssigkeiten suspendierten teilchen,” *Ann Physik*, 1905. 16
- [50] O. Dietrich, “Diffusion coefficients of water.” 16
- [51] R. Mills, “Self-diffusion in normal and heavy water in the range 1-45.deg.,” *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 77, no. 5, pp. 685–688, 1973. 16
- [52] C. Beaulieu, *Diffusion MRI Theory, methods, and applications*, ch. What makes diffusion anisotropic in the nervous system? New York, NY: Oxford University Press, 2011. 17
- [53] J. P. Hornak, “The basics of MRI.” <https://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/index.html>, 2017. 16
- [54] D. W. McRobbie, E. A. Moore, M. J. Graves, and M. R. Prince, *MRI from Picture to Proton*. Cambridge University Press, 3 ed., 2017. 16
- [55] A. O. Rodríguez, “Principles of magnetic resonance imaging,” *Revista mexicana de física*, vol. 50, no. 3, pp. 272–286, 2004. 16
- [56] C. Beaulieu, “The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system – a technical review,” *NMR in Biomedicine*, vol. 15, no. 7-8, pp. 435–455, 2002. 17
- [57] E. L. Hahn, “Spin Echoes,” *Physical Review*, vol. 80, pp. 580–594, Nov. 1950. 18
- [58] W. S. Price, “Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: Part 1. Basic theory,” *Concepts in Magnetic Resonance*, vol. 9, no. 5, pp. 299–336, 1997. 18, 20
- [59] N. Shemesh, S. N. Jespersen, D. C. Alexander, Y. Cohen, I. Drobnjak, T. B. Dyrby, J. Finsterbusch, M. A. Koch, T. Kuder, F. Laun, M. Lawrenz, H. Lundell, P. P. Mitra, M. Nilsson, E. Özarslan, D. Topgaard, and C.-F. Westin, “Conventions and nomenclature for double diffusion encoding NMR and MRI,” *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 75, no. 1, pp. 82–87, 2016. 18

- [60] P. T. Callaghan, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy*. Oxford University Press, 1991. [19](#), [72](#)
- [61] D. Le Bihan and E. Breton, “Imagerie de diffusion in-vivo par résonance magnétique nucléaire,” *Comptes-Rendus de l’Académie des Sciences*, vol. 93, pp. 27–34, Dec. 1985. [19](#)
- [62] J. Mattiello, P. J. Basser, and D. Lebihan, “Analytical Expressions for the b Matrix in NMR Diffusion Imaging and Spectroscopy,” *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, vol. 108, pp. 131–141, June 1994. [19](#), [20](#)
- [63] I. O. Jelescu, F. Grussu, A. Ianus, B. Hansen, R. L. C. Barrett, M. Aggarwal, S. Michielse, F. Nasrallah, W. Syeda, N. Wang, J. Veraart, A. Roebroek, A. F. Bagdasarian, C. Eichner, F. Sepelband, J. Zimmermann, L. Soustelle, C. Bowman, B. C. Tandler, A. Hertanu, B. Jeurissen, M. Verhoye, L. Frydman, Y. van de Looij, D. Hike, J. F. Dunn, K. Miller, B. A. Landman, N. Shemesh, A. Anderson, E. McKinnon, S. Farquharson, F. D. Acqua, C. Pierpaoli, I. Drobnjak, A. Leemans, K. D. Harkins, M. Descoteaux, D. Xu, H. Huang, M. D. Santin, S. C. Grant, A. Obenaus, G. S. Kim, D. Wu, D. L. Bihan, S. J. Blackband, L. Ciobanu, E. Fieremans, R. Bai, T. Leergaard, J. Zhang, T. B. Dyrby, G. A. Johnson, J. Cohen-Adad, M. D. Budde, and K. G. Schilling, “Recommendations and guidelines from the ISMRM Diffusion Study Group for preclinical diffusion MRI: Part 1 – In vivo small-animal imaging,” 2023. [20](#)
- [64] P. J. Basser, J. Mattiello, and D. Lebihan, “Estimation of the Effective Self-Diffusion Tensor from the NMR Spin Echo,” *Journal of Magnetic Resonance, Series B*, vol. 103, pp. 247–254, Mar. 1994. [20](#)
- [65] D. K. Jones, *Diffusion MRI From Quantitative Measurement to In vivo Neuroanatomy*, ch. Gaussian Modeling of the Diffusion Signal. London, UK: Academic Press Elsevier, 2013. [22](#), [23](#)
- [66] J. Veraart, J. Sijbers, S. Sunaert, A. Leemans, and B. Jeurissen, “Weighted linear least squares estimation of diffusion MRI parameters: Strengths, limitations, and pitfalls,” *NeuroImage*, vol. 81, pp. 335–346, 2013. [22](#)
- [67] L. Concha, *Diffusion tensor tractography of temporal lobe epilepsy*. PhD thesis, University of Alberta, Edmonton, Canada, 2008. [24](#)
- [68] M. Drake-Pérez, J. Boto, A. Fittsiori, K. Lovblad, and M. I. Vargas, “Clinical applications of diffusion weighted imaging in neuroradiology,” *Insights into Imaging*, vol. 9, pp. 535–547, Aug. 2018. [23](#)
- [69] A. Eed, A. Cerdán Cerdá, J. Lerma, and S. De Santis, “Diffusion-weighted MRI in neurodegenerative and psychiatric animal models: Experimental strategies and main outcomes,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 343, p. 108814, 2020. [24](#)

- 
- [70] J. H. Jensen, J. A. Helpert, A. Ramani, H. Lu, and K. Kaczynski, “Diffusional kurtosis imaging: The quantification of non-gaussian water diffusion by means of magnetic resonance imaging,” *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 53, no. 6, pp. 1432–1440, 2005. [24](#)
- [71] V. G. Kiselev, *Diffusion MRI Theory, methods, and applications*, ch. The cumulant expansion: An overarching mathematical framework for understanding diffusion NMR. New York, NY: Oxford University Press, 2011. [25](#)
- [72] R. N. Henriques, S. N. Jespersen, and N. Shemesh, “Correlation tensor magnetic resonance imaging,” *NeuroImage*, vol. 211, p. 116605, May 2020. [25](#), [67](#)
- [73] L. M. Burcaw, E. Fieremans, and D. S. Novikov, “Mesoscopic structure of neuronal tracts from time-dependent diffusion,” *NeuroImage*, vol. 114, pp. 18–37, 2015. [25](#)
- [74] I. O. Jelescu, M. Palombo, F. Bagnato, and K. G. Schilling, “Challenges for biophysical modeling of microstructure,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 344, p. 108861, Oct. 2020. [25](#)
- [75] P. P. Mitra, “Multiple wave-vector extensions of the NMR pulsed-field-gradient spin-echo diffusion measurement,” *Physical Review B*, vol. 51, pp. 15074–15078, June 1995. [25](#)
- [76] S. Ramanna, H. G. Moss, E. T. McKinnon, E. Yacoub, J. A. Helpert, and J. H. Jensen, “Triple diffusion encoding mri predicts intra-axonal and extra-axonal diffusion tensors in white matter,” *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 83, no. 6, pp. 2209–2220, 2020. [25](#)
- [77] S. N. Jespersen, “Equivalence of double and single wave vector diffusion contrast at low diffusion weighting,” *NMR in Biomedicine*, vol. 25, no. 6, pp. 813–818, 2012. [26](#)
- [78] C.-F. Westin, F. Szczepankiewicz, O. Pasternak, E. Özarlan, D. Topgaard, H. Knutsson, and M. Nilsson, “Measurement Tensors in Diffusion MRI: Generalizing the Concept of Diffusion Encoding,” *Medical image computing and computer-assisted intervention : MICCAI ... International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*, vol. 17, no. 0 3, pp. 209–216, 2014. [26](#)
- [79] J. Sjölund, F. Szczepankiewicz, M. Nilsson, D. Topgaard, C.-F. Westin, and H. Knutsson, “Constrained optimization of gradient waveforms for generalized diffusion encoding,” *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 261, pp. 157–168, Dec. 2015. [26](#), [43](#)
- [80] F. Szczepankiewicz, S. Lasic, M. Nilsson, H. Lundell, C.-F. Westin, and D. Topgaard, “Is spherical diffusion encoding rotation invariant? an investigation of

- diffusion time-dependence in the healthy brain,” in *Proc. of the Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB & ISMRT 27th Annual Meeting*, 2019. <https://archive.ismrm.org/2019/0223.html>. 26
- [81] F. Szczepankiewicz, C.-F. Westin, and M. Nilsson, “Gradient waveform design for tensor-valued encoding in diffusion MRI,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 348, p. 109007, Jan. 2021. 26, 69
- [82] S. Coelho, J. M. Pozo, S. N. Jespersen, and A. F. Frangi, “Optimal experimental design for biophysical modelling in multidimensional diffusion MRI,” in *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2019* (D. Shen, T. Liu, T. M. Peters, L. H. Staib, C. Essert, S. Zhou, P.-T. Yap, and A. Khan, eds.), (Cham), pp. 617–625, Springer International Publishing, 2019. 26
- [83] V. G. Kiselev, “Microstructure with diffusion MRI: What scale we are sensitive to?,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 347, p. 108910, Jan. 2021. 27
- [84] A. Reymbaut, “Diffusion Anisotropy and Tensor-valued Encoding,” in *Advanced Diffusion Encoding Methods in MRI*, The Royal Society of Chemistry, 08 2020. 27
- [85] M. Almedia, “Resolving sub-voxel heterogeneity in the living brain with 5d relaxation-diffusion correlation mri..” Talk at micro2macro hackaton, 2021. 32
- [86] B. Jian, B. C. Vemuri, E. Özarıslan, P. R. Carney, and T. H. Mareci, “A novel tensor distribution model for the diffusion-weighted MR signal,” *NeuroImage*, vol. 37, no. 1, pp. 164–176, 2007. 28
- [87] A. Ramirez-Manzanares, M. Rivera, B. C. Vemuri, P. Carney, and T. Mareci, “Diffusion Basis Functions Decomposition for Estimating White Matter Intra-voxel Fiber Geometry,” *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 26, no. 8, pp. 1091–1102, 2007. 28
- [88] D. S. Tuch, T. G. Reese, M. R. Wiegell, N. Makris, J. W. Belliveau, and V. J. Weeden, “High angular resolution diffusion imaging reveals intravoxel white matter fiber heterogeneity,” *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 48, no. 4, pp. 577–582, 2002. 29
- [89] R. Coronado-Leija, A. Ramirez-Manzanares, and J. L. Marroquin, “Estimation of individual axon bundle properties by a Multi-Resolution Discrete-Search method,” *Medical Image Analysis*, vol. 42, pp. 26–43, 2017. 29
- [90] B. Scherrer, A. Schwartzman, M. Taquet, M. Sahin, S. P. Prabhu, and S. K. Warfield, “Characterizing brain tissue by assessment of the distribution of anisotropic microstructural environments in diffusion-compartment imaging (DIAMOND),” *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 76, no. 3, pp. 963–977, 2016. 29

- 
- [91] B. Lampinen, F. Szczepankiewicz, J. Mårtensson, D. Westen, O. Hansson, C. Westin, and M. Nilsson, “Towards unconstrained compartment modeling in white matter using diffusion-relaxation MRI with tensor-valued diffusion encoding,” *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 84, no. 3, pp. 1605–1623, 2020. [29](#), [68](#)
- [92] L. García, “Estimación de distribuciones de tensores de difusión mediante imágenes de resonancia magnética con codificación multidimensional,” Master’s thesis, Centro de investigación en matemáticas, A.C., Guanajuato, México, 2021. [29](#)
- [93] P. J. Basser and S. Pajevic, “Spectral decomposition of a 4th-order covariance tensor: Applications to diffusion tensor MRI,” *Signal Processing*, vol. 87, pp. 220–236, Feb. 2007. [30](#)
- [94] J. Morez, F. Szczepankiewicz, A. J. den Dekker, F. Vanhevel, J. Sijbers, and B. Jeurissen, “Optimal experimental design and estimation for q-space trajectory imaging,” *Human Brain Mapping*, vol. 44, no. 4, pp. 1793–1809, 2023. [30](#)
- [95] M. Herberthson, D. Boito, T. D. Haije, A. Feragen, C.-F. Westin, and E. Özarslan, “Q-space trajectory imaging with positivity constraints (QTI+),” *NeuroImage*, vol. 238, p. 118198, 2021. [30](#), [44](#)
- [96] R. N. Henriques, S. N. Jespersen, and N. Shemesh, “Microscopic anisotropy misestimation in spherical-mean single diffusion encoding MRI,” *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 81, no. 5, pp. 3245–3261, 2019. [34](#)
- [97] M. Adachi, K. Takahashi, M. Nishikawa, H. Miki, and M. Uyama, “High intraocular pressure-induced ischemia and reperfusion injury in the optic nerve and retina in rats,” *Graefes’ Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 234, pp. 445–451, July 1996. [39](#)
- [98] M. L. Aranda, D. Dorfman, P. H. Sande, and R. E. Rosenstein, “Experimental optic neuritis induced by the microinjection of lipopolysaccharide into the optic nerve,” *Experimental Neurology*, vol. 266, pp. 30–41, Apr. 2015. [40](#)
- [99] G. Rojas-Vite, R. Coronado-Leija, O. Narvaez-Delgado, A. Ramírez-Manzanares, J. L. Marroquín, R. Noguez-Imm, M. L. Aranda, B. Scherrer, J. Larriva-Sahd, and L. Concha, “Histological validation of per-bundle water diffusion metrics within a region of fiber crossing following axonal degeneration,” *NeuroImage*, vol. 201, p. 116013, Nov. 2019. [40](#), [65](#), [66](#), [69](#)
- [100] R. L. C. Barrett, D. Cash, C. Simmons, E. Kim, T. C. Wood, R. Stones, A. C. Vernon, M. Catani, and F. Dell’Acqua, “Tissue optimization strategies for high-quality ex vivo diffusion imaging,” *NMR in Biomedicine*, vol. 36, no. 3, p. e4866, 2023. [40](#), [42](#)
- [101] K. G. Schilling, F. Grussu, A. Ianus, B. Hansen, R. L. C. Barrett, M. Aggarwal, S. Michielse, F. Nasrallah, W. Syeda, N. Wang, J. Veraart, A. Roebroek,

- A. F. Bagdasarian, C. Eichner, F. Sepehrband, J. Zimmermann, L. Soustelle, C. Bowman, B. C. Tandler, A. Hertanu, B. Jeurissen, L. Frydman, Y. van de Looij, D. Hike, J. F. Dunn, K. Miller, B. A. Landman, N. Shemesh, A. Anderson, E. McKinnon, S. Farquharson, F. D. Acqua, C. Pierpaoli, I. Drobnjak, A. Leemans, K. D. Harkins, M. Descoteaux, D. Xu, H. Huang, M. D. Santin, S. C. Grant, A. Obenaus, G. S. Kim, D. Wu, D. L. Bihan, S. J. Blackband, L. Ciobanu, E. Fieremans, R. Bai, T. Leergaard, J. Zhang, T. B. Dyrby, G. A. Johnson, J. Cohen-Adad, M. D. Budde, and I. O. Jelescu, “Recommendations and guidelines from the ISMRM Diffusion Study Group for preclinical diffusion MRI: Part 2 – Ex vivo imaging,” 2023. [40](#), [42](#)
- [102] F. Szczepankiewicz, C.-F. Westin, and M. Nilsson, “Maxwell-compensated design of asymmetric gradient waveforms for tensor-valued diffusion encoding,” *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 82, no. 4, pp. 1424–1437, 2019. [43](#)
- [103] H. Lundell, M. Nilsson, T. B. Dyrby, G. J. M. Parker, P. L. H. Cristinacce, F.-L. Zhou, D. Topgaard, and S. Lasič, “Multidimensional diffusion MRI with spectrally modulated gradients reveals unprecedented microstructural detail,” *Scientific Reports*, vol. 9, p. 9026, June 2019. [43](#), [69](#)
- [104] J. Veraart, D. S. Novikov, D. Christiaens, B. Ades-aron, J. Sijbers, and E. Fieremans, “Denoising of diffusion MRI using random matrix theory,” *NeuroImage*, vol. 142, pp. 394–406, Nov. 2016. [44](#)
- [105] L. Cordero-Grande, D. Christiaens, J. Hutter, A. N. Price, and J. V. Hajnal, “Complex diffusion-weighted image estimation via matrix recovery under general noise models,” *NeuroImage*, vol. 200, pp. 391–404, Oct. 2019. [44](#)
- [106] J.-D. Tournier, R. Smith, D. Raffelt, R. Tabbara, T. Dhollander, M. Pietsch, D. Christiaens, B. Jeurissen, C.-H. Yeh, and A. Connelly, “MRtrix3: A fast, flexible and open software framework for medical image processing and visualisation,” *NeuroImage*, vol. 202, p. 116137, Nov. 2019. [44](#)
- [107] D. Boito, M. Herberthson, T. D. Haije, and E. Özarslan, “Applying positivity constraints to q-space trajectory imaging: The QTI+ implementation,” *SoftwareX*, vol. 18, 2022. [44](#)
- [108] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona, “Fiji: An open-source platform for biological-image analysis,” *Nature Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, 2012. [46](#)
- [109] S. Preibisch, S. Saalfeld, and P. Tomancak, “Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions,” *Bioinformatics*, vol. 25, no. 11, pp. 1463–1465, 2009. [46](#)

- 
- [110] G. Louppe, *Understanding Random Forests: From Theory to Practice*. PhD thesis, University of Liege, Liege, Bélgica, 2014. [48](#), [74](#)
- [111] L. Breiman, “Random Forests,” *Machine Learning*, vol. 45, no. 1, pp. 5–32, 2001. [48](#), [72](#), [73](#), [74](#)
- [112] L. W. Swanson, “Brain maps 4.0—Structure of the rat brain: An open access atlas with global nervous system nomenclature ontology and flatmaps,” *Journal of Comparative Neurology*, vol. 526, no. 6, pp. 935–943, 2018. [52](#)
- [113] S. K. Song, S. W. Sun, W. K. Ju, S. J. Lin, A. H. Cross, and A. H. Neufeld, “Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia,” *Neuroimage*, vol. 20, no. 3, pp. 1714–22, 2003. [65](#), [66](#)
- [114] G. Yang, Q. Tian, C. Leuze, M. Wintermark, and J. A. McNab, “Double diffusion encoding MRI for the clinic,” *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 80, no. 2, pp. 507–520, 2018. [66](#)
- [115] H. Kettenmann, U.-K. Hanisch, M. Noda, and A. Verkhratsky, “Physiology of Microglia,” *Physiological Reviews*, vol. 91, no. 2, pp. 461–553, 2011. [66](#)
- [116] M. L. Bennett and A. N. Viaene, “What are activated and reactive glia and what is their role in neurodegeneration?,” *Neurobiology of Disease*, vol. 148, p. 105172, 2021. [66](#)
- [117] C. B. Ryan, J. S. Choi, H. Al-Ali, and J. K. Lee, “Myelin and non-myelin debris contribute to foamy macrophage formation after spinal cord injury,” *Neurobiology of Disease*, vol. 163, p. 105608, 2022. [66](#)
- [118] T. Chen and C. Guestrin, “XGBoost: A Scalable Tree Boosting System,” in *Proceedings of the 22nd ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*, pp. 785–794, Aug. 2016. [67](#)
- [119] Y. LeCun, Y. Bengio, and G. Hinton, “Deep learning,” *Nature*, vol. 521, pp. 436–444, May 2015. [67](#)
- [120] R. Garcia-Hernandez, A. Cerdán Cerdá, A. Trouve Carpena, M. Drakesmith, K. Koller, D. K. Jones, S. Canals, and S. De Santis, “Mapping microglia and astrocyte activation in vivo using diffusion MRI,” *Science Advances*, vol. 8, no. 21, p. eabq2923, 2022. [67](#)
- [121] C. Ingo, W. Brink, E. Ercan, A. G. Webb, and I. Ronen, “Studying neurons and glia non-invasively via anomalous subdiffusion of intracellular metabolites,” *Brain Structure and Function*, vol. 223, no. 8, pp. 3841–3854, 2018. [67](#)



- [122] R. Coronado-Leija, A. Abdollahzadeh, H.-H. Lee, S. Coelho, R. A. Salo, J. Tohka, A. Sierra, D. S. Novikov, and E. Fieremans, “Validation of diffusion mri-derived white matter microstructure metrics using 3d electron microscopy in injured rat brain,” in *Proc. of the Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB & ISMRT 31st Annual Meeting*, 2022. <https://archive.ismrm.org/2022/0521.html>. 67
- [123] R. Alves, R. N. Henriques, L. Kerkelä, C. Chavarrías, S. N. Jespersen, and N. Shemesh, “Correlation Tensor MRI deciphers underlying kurtosis sources in stroke,” *NeuroImage*, vol. 247, p. 118833, 2022. 67
- [124] J. P. de Almeida Martins, C. M. W. Tax, A. Reymbaut, F. Szczepankiewicz, M. Chamberland, D. K. Jones, and D. Topgaard, “Computing and visualising intra-voxel orientation-specific relaxation–diffusion features in the human brain,” *Human Brain Mapping*, vol. 42, no. 2, pp. 310–328, 2021. 68
- [125] O. Narvaez, L. Svenningsson, M. Yon, A. Sierra, and D. Topgaard, “Massively Multidimensional Diffusion-Relaxation Correlation MRI,” *Frontiers in Physics*, vol. 9, p. 793966, Jan. 2022. 68
- [126] S. Coelho, S. H. Baete, G. Lemberskiy, B. Ades-Aron, G. Barrol, J. Veraart, D. S. Novikov, and E. Fieremans, “Reproducibility of the Standard Model of diffusion in white matter on clinical MRI systems,” *NeuroImage*, vol. 257, p. 119290, 2022. 68
- [127] V. J. Wedeen, P. Hagmann, W.-Y. I. Tseng, T. G. Reese, and R. M. Weisskoff, “Mapping complex tissue architecture with diffusion spectrum magnetic resonance imaging,” *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 54, no. 6, pp. 1377–1386, 2005. 72
- [128] L. Breiman, “Bagging predictors,” *Machine Learning*, vol. 24, no. 2, pp. 123–140, 1996. 72
- [129] A. géron, *Hands-On Machine Learning with Scikit-Learn, Keras, and TensorFlow*. O’Reilly Media, Inc, 2 ed., 2019. 73, 74, 75
- [130] C. Allen, G. Frame, and C. Wilson, “The structure of the so-called toluidine blue,” *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 6, no. 5, pp. 732–749, 1941. 76
- [131] M. A. García-Cabezas, Y. J. John, H. Barbas, and B. Zikopoulos, “Distinction of neurons, glia and endothelial cells in the cerebral cortex: An algorithm based on cytological features,” *Frontiers in Neuroanatomy*, vol. 10, 2016. 76
- [132] B. F. Trump, E. A. Smuckler, and E. P. Benditt, “A method for staining epoxy sections for light microscopy,” *Journal of ultrastructure research*, vol. 5, no. 4, pp. 343–348, 1961. 76

- [133] F. D. Scipio, S. Raimondo, P. Tos, and S. Geuna, “A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation,” *Microscopy Research and Technique*, vol. 71, no. 7, pp. 497–502, 2008. [76](#)