



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA MICROESTRUCTURA DE LA
SUBSTANCIA BLANCA EN REGIONES DE CRUCE DE FIBRAS**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

GILBERTO ROJAS VITE

TUTOR:

DR. LUIS CONCHA LOYOLA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
COMITÉ TUTOR:

DR. JORGE LARRIVA SAHD
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DR. SARAEL ALCÁUTER SOLORZANO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

QUERÉTARO, MÉXICO. JUNIO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Personales = [“Magdalena Vite Cerecedo”, “Gerardo Rojas Vite”, “Sonia Vite Cerecedo”, “Alfredo Hernández Martínez”, “Emmanuel Demetrio Vite González”, “Keila Dara Rojas García”, “Eduardo Rojas Hortelano”, “Elisa Minely Copca Cabañas”, “Luis Concha Loyola”, “Alonso Ramírez Manzanares”, “Andrea Nicholas”]

Académicos = [“Dr. Luis Concha Loyola”: tutor de tesis,
“Dr. Sarael Alcáuter Solorzano”: miembro del comité tutorial,
“Dr. Jorge Antonio Larriva Sahd”: miembro del comité tutorial,
“Dr. Rogelio Arellano Ostoa”: miembro del jurado de examen de grado,
“Marie Bedos”: miembro del jurado de examen de grado,
“Dr. María Rosa Avila Costa”: miembro del jurado de examen de grado,
“Dr. Alonso Ramírez Manzanares”: colaborador.
“Dr. Ricardo Coronado Lejía”: colaborador,
“Ramsés Noguez Imm”: colaborador,
“Omar Narvaez Delgado”: colaborador,
“Mtro. Juan José Ortiz Retana”: apoyo técnico (resonancia magnética),
“Mtra. Gema Martínez Cabrera”: apoyo técnico (histología),
“Mtro. Leopoldo González Santos”: apoyo técnico (manejo y visualización de datos),
“Nancy Retiz Vázquez”: apoyo para la recuperación de datos,
“Dr. Hiram Luna Munguía”: apoyo académico,
“Mtro. Carlos Itzamná Sánchez Moncada”: compañero de laboratorio,
“Dra. Guadalupe García Gomar”: compañera de laboratorio,
“Dr. Fernando Peña Ortega”: profesor,
“Dr. Pavel Rueda Orozco”: profesor]



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de “Conectividad Cerebral” (C-13) del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión del Dr. Luis Concha Loyola.

La investigación realizada no hubiera sido posible sin el financiamiento otorgado al Laboratorio Nacional Enfocado en Imagenología por Resonancia Magnética, UNAM, por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; donativos: 232673, 251216 y 280283). De igual manera, se agradece al CONACYT por la beca de posgrado concedida para el desarrollo de este trabajo (CVU 440867).

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	7
II. MARCO TEÓRICO	
2. 1. Morfología de la sustancia blanca	10
2. 2. Evaluación de la sustancia blanca por medio de dMRI	14
2. 3. Evaluación del estado de la sustancia blanca a través del modelo del tensor	17
2. 4. Alternativas al modelo del tensor.....	21
III. JUSTIFICACIÓN	
3. 1. Planteamiento del problema	27
3. 2. Relevancia	27
3. 3. Objetivos	28
IV. MÉTODOS	
4. 1. Regiones de interés	30
4. 2. Preparación de la muestra	31
4. 3. Análisis histológico	32
4. 4. Análisis MRI	33
4. 4. 1. Adquisición de las imágenes	34
4. 4. 2. Preprocesamiento y procesamiento de las imágenes ...	35

4. 4. 3. Selección de las regiones de interés	40
4. 4. 4. Extracción de datos	41
4. 5. Pruebas estadísticas.....	41
V. RESULTADOS	42
VI. DISCUSIÓN	52
ANEXOS.....	56
LISTA DE FIGURAS.....	63
REFERENCIAS.....	65

Παντες ανθρωποι τον ειδεναι ορεγονται φυσει
Αριστοτέλης

I. INTRODUCCIÓN

El presente proyecto pretende determinar marcadores biológicos que permitan inferir características microestructurales de la sustancia blanca en regiones de cruce de fibras, en tejido sano y dañado, con ayuda de los análisis generados a través de imagenología por resonancia magnética sensible a difusión (dMRI, por sus siglas en inglés).

La dMRI permite obtener información de la microestructura de la sustancia blanca, pues si bien la resolución de las imágenes obtenidas en humanos, *in vivo*, es de aproximadamente 2 mm, la información reflejada es del rango de las decenas de micras (Tofts, 2003: 5-6). Si bien existen otras técnicas que nos permiten hacer una evaluación microscópica, como la histología, la ventaja de la dMRI es que es una técnica no invasiva. Esta característica hace posible la evaluación *in vivo* de una gran diversidad de áreas del cerebro, pudiendo ser aplicada a seres humanos. Gracias a ello, la dMRI es una técnica utilizada con una gran diversidad de enfoques, permitiendo obtener información sobre el tejido en su estado fisiológico y patológico.

La dMRI puede ser utilizada bajo el esquema de lo que se conoce como MRI cuantitativa (qMRI: Tofts, 2003: 5), es decir, como un instrumento científico para la evaluación rigurosa. Para lograr esto, la dMRI se apoya de modelos matemáticos. Un modelo que ha sido de gran utilidad para diversas investigaciones es el *modelo del tensor*. Su simpleza matemática e intuitiva interpretación biológica lo han convertido en el modelo más utilizado en la clínica y en la investigación. Sin embargo, no es un modelo funcional para todos los casos, pues sus interpretaciones solo son adecuadas en regiones donde sólo hay un grupo de fibras, por lo que no es confiable para la evaluación de áreas de cruce de fibras. El problema es que el 90% de los voxels (unidades digitales tridimensionales de imagen) presentan cruce de fibras (Jeurissen et al., 2013).

El problema del cruce de fibras ha devenido en el desarrollo de otros

modelos matemáticos que lo solucionan en mayor o menor medida, como Constrained Spherical Deconvolution (Tournier, 2004), Diffusion spectrum imaging (Tuch, 2002a; Wedeen et al., 2000, 2005), QBall Imaging (Tuch DS, 2004), modelos multi-tensor (por ejemplo, MRDS, Coronado-Leija et al., 2017), entre otros. Aunque estos modelos sí son capaces de discernir más de una población de fibras que conviven dentro de un voxel, hasta el momento no sabemos la cantidad de información histológica que es posible obtener por medio de estos modelos. En particular, es de interés lograr inferir características microestructurales en poblaciones que se cruzan, y proveer de validación histológica de las mismas.

Por lo tanto, resulta necesario el diseño de un estudio que relacione los datos derivados de los modelos matemáticos con información directa del substrato biológico, pues sólo así podremos tener certeza de los análisis generados con base en los modelos matemáticos que resuelven regiones de cruce de fibras. El presente proyecto pretende contribuir a esto mediante la correlación de los datos obtenidos por medio del análisis de las imágenes sensibles a difusión de una región de cruce de fibras, con los datos derivados de la histología, para la determinación de marcadores biológicos.

Se considera que esto representa un gran aporte para la qMRI, al brindar información de parámetros potencialmente útiles para la obtención de datos confiables sobre regiones de cruce de fibras en tejido tanto sano como dañado, lo cual puede ser de gran utilidad para diferentes áreas de investigación en las neurociencias, y para el adecuado uso de las dMRI en la clínica. Ejemplos de campos de estudio donde la evaluación adecuada de la sustancia blanca es importante son el desarrollo anatómico del cerebro, la degeneración de fibras (como puede ser en enfermedades desmielinizantes) o en fenómenos de plasticidad cerebral.

Ahora bien, para concretar el objetivo del presente proyecto realizó un estudio que permitiera la evaluación, por histología y por dMRI, de una región de cruce de fibras. La región seleccionada fue el quiasma óptico, en un modelo animal: la rata Wistar.

Para poder obtener información del tejido en sus estados sano y dañado la muestra fue sometida a una degeneración Walleriana (Waller, 1850) provocada ésta por isquemia retiniana unilateral (Adachi,1996; Song et al., 2003). Como consecuencia de la isquemia, el quiasma incluye axones degenerados provenientes de la retina afectada, que están mezclados a partes iguales con axones intactos provenientes de la retina sana.

A partir de los resultados de la evaluación por dMRI se obtuvieron datos cuantitativos de las regiones de cruce de fibras por medio del modelo de Deconvolución Esférica Restringida (CSD, por sus siglas en inglés.). En un segundo momento, se relacionaron los parámetros obtenidos con la información proporcionada por la histología.

II. MARCO TEÓRICO: INFERENCIA DE LA MICROESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA BLANCA A TRAVÉS DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA POR DIFUSIÓN

La difusión por resonancia magnética (dMRI por sus siglas en inglés) es una técnica no invasiva que nos permite la caracterización de la microestructura del tejido correspondiente al sistema nervioso central (SNC), usándose principalmente para la evaluación de la sustancia blanca.

En esta sección se describirán: a) algunas características generales de la sustancia blanca, b) el estudio de la sustancia blanca por medio de dMRI y c) algunos modelos matemáticos utilizados en dMRI, con la intención de brindar el marco necesario para la contextualización del presente proyecto.

2. 1. Morfología de la sustancia blanca

Las neuronas y la glía son los dos tipos de células en el SNC de los mamíferos. Las células gliales representan el 90% del total de células del SNC; las neuronas equivalen al 10% restante. Las neuronas se encuentran conformadas, en términos generales, por un soma o cuerpo de la neurona, axón y dendritas (Amaral y Strick, 2103: 340). Un esquema de la configuración básica de una neurona puede encontrarse en la fig. 1.

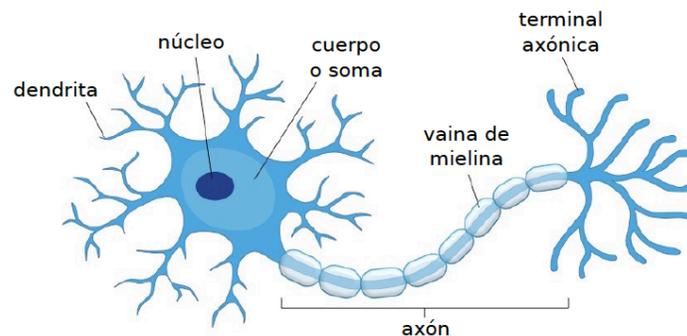


Figura 1. Estructura de una neurona.

Las neuronas son células excitables, es decir, que pueden responder a diferentes estímulos, cambiando su potencial eléctrico transmembranal. En general, las neuronas reciben información a través de sus dendritas, si bien no exclusivamente. Estas células además tienen la función de conducir impulsos nerviosos a través de sus axones. (Edgar & Griffiths, 2014).

Es común dividir la materia del SNC en sustancia blanca y sustancia gris (ver fig. 2). Los somas y las dendritas de las neuronas se encuentran principalmente en la sustancia gris, mientras que los axones en la sustancia blanca.

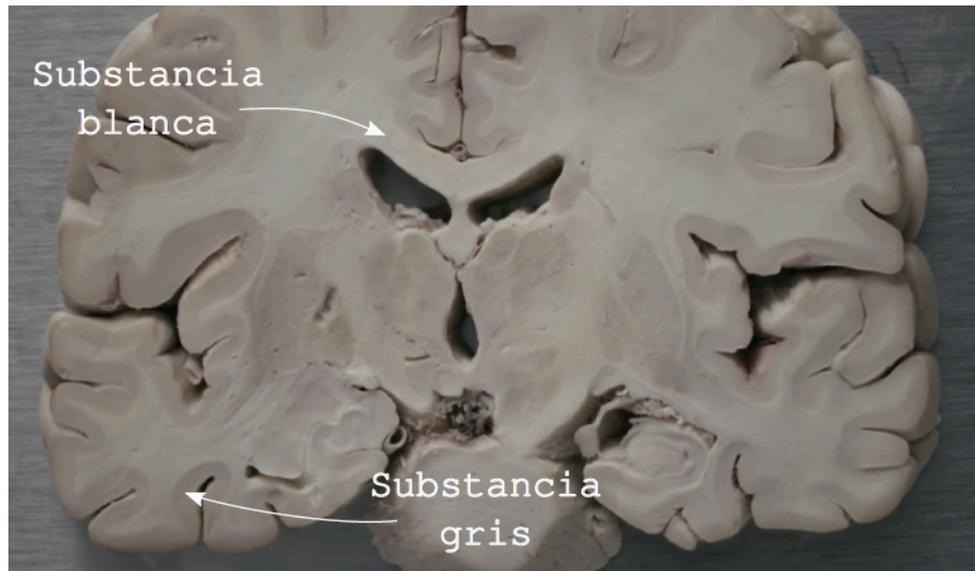


Figura 2. Corte coronal del cerebro humano. Se encuentra señalado el cuerpo calloso (sustancia blanca) y un giro de la corteza cerebral del lóbulo temporal (sustancia gris). Modificado de UBC Medicine, 2014.

Por lo general, los axones se originan a partir de una protuberancia del cuerpo celular llamada el cono axónico. En ocasiones también pueden tener su punto de inicio en la base de una dendrita. El diámetro de los axones puede oscilar entre 0.2 y 20 micras en el SNC (Kandel, Barres y Hudspeth, 2013: 22). Sin embargo, este diámetro es relativamente constante a lo largo del axón (Friede & Samorajski, 1970). La longitud del axón es altamente variable, y

dependiente del sitio al que proyecta, siendo algunos tan cortos como unas cuantas micras, y otros tan largos como un metro (Edgar & Griffiths, 2014).

En cuanto a su composición, en la parte interior del axón (axoplasma) encontramos principalmente retículo endoplásmico, mitocondrias, microtúbulos y neurofilamentos (Fawcett, 1994: 323). El axoplasma se encuentra cubierto por el axolema, la membrana del axón (fig. 3).

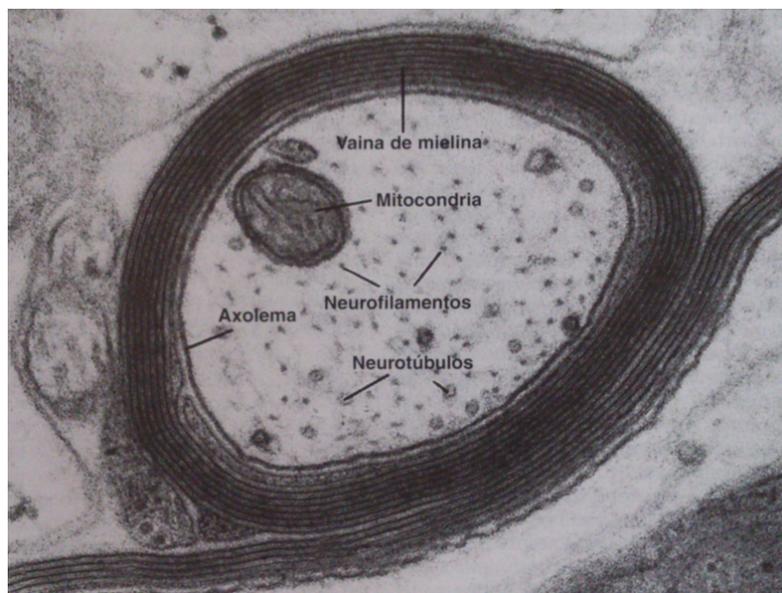


Figura 3. Imagen por microscopía electrónica de un axón cortado transversalmente. Tomado de Geneser, 2009.

Podemos clasificar a los axones en mielinizados y no mielinizados. Lo que diferencia a los primeros es el recubrimiento de sus membranas por capas de la vaina de mielina. Las capas de mielina son envolturas generadas por células gliales llamadas oligodendrocitos en el SNC, y células de Schwann en el sistema nervioso periférico. Las vainas de mielina son las que dan el color blanco característico de la sustancia blanca, su estructura promueve una mayor velocidad de conducción del potencial de acción, esto gracias a que modifican las propiedades biofísicas de los axones, incrementando la conducción eléctrica de 10 a 100 veces en un axón (Trapp & Kidd, 2004).

Por otra parte, las capas de mielina no forman un continuo sobre los

axones sino que se disponen en secciones de unas 200 a 1000 μm (Fawcett, 1994: 330). Estas regiones, llamadas internodos, se encuentran separadas por los nodos de Ranvier, los cuales tienen una extensión de 0.8 a 1.1 μm .

En los internodos, los oligodendrocitos envuelven a los axones alrededor de 160 veces (Hidebrand et al., 1993). Esta envoltura, da lugar propiamente a la vaina de mielina, de la cual podemos distinguir dos dominios en la mielina: compacta y no compacta (fig. 4). Es preciso anotar que las capas de mielina no forman parte del axón. De hecho, existe un espacio entre el axolema y las capas de mielina de unos 20 nm (Geneser, 2009: 333), llamado espacio periaxonal.

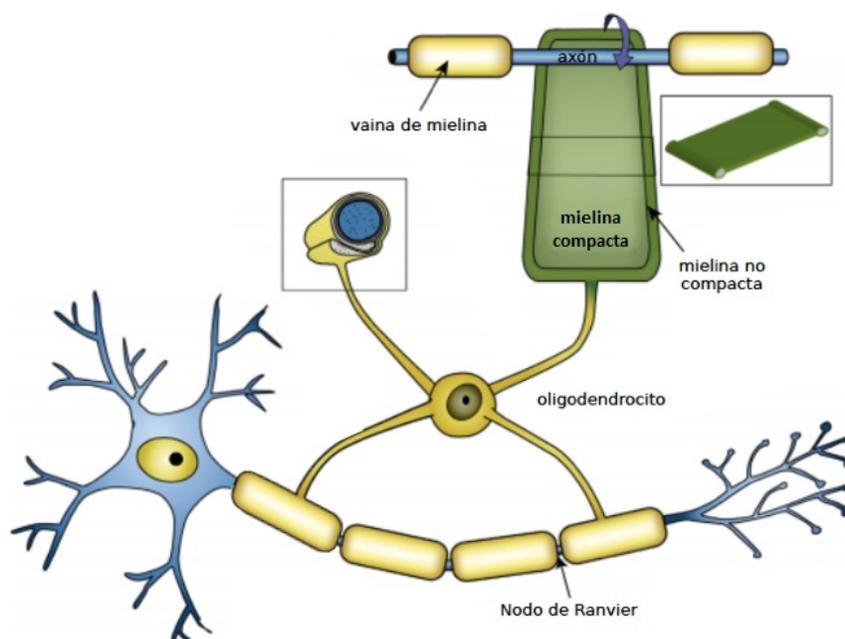


Figura 4. Vainas de mielina en el SNC. En el SNC, los oligodendrocitos son los encargados de envolver a los axones en las vainas de mielina. Podemos considerar dos tipos de mielina: compacta y no compacta, como se encuentra ilustrado en la parte superior de esta imagen. Modificado de Edgar & Griffiths, 2014.

La mielina se encuentra constituida en un 70% por lípidos (Morell, 1984), principalmente cerebrósidos (incluyendo ésteres de sulfato y sulfatidas),

fosfolípidos y esteroides (sobre todo colesterol). El restante peso de sólidos corresponde a proteínas. Aunque es posible encontrar una gran diversidad de proteínas en la mielina (Jahn et al., 2009), las más conocidas son: proteína proteolípica (PLP)/DM20, glicoproteína asociada a mielina (MAG), nucleótido cíclico fosfodiesterasa (CNP) y proteína básica de mielina (MBP).

2. 2. Evaluación de la sustancia blanca por medio de dMRI

La dMRI tiene su base en el fenómeno de difusión del agua, entendiendo por difusión el movimiento aleatorio que experimentan las moléculas a una temperatura superior a cero grados Kelvin. Si es un fenómeno de carácter aleatorio, entonces, ¿cómo caracterizarlo? Lo cierto es que no es posible caracterizar el movimiento de una molécula individualmente. Sin embargo, en 1905, Einstein probó que si se considera un número suficientemente grande de partículas, se puede determinar la distribución tridimensional de sus desplazamientos, a través de la fórmula:

$$r^2=6Dt$$

Siendo r la distribución de los desplazamientos al cuadrado. D el coeficiente de difusión del agua y t el tiempo. La representación gráfica de la distribución adquiere la forma de una gaussiana. (Johnes, 2014).

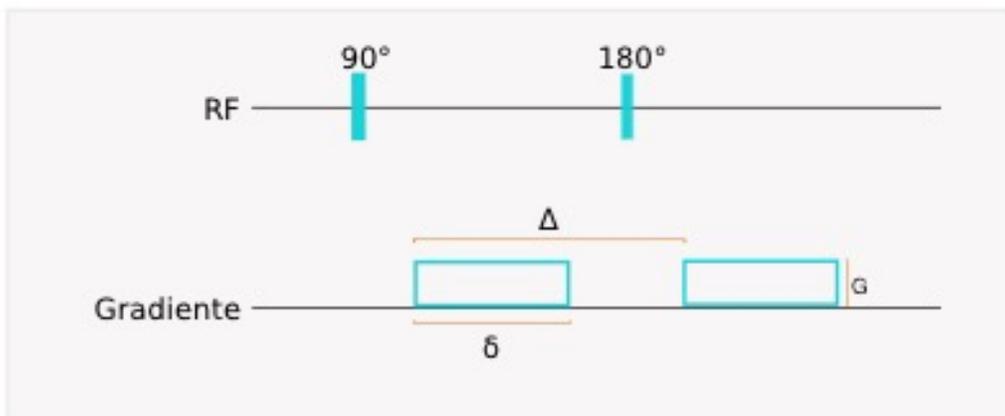
Lo anterior es cierto en el caso del agua en un medio que no presente barreras. Lo cual no es la condición en un tejido biológico, incluyendo el cerebro, donde el movimiento del agua se ve restringido por su intrincada arquitectura. En estas circunstancias, si bien no es posible determinar *a priori* el coeficiente de difusión, es posible inferirlo con base en los otros dos elementos de la fórmula: la distribución de los desplazamientos y el tiempo. Este coeficiente de difusión obtenido indirectamente es conocido como el coeficiente aparente de difusión (ADC, por sus siglas en inglés). (Johnes, 2014).

La dMRI nos permite determinar el ADC con base en el desfaseamiento de los spins de los protones de hidrógeno. Las moléculas afectadas por el campo magnético principal se encuentran precesando a determinada frecuencia (ω_0). Sin embargo, la aplicación de un gradiente magnético

(modulación espacial, lineal, del campo magnético) por cierto tiempo, origina un cambio de la frecuencia de precesión que depende del punto en el espacio donde se encuentren los spins, y en consecuencia un desfaseamiento entre ellos. En un eco de spin, este desfaseamiento se vería corregido por el segundo pulso de radiofrecuencia de 180° . De tal modo que el cambio neto de fase sería nulo. Esto es verdadero para spins que no han cambiado de posición (Johnes, 2014).

En el caso de los spins en movimiento, como los presentes en las moléculas de agua en un tejido biológico, un pulso de 180° no implicaría un refasamiento, pues los spins se han movido de su posición inicial. Entonces, si los spins se han movido tendrán un cambio de fase neto a diferencia de los spins cuya posición casi no ha variado; a mayor desplazamiento, mayor desfaseamiento y más pérdida de señal.

Para que nuestra secuencia de pulsos sea sensible al fenómeno de difusión, basta precisamente con agregar a un eco de spin, de acuerdo con lo propuesto por Stejskal y Tanner (1965), dos gradientes idénticos en amplitud y duración, gradientes codificadores de difusión, bajo el siguiente esquema:



El nivel de dispersión de las fases se verá determinado por la constante giromagnética del hidrógeno (γ) la magnitud del gradiente (G), su duración (δ) y el intervalo que va desde el inicio de la aplicación del primer gradiente al inicio de la aplicación del segundo (Δ). Los anteriores elementos dan cuenta del grado de sensibilidad de nuestras imágenes a la difusión, expresado a través

del valor b , con unidades de s/m^2 :

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right)$$

La relevancia del valor b recae en que es nuestro punto de unión entre la señal obtenida a través de dMRI y el ADC. Es posible expresar la relación del siguiente modo:

$$\frac{I_2}{I_1} = e^{-b \text{ ADC}}$$

I_1 e I_2 representan mediciones de intensidad de la señal con un valor b distinto, siendo $I_1 < I_2$. Con estos datos, y siempre que la diferencia de valores b sea conocida (generalmente I_1 es $b=0 \text{ s/m}^2$, es decir, una imagen no sensible a difusión), podemos determinar el ADC en cada uno de los voxeles de nuestra imagen de difusión.

Ahora bien, la intensidad de cada uno de nuestros voxeles es representativa de los elementos en ese espacio. Distintos elementos nos darán distintas intensidades, y en consecuencia nuestro ADC será diferente. El ADC, por otra parte, no sólo se ve influenciado por los elementos presentes en nuestra muestra, sino también por la dirección en la cual estamos haciendo la medición.

Los gradientes codificadores de difusión, que hemos mencionado con anterioridad, nos permiten determinar la difusión en una dirección en específico. A manera de ejemplo, si suponemos un tejido cuya estructura permite que las moléculas se muevan con rapidez en una sola dirección, pero no en otra, entonces nuestra medición coincidirá con el desplazamiento del agua, y tendremos poca señal y valores altos de ADC. Sin embargo, si en este mismo caso, hacemos una medición en una dirección perpendicular al desplazamiento preferencial del agua, tendremos más señal, pues habría menor movimiento relativo y valores bajos de ADC. En este caso se dice que la dirección es anisotrópica (no es idéntica en todas direcciones).

También, puede darse el caso que hacemos las dos mediciones

mencionadas con anterioridad y tener valores altos de ADC en ambos escenarios. Supongamos que hacemos más mediciones en otras direcciones y el resultado es el mismo. En este caso hablamos de difusión isotrópica, la cual indica que el agua se mueva sin una dirección preferencial.

En tejidos cuya arquitectura es coherente, el agua difunde anisotrópicamente. Por ejemplo, la difusión del agua a lo largo de fibras de sustancia blanca como el cuerpo calloso sería marcadamente anisotrópica, pues en este escenario el agua no puede difundir en todas las direcciones, sino que se mueve en dirección paralela a las fibras, lo que deriva en una mayor anisotropía. Las membranas de los axones y las capas de mielina, ordenadas con alta coherencia espacial, ofrecen barreras a la difusión del agua en sentido perpendicular a la longitud de los axones.

Consecuentemente, cambios en la microestructura darán como resultado cambios en la difusión del agua. Por ejemplo, la pérdida de mielina, como es el caso de ciertas enfermedades desmielinizantes (e.g. esclerosis múltiple), puede dar como resultado que un medio anisotrópico obtenga un cierto nivel de isotropía.

A través de las imágenes sensibles a difusión (DWI, por sus siglas en inglés), y con la ayuda de ciertos modelos matemáticos, es posible identificar estos cambios. Para el presente estudio es importante mencionar que la resonancia magnética, en el contexto de la isquemia retiniana, permite diferenciar cambios en diversas etapas del proceso de degeneración Walleriana. Al respecto, se han realizado estudios (Song et al., 2003) que siguen evalúan la degeneración Walleriana por medio de resonancia magnética, con ayuda de un modelo matemático llamado modelo del tensor, el cual describimos a continuación.

2. 3. Evaluación del estado de la sustancia blanca a través del modelo del tensor

Las DWI no nos dan información sobre el tejido de nuestro interés de manera inmediata, sino que es necesario un modelo matemático como

intermediario. Estos *modelos locales* (Rifert, 2014) nos permiten crear mapas con los cuales podemos extraer información cuantitativa por unidad de volumen (voxel). Uno de los modelos que ha sido más utilizado en el campo de la investigación es el *modelo del tensor*.

El *modelo del tensor* nos ayuda a caracterizar los desplazamientos del agua a través de una matriz de números 3 x 3 (Jones, 2014),

$$\mathbf{D} = \begin{bmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{xy} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{xz} & D_{yz} & D_{zz} \end{bmatrix}$$

Los valores de los elementos D_{xx} , D_{yy} y D_{zz} nos dan cuenta del movimiento del agua en los ejes ortogonales respectivos. Por ejemplo, el valor que puede ocupar el espacio de D_{xx} nos indica la cantidad de movimiento de moléculas de agua existente sobre el eje de las equis. Es decir, el coeficiente de difusión sobre ese eje). Los elementos fuera de esta diagonal, como D_{xy} , dan cuenta de las correlaciones entre los desplazamientos dados entre los ejes indicados en los subíndices. Es decir, si por cada aumento en el desplazamiento sobre el eje x, tuviéramos el mismo aumento en el eje y, entonces el valor de D_{xy} sería alto, en caso contrario este valor tendería a cero, o bien pudiera ser un valor negativo (en caso de una relación inversamente proporcional entre x y y).

El modelo del tensor puede ser visualizado como una elipse, la cual nos indica el movimiento preferencial del agua. Esta elipse puede ser descrita a través de sus tres vectores propios y los valores propios correspondientes (λ_1 , λ_2 y λ_3 , mostrados en la fig. 5).

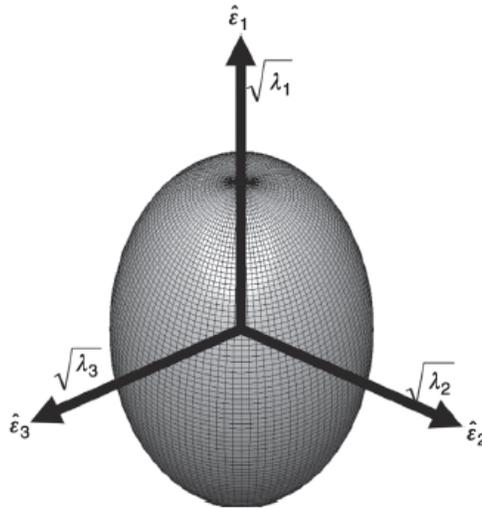


Figura 5. Representación esquemática del modelo del tensor. Tomado de Jones (2014: 93).

Ahora bien, el modelo del tensor nos permite obtener una serie de parámetros que nos arrojan información de cada voxel de las dMRI, una vez que hemos transformado las imágenes en mapas cuantitativos. Específicamente, dos métricas han sido bastante utilizadas en diversas investigaciones: la fracción de anisotropía (FA; Jones, 2014: 95) y la anisotropía relativa (RA; Basser and Pierpaoli, 1996). Matemáticamente:

$$FA = \sqrt{\frac{3}{2}} \frac{\sqrt{(\lambda_1 - \langle \lambda \rangle)^2 + (\lambda_2 - \langle \lambda \rangle)^2 + (\lambda_3 - \langle \lambda \rangle)^2}}{\sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}$$

$$RA = \sqrt{\frac{1}{3}} \frac{\sqrt{(\lambda_1 - \langle \lambda \rangle)^2 + (\lambda_2 - \langle \lambda \rangle)^2 + (\lambda_3 - \langle \lambda \rangle)^2}}{\langle \lambda \rangle}$$

donde las lambdas son los valores propios mencionados con anterioridad. La FA nos está hablando de que tan anisotrópica es la difusión en cierto voxel. La RA es un valor que equivale a la difusividad promedio. Ambas métricas son valores normalizados que van de cero a uno. Entre ellas, la FA ha sido más ampliamente utilizada y será empleada en este trabajo.

Por otra parte, si bien el modelo de tensor ha sido de gran utilidad en el

campo de la investigación, tiene una gran desventaja, pues no nos da información confiable en configuraciones de sustancia blanca complejas, como las regiones de cruce de fibras (Alexander et al., 2001; Tuch et al., 2002b). La fig. 6 muestra codificadas en color el número de poblaciones de fibras que cohabitan en cada voxel de las imágenes; el modelo del tensor sólo sería útil en las regiones mostradas en color rojo, que corresponden a voxeles con una única población de fibras, y es evidente que son la minoría en el cerebro humano (~10%), que contiene un gran número de voxeles con arquitectura compleja. Por tanto, resulta necesario recurrir a otros modelos a partir de los cuales sea posible extraer métricas que se correlacionen más con la anatomía real de nuestra muestra.

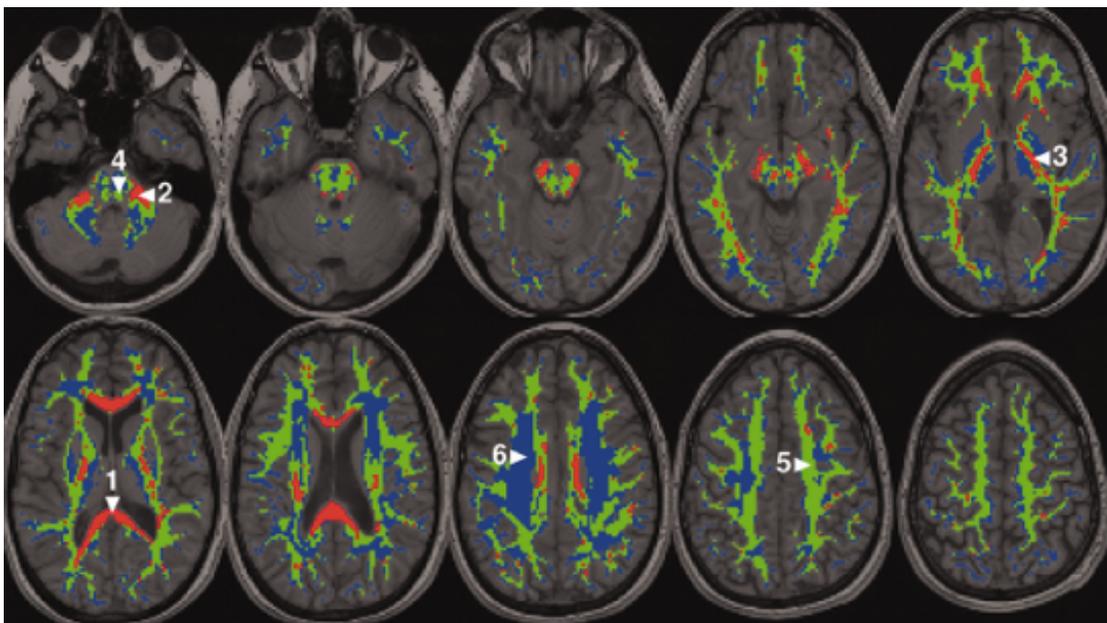


Figura 6. Número de poblaciones de fibras en el cerebro humano (rojo: 1; verde: 2; azul: >3). Los números corresponden a las siguientes estructuras: 1) cuerpo calloso (CC); 2) pedúnculo cerebeloso medio; 3) brazo posterior de la cápsula interna; 4) puente/vías motoras; 5) fascículo longitudinal superior (FLS) /corona radiata, y 6) corona radiata/FLS/CC. Tomado de Jeurissen et al., 2013).

2. 4. Alternativas al modelo del tensor

Actualmente, existen varios modelos que intentan superar las limitaciones del modelo del tensor respecto de la obtención de información en regiones de cruce de fibras: AxCaliber, CSD, NODDI, QBALL Imaging, modelos multi-tensor, entre otros. Sin embargo, el grueso de los modelos que tratan de superar al modelo del tensor tienen una gran desventaja en comparación con éste, pues la adquisición y el análisis de imágenes presentan altos requerimientos (Wheeler-Kingshott et al., 2003). En esto, el llamado modelo de la deconvolución esférica restringida (CSD, Constrained Spherical Deconvolution) tiene una ventaja, pues en lo que compete a la adquisición de imágenes, sus requerimientos resultan similares a los del modelo del tensor.

CSD permite definir la distribución de la orientación de las fibras (FOD, *Fiber Orientation Distribution*) presentes en un voxel. Las configuraciones de fibras posibles en un voxel las podemos clasificar en fibras paralelas, en abanico, con doblez y cruce de fibras (ver fig 7). Mientras que el modelo del tensor sólo puede resolver fielmente fibras paralelas, el modelo CSD puede resolver otras configuraciones de fibras, aunque no distingue adecuadamente fibras en abanico o con doblez.

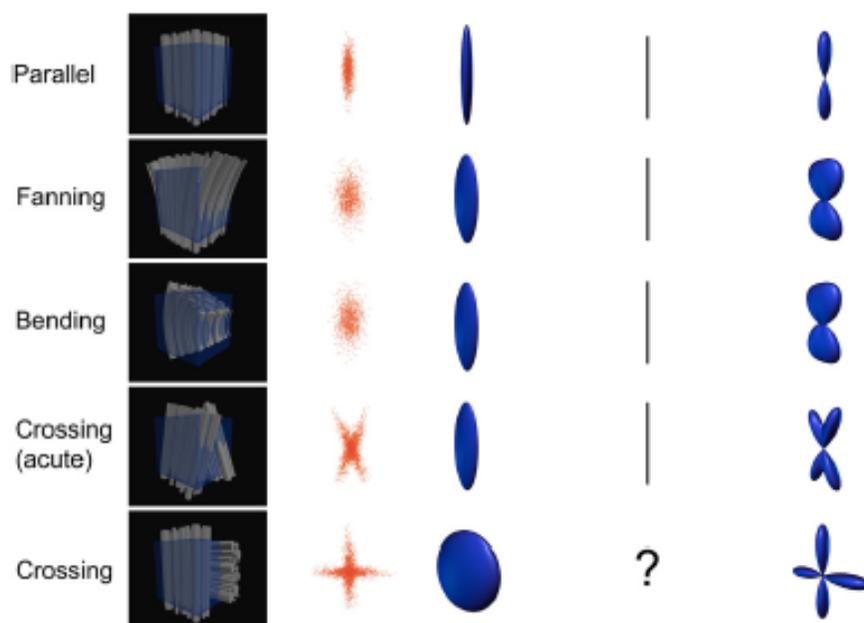


Figura 7. Evaluación de fibras a partir de la señal de resonancia magnética. En la primera columna encontramos imágenes representativas de las distintas poblaciones de fibras. La siguiente columna ilustra la probabilidad de distribución del desplazamiento de las moléculas de agua en un voxel. En la tercer columna tenemos la representación gráfica del modelo del tensor para las distintas configuraciones de fibras. La cuarta columna nos indica la difusión principal de las moléculas de agua. La última columna nos muestra la representación gráfica de las FOD (Seunarine & Alexander, 2014).

CSD trabaja a través de la deconvolución de la señal derivada de las DWI. La deconvolución es un proceso que implica determinar previamente el comportamiento de la señal en voxeles donde existen fibras orientadas en una sola dirección (determinación de la *función de respuesta*). Esta *función de respuesta* (fig. 8) nos sirve de referencia para evaluar la señal en voxeles donde la configuración de las fibras es más compleja, como en regiones donde cruzan dos fibras. En estos casos se asume que la señal resultante no es sino la suma de las señales “simples”, es decir, de las señales obtenidas a partir de las distintas orientaciones de nuestros gradientes (Tournier et al., 2004).

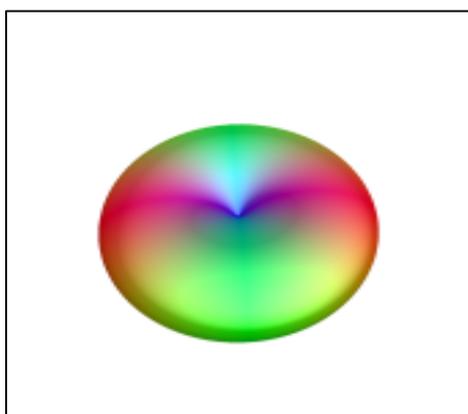


Figura 8. Representación gráfica de la función de respuesta. Al ser la representación de la señal correspondiente a fibras que corren en una sola dirección, la función de respuesta tiene la forma de un disco con una hendidura al centro. La hendidura representa el eje en el cual están orientadas las fibras, pues a mayor movimiento, menor señal. Valores más altos en la función, como los de los costados, indican poco movimiento de moléculas de agua.

Una vez determinada la función de respuesta es posible estimar la

orientación de las fibras en todos nuestros voxels (podemos apreciar resultados de la estimación de las FOD en la fig. 9. La representación gráfica de esto es a través de *glifos* o lóbulos (Tournier, Calamante & Connelly, 2004), los cuales podemos apreciar en la fig. 10)

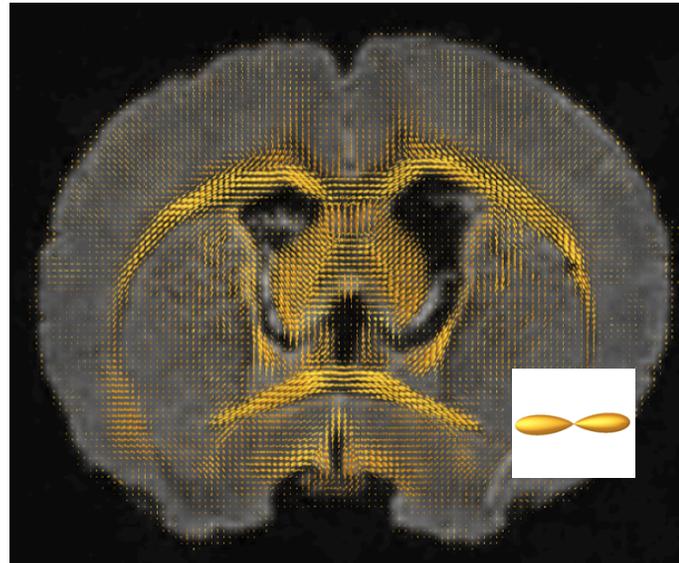


Figura 9. Representación gráfica de la orientación de las fibras desde una vista axial del cerebro de rata Wistar. En esta imagen se puede distinguir claramente el cuerpo calloso en el que encontramos voxels con una sola población de fibras, como en el ejemplo que encontramos en la esquina inferior derecha.

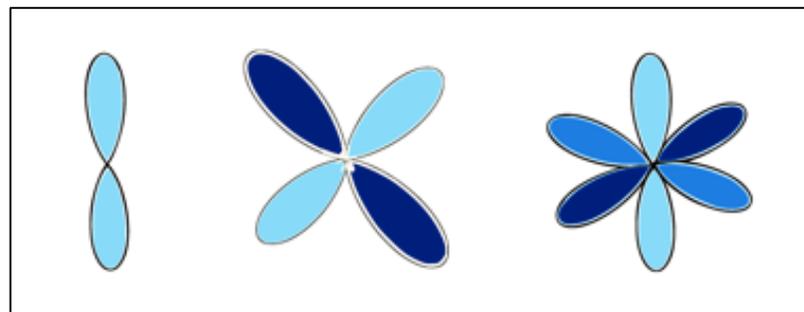


Figura 10. Representaciones de manojos de fibras por medio de lóbulos. En la imagen de la izquierda tenemos la representación gráfica de un lóbulo que podríamos encontrar en un voxel donde potencialmente sólo corren un grupo de fibras. En la imagen del medio tenemos una representación gráfica del probable cruce de dos grupos de fibras. CSD nos permite estimar configuraciones más complejas, como en la imagen de la derecha, donde se puede apreciar la contribución de tres posibles grupos de fibras.

Una vez que se ha realizado la estimación de las FOD es posible realizar mediciones que nos ayuden a estimar el estado de las poblaciones de fibras presentes en los voxels de nuestro interés, análogas a métricas como la FA del modelo del tensor. Esto es posible realizarlo a partir de las propiedades geométricas de las FOD. Sin embargo, a diferencia de las métricas que pudiéramos obtener con modelos en los que no se puede diferenciar la existencia de más de una fibra en un voxel, como el modelo del tensor; los parámetros que podemos obtener con CSD permiten obtener información de las distintas fibras presentes en un voxel. A las distintas poblaciones de fibras presentes en un voxel se les conoce como *fixeles*. El fixel hace referencia a un sólo conjunto de fibras de un voxel en específico (Tournier et al., 2011). Por ejemplo, en la figura 11 tenemos un voxel en el cual están presentes dos fixeles.

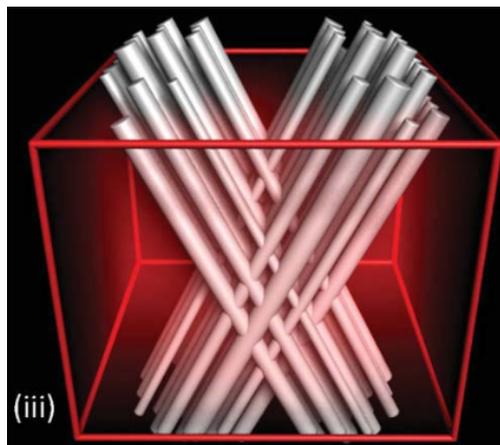


Figura 11. Representación gráfica de dos fixeles correspondientes a dos poblaciones de fibras distintas en un voxel. Tomado de Tournier et al., 2011.

Ahora bien, las métricas por fixel que nos permiten estimar CSD son: la densidad aparente de las fibras (AFD, *apparent fibre density*), el pico máximo (PEAK) y la dispersión (Riffert et al., 2014). La AFD es un valor que se obtiene a partir de la integral del lóbulo. En otras palabras, la AFD representa el volumen del lóbulo. Si pensamos en un voxel en el que existiera un cruce de fibras y una de las dos poblaciones de fibras estuviera dañada por algún

motivo, esperaríamos que el valor de AFD de la población sana fuera mayor, en tanto la densidad de fibras es más alta, respecto de la población dañada. El PEAK es una métrica que nos da información acerca de la amplitud del lóbulo. Dicho de otro modo, es el valor correspondiente a línea más larga que podemos trazar en un lóbulo dado (fig. 12). La dispersión es una medida de la proporción entre la integral del lóbulo y la amplitud del PEAK. Esta métrica, como su nombre lo indica, nos habla de la dispersión de las posibles fibras presentes en un voxel dado. Así, lóbulos largos y angostos nos darán valores de dispersión bajos.

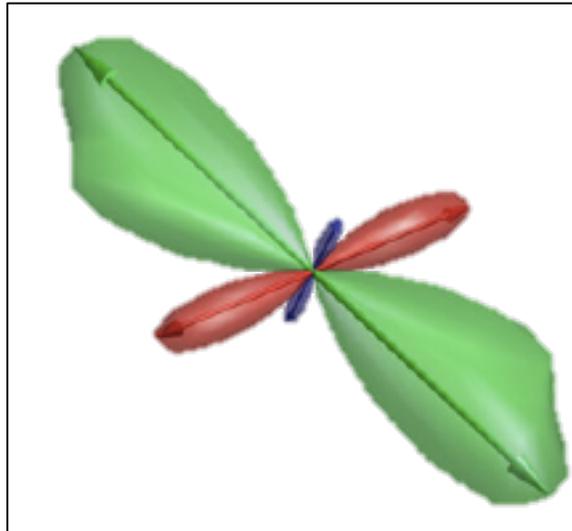


Figura 12. PEAK de un lóbulo. El PEAK de cada lóbulo está representado por una línea que va de un extremo del lóbulo hacia el otro.

CSD también brinda la oportunidad de obtener métricas por voxel, derivadas de los datos de los fixeles. Una de estas es “complejidad”, (Riffert, et al., 2014) el cual es un valor normalizado que nos otorga información resultante de la comparación entre la AFD de los fixeles presentes en un voxel. Si sólo hay un fixel presente en un voxel este valor será de cero. En el caso de que haya más de un fixel en un voxel y los fixeles presenten simetría este valor tenderá a uno.

Anotamos específicamente esos parámetros pues con ayuda de ellos

podemos obtener información relacionada con el cruce de fibras. Sin embargo, hasta el momento no hay ningún estudio que haya corroborado que los datos arrojados por el modelo CSD a nivel de fixeles correspondan con cambios histológicos. En efecto, sin una evaluación de CSD que implique su confirmación en el correlato biológico, la información que podamos derivar de este modelo seguirá provocando incógnitas con respecto de su certeza.

III. JUSTIFICACIÓN

3.1. Planteamiento del problema

Los parámetros obtenidos a través de dMRI permiten la evaluación cuantitativa de las regiones de interés. Sobre esta línea, una de las herramientas más utilizadas para dicha evaluación ha sido el modelo del tensor. Sin embargo, el modelo no nos otorga información confiable en regiones de cruce de fibras (Frank, 2002). En la actualidad diversos modelos matemáticos tratan de superar ésta y otras limitaciones del modelo del tensor. No obstante, no tenemos información sobre la certeza de estos modelos dado que carecen de validación histológica. Resulta por lo tanto necesario trazar un puente entre ellos y sus correlatos biológicos.

El presente proyecto pretende contribuir a una parte de la solución de este problema. En específico, nos interesa la cuantificación de regiones de cruce de fibras en áreas de degeneración axonal, para el establecimiento de marcadores biológicos por medio de los análisis derivados de dMRI. El modelo matemático elegido es CSD, porque es un modelo que puede ayudarnos a obtener información en regiones de cruce de fibras, además de que los requisitos para la adquisición de imágenes son similares a los del modelo del tensor, a diferencia de otros modelos cuyos requerimientos son bastante elevados (Wheeler-Kingshott et al., 2003). La forma de correlacionar los parámetros derivados de CSD con el substrato biológico será a partir de la información derivada de la histología.

3.2. Relevancia

La dMRI tiene una extensa aplicación tanto a nivel clínico como en el área de la investigación para la evaluación de la sustancia blanca. Algunas aplicaciones clínicas pueden ser la determinación del desarrollo humano normal, o como apoyo en el diagnóstico de diversas enfermedades, por ejemplo, para la esclerosis múltiple. En el área de la investigación, sus aplicaciones también son muy diversas. Así, Huang y colaboradores (2015),

utilizan la dMRI para la evaluación de redes estructurales durante la infancia y la adolescencia. Otra aplicación de esta técnica se relaciona con el estudio de enfermedades desmielinizantes (e.g. esclerosis múltiple).

Sin embargo, como se ha mencionado el 90% de los voxels de una imagen sensible a difusión presenta cruce de fibras, y hasta el momento no hay información sobre la relación de los parámetros obtenidos por medio de los análisis generados a partir de dichas imágenes y el substrato biológico. Por tanto, resulta de gran importancia el desarrollo de un modelo que haga un puente entre estas dos áreas, al correlacionar de los parámetros derivados de los modelos matemáticos y la información directa que nos brinda la histología.

El presente proyecto tiene como intención brindar información sobre la aplicabilidad de la dMRI en regiones de cruce de fibras, a través de la caracterización de marcadores biológicos derivados de la correlación de parámetros obtenidos por medio de CSD con los datos histológicos. Esto podría representar un punto de referencia importante para futuras investigaciones que utilicen dMRI para la evaluación de sustancia blanca, como las mencionadas en líneas anteriores, y una referencia crucial para realizar interpretaciones acertadas sobre estos métodos en la clínica. También se considera que esto representaría un aporte significativo para la qMRI, al definir la cantidad de información histológica que puede arrojar uno de los modelos matemáticos disponibles para evaluación de regiones de cruce de fibras.

3. 3. Objetivos

Objetivo general

- Inferir características microestructurales de la sustancia blanca en regiones de cruce de fibras por medio de dMRI en un modelo de degeneración axonal.

Objetivos específicos

- Generar imágenes sensibles a difusión de la muestra seleccionada por

medio del resonador de 7 Teslas.

- Analizar las imágenes sensibles a difusión con el modelo de deconvolución esférica restringida, obteniendo métricas de las fibras correspondientes a la vía óptica.
- Correlacionar parámetros derivados de la histología con las métricas obtenidas a partir del modelo de deconvolución esférica restringida.

IV. MÉTODOS

En el presente estudio, se utilizó un modelo animal de degeneración axonal secundario a un proceso de isquemia retiniana (Adachi et al., 1996; Song et al., 2003), el cual permite la correlación de métricas derivadas del análisis a partir de modelos matemáticos con la información proporcionada por la histología. En las siguientes líneas se encuentran los detalles del procedimiento seguido, incluyendo la preparación de la muestra, el análisis por resonancia magnética, el análisis histológico, así como el análisis estadístico correspondiente.

4. 1. Regiones de interés

La degeneración de los axones de las neuronas ganglionares presentes en la retina puede extenderse a una región en la que las fibras de las retinas de ambos ojos decusan: el quiasma óptico. Esta región es ideal para probar la efectividad de un modelo para evaluar sitios de cruce axonal, pues en el quiasma existen dos poblaciones de fibras perfectamente definidas que pueden ser manipuladas. Mientras que en humanos el 50% de los axones provenientes de cada ojo cruzan la línea media, en roedores decusa más del 90% de ellos a nivel del quiasma (Jeffery & Erskine, 2005).

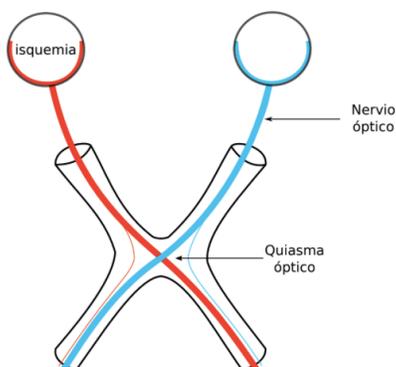


Figura 13. Representación esquemática de las regiones de interés.

Además del quiasma óptico se hizo una evaluación del nervio óptico (fig. 13), lesionado y no lesionado, pues de esta forma teníamos información del desempeño de CSD en regiones sin cruce de fibras, en las cuales el modelo del tensor ya ha probado su efectividad (Song et al., 2003).

4. 2. Preparación de la muestra

El grupo experimental fue sometido a isquemia retiniana con la intención de inducir degeneración Walleriana¹ a nivel del quiasma óptico. Para ello se realizó la canulación de la cámara anterior de un ojo y se inyectó solución salina para elevar la presión intraocular a 120 mmHg durante 120 min, siguiendo los procedimientos desarrollados por Adachi et al. (1996). El blanqueamiento del segmento anterior del ojo indica que aparentemente la isquemia ha sido desarrollada con éxito, como se puede apreciar en la fig. 14.

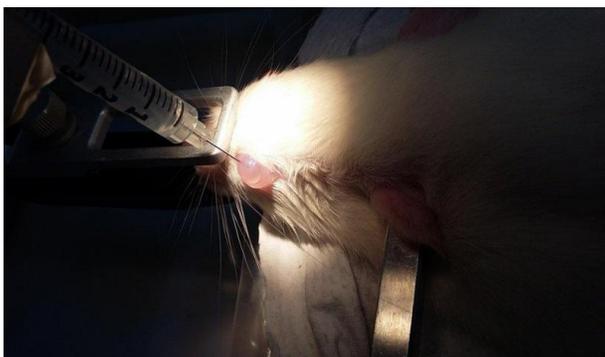


Figura 14. Procedimiento de isquemia retiniana por canulación de la cámara anterior en rata Wistar.

¹ En el proceso de degeneración Walleriana muchos axones se encuentran dañados desde las 6 horas y algunas vainas de mielina ya están completamente degeneradas en ese momento (Turner & Glaze, 1977). A las 48 h este proceso será extensivo para gran parte de los axones y vainas de mielina. Sin embargo, otras neuronas presentes en la retina no morirán sino hasta 48-72 h después del proceso de isquemia (Adachi et al., 1976), lo cual retarda el proceso de degeneración.

Con base en el procedimiento descrito se preparó una muestra de 15 sujetos (ratas Wistar adultas, peso entre 250 y 320 g). Diez de los animales fueron parte del grupo experimental y cuatro del grupo control. El animal restante fue sometido al proceso de isquemia, pero ni la histología ni la resonancia reflejó menor cantidad axonal y se considera que el proceso no se realizó adecuadamente, probablemente derivado de condiciones de presión intraocular insuficientes para inducir la isquemia. Por lo tanto este animal fue incluido en el grupo control.

Después de cinco semanas de haber inducido el procedimiento de isquemia (condición crónica de isquemia). los animales fueron sacrificados y fijados por perfusión (usando PFA 4%, glutaraldehído 2% y Gadolinio 0.002 mmol).

4. 3. Análisis histológico

A la par del análisis de datos, se procesaron los cerebros para su histología, utilizando una tinción de azul de toluidina (fig. 15). A partir de esta preparación, se obtuvieron cortes semi-finos ($1\mu\text{m}$) al nivel de los nervios y el quiasma. Posteriormente, se generaron micrografías por microscopia de luz con magnificación de 20X y 100X (fig. 21). La muestra de micrografías es de 10 campos por estructura (nervio izquierdo, nervio derecho y quiasma) de cada sujeto.

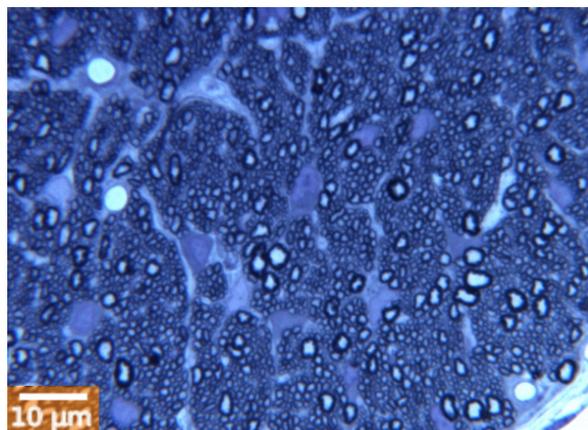


Figura 15. Micrografía de un nervio óptico. Cortesía del Dr. Larriva-Sahd (Instituto de Neurobiología, UNAM).

Posteriormente, se realizó el análisis de las micrograffías con ayuda del software axonseg (Zaimi et al., 2016). Este software realiza una segmentación axonal ofreciendo como salidas principales: área de mielina, área axonal, diámetro axonal, diámetro de la fibra mielinizada, grosor de mielina y la razón g (definida como la razón entre el diámetro interior y el diámetro exterior de la vaina de mielina, fig.16).

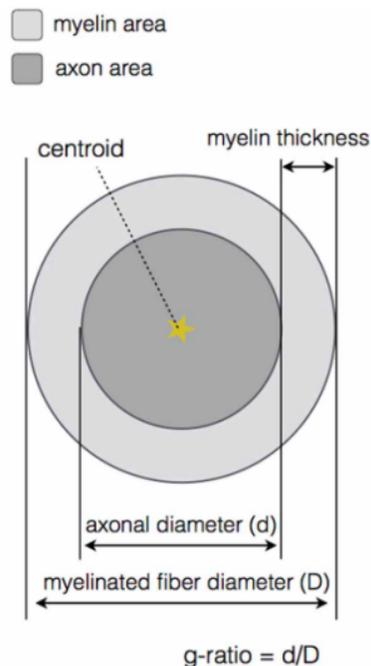


Figura 16. Principales propiedades morfológicas estimadas por Axonseg. Tomado de Zaimi et al., 2016.

Por otra parte, Axonseg también permite calcular las fracciones por volumen asociadas a mielina y axones en la imagen. En otras palabras, considerando que las imágenes tienen unas dimensiones de 1388 x 1040 píxeles, Axonseg nos permite determinar la proporción de píxeles correspondientes a mielina y axones.

4. 4. Análisis MRI

Para la adquisición de las imágenes se utilizó una secuencia de resonancia magnética por difusión. La adquisición fue *ex vivo*, lo que permitió

tener imágenes con una gran calidad, es decir con una alta alta resolución (125 μm) y una gran cantidad de difusiones de dirección (160). Gracias al acortamiento del fenómeno de relajación longitudinal T1 inducido por el Gadolinio, el tiempo de repetición de la imagen (TR) se pudo acortar a 250 ms, con lo que se aceleró la adquisición de imágenes en un orden de magnitud. Dada la alta resolución y el gran número de imágenes requeridas para el estudio, cada una de las adquisiciones fue de 14 h. Posteriormente se hizo un preprocesamiento de las imágenes de acuerdo a las necesidades de las DWI; el cual consistió en disminución de ruido, corrección de movimiento, eliminación de *corrientes eddy* y homogenización de las diferencias de intensidad en las imágenes. Por último, se procesaron las imágenes, ajustando el modelo de CSD con ayuda de la suite de comandos de MRtrix 3² (Brain Research Institute, Melbourne, Australia). A continuación, se detallan los pasos aquí mencionados.

4. 4. 1. Adquisición de las imágenes

La adquisición de las DWI de la muestra *ex vivo* se realizó con un resonador 7 T Bruker Pharmascan 70/16 con un gradiente máximo de 720 mT/m, utilizando una antena de superficie con arreglo 2x2. La muestra se introdujo al resonador en un recipiente con perfluoropoliéter, un aceite sin hidrógeno que por tanto no presenta señal y que tiene un índice de susceptibilidad magnética igual al tejido, con lo que se minimizan artefactos de imagen. Las DWI fueron adquiridas por medio de imágenes ecoplanares segmentadas 3D. La resolución de las DWI es de 125x125x125 μm^3 . Se obtuvieron dos grupos de imágenes (*shells*) con valores b de 2000 y 2500 s/mm^2 , cada uno con 80 direcciones, así como 20 imágenes no sensibles a difusión (b=0 s/mm^2).

² Sitio web: www.mrtrix.org

4. 4. 2. Preprocesamiento y procesamiento de imágenes

Las imágenes requieren de un procesamiento anterior al ajuste de un modelo, conocido como *preprocesamiento* (fig. 17). Este nos permite hacer correcciones de artefactos derivados de la adquisición: ruido, movimiento e inhomogeneidades de intensidad. Este proceso puede variar de acuerdo de acuerdo con las necesidades del modelo matemático usado para el análisis de las DWI. En este caso, se ha realizado un *preprocesamiento* para ajustar adecuadamente CSD a nuestras DWI.

El primer paso que se realizó fue transformar las imágenes obtenidas directamente del resonador al formato .mif que es compatible con la suite de comandos de MRtrix, con base en la cual se hizo la mayor parte del procesamiento de los datos.

Debido al ruido presente en las DWI, las imágenes fueron sometidas al procedimiento de *denoising* (Veraart et al, 2016a; 2016b). Aunque la adquisición es *ex vivo*, existe movimiento entre las imágenes correspondientes a diferentes direcciones. Esto se debe a la vibración durante la adquisición de las imágenes y la modificación del campo magnético (fenómeno esperado en todo resonador) a lo largo de la misma. Para la corrección del movimiento se utilizó el comando *eddy_correct* (parte de la suite de comandos de FSL³). Este comando también ayuda a corregir distorsiones debidas a las *corrientes eddy*, que son inducidas por los gradientes durante el cambio entre una dirección y otra. Por último, se corrigieron las inhomogeneidades de intensidad presentes en las DWI, las cuales fueron ocasionadas por utilizar una antena de superficie (seleccionada a pesar de esta inhomogeneidad porque brinda mejor relación señal/ruido que antenas de volumen). Las correcciones de estas

³ Sitio web: <https://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/>

inhomogeneidades se llevaron a cabo con la ayuda del comando *N4biasfieldcorrection* de ANTS (advanced normalization tools)⁴.

Posteriormente, se obtuvo una máscara del cerebro, para realizar los análisis sólo en la región de interés. Esto se hizo de manera semiautomática. Primero se extrajo una máscara con el comando *bet* (parte de la suite de comandos de FSL), y luego se hizo una corrección manual de la máscara. Antes de ello se hicieron pruebas con el comando *dwi2denoise* (parte de MRtrix), pero no se obtuvieron resultados adecuados. Las herramientas para tener una máscara del cerebro están enfocadas a humanos y esto dificulta tener resultados adecuados con animales.

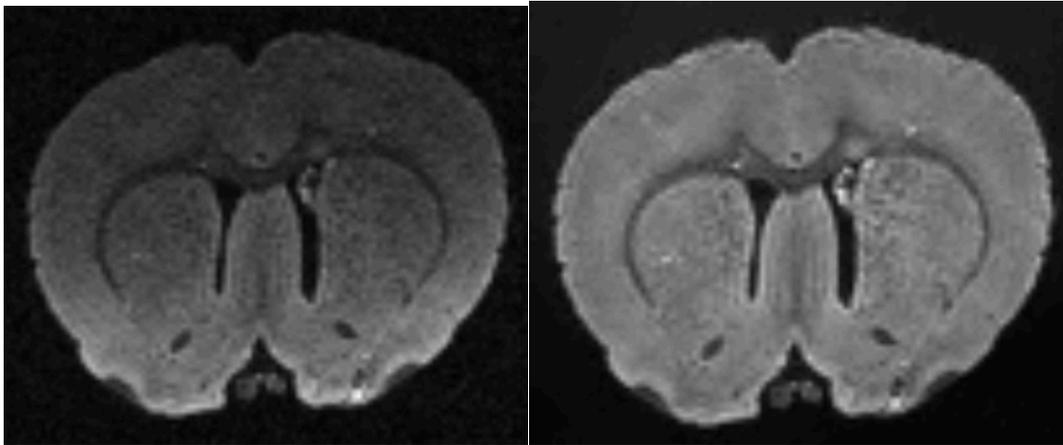


Figura 17. Imagen sensible a difusión antes (izquierda) y después de preprocesamiento. Se puede observar que en la imagen de la derecha hay menor ruido y también las inhomogeneidades de intensidad se ven matizadas.

El primer paso del procesamiento para ajustar el modelo de CSD a nuestras imágenes consistió en estimar la función de respuesta (ver fig. 8). Para ello se utilizó el algoritmo *dhollander* (Dhollander et al., 2016), el cual nos ayuda a estimar una función de respuesta (con ayuda del comando *dwi2response* de MRtrix). La ventaja de este algoritmo reside en que nos devuelve una función de respuesta para sustancia blanca, sustancia gris y líquido cefalorraquídeo por separado. Esto es de utilidad para la estimación de las FOD, pues al tener una función de respuesta diferenciada se tiene el punto

⁴ Sitio web: <http://stnava.github.io/ANTs/>

de referencia para ajustar las FOD de acuerdo con el tejido. Lo anterior contribuye a disminuir la presencia de lóbulos espurios en las FOD. La aproximación en la cual se consideran los tres componentes es llamada multi-tejido (*multi-tissue*).

Ahora bien, para la estimación de las FOD es posible usar un solo valor b (*single shell*) o los diferentes valores b de la adquisición, lo que se conoce como *multi-shell*. La adquisición de un solo valor b requiere menos tiempo que la de dos valores b , pues esto último implica evaluar la difusión de moléculas de agua con un conjunto de direcciones diferentes. Sin embargo, la ventaja de utilizar diversos *shells* consiste en una mayor precisión al momento de calcular las FOD. Esto se traduce en la posibilidad de obtener métricas, como AFD, más confiables. La incorporación de esta aproximación, junto con la primera es llamada *multi-shell, multi tissue CSD*, o MSMT CSD (Jeurissen, 2014). Un ejemplo de la estimación de las FOD con el enfoque mencionado, en nuestra adquisición, se puede apreciar en la fig. 18.

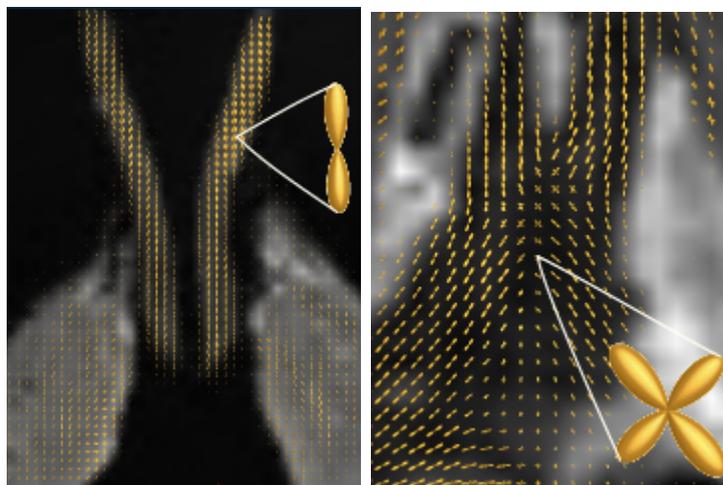


Figura 18. Estimación de las FOD en nervios y quiasma ópticos. Se puede apreciar por medio de las FOD regiones de una sola fibra, como lo es el nervio óptico (imagen izquierda), y de cruce de fibras, por ejemplo el quiasma óptico (imagen derecha).

Posteriormente, se realizó la estimación del AFD, dispersión y PEAK a partir de las FOD (con ayuda del comando `fod2fixel`). Este proceso se realiza

con base en las propiedades geométricas de los lóbulos de las FOD y se conoce como *segmentación* (ver el capítulo II del presente documento). A partir de los mapas (en fixeles) obtenidos después de este análisis es posible obtener métricas secundarias, basadas en voxeles. Así, a través del comando `fixel2voxel`, el cual colapsa la información de fixeles en voxeles, se estimó el mapa de complejidad. Un ejemplo de los mapas obtenidos con base en estas métricas se muestra en las figuras 19-21.

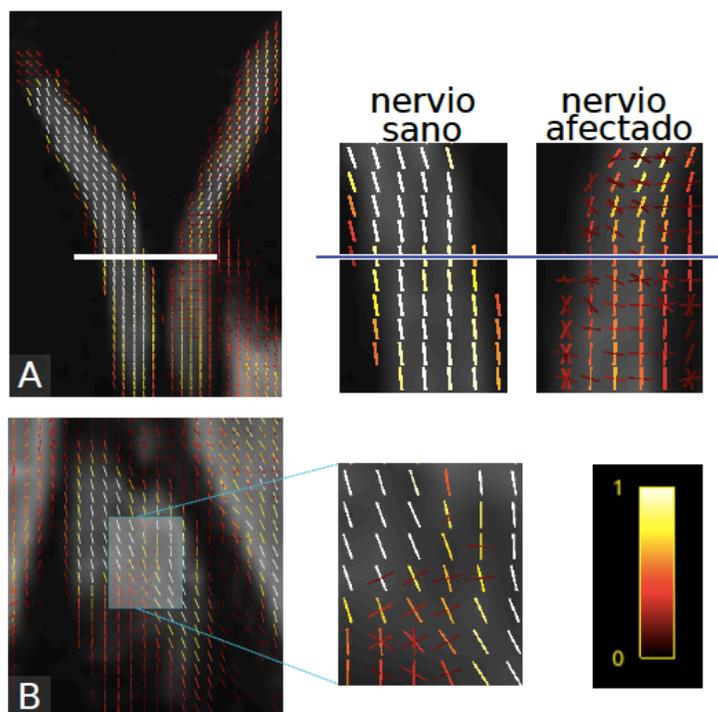


Figura 19. Mapas de fixeles correspondientes a la amplitud del lóbulo (PEAK). Estos mapas fueron tomados a partir de una vista axial del cerebro de rata 5 semanas después de isquemia retiniana. En cada voxel encontramos n cantidad de fixeles correspondiente al número de manojos de fibras identificados en esa región. Estos fixeles tienen diversos colores de acuerdo con su valor de PEAK con un código que puede entenderse con base en la barra presente en la esquina inferior derecha de la imagen. El valor de PEAK no va de 0 a 1, pero en este caso se ha hecho una normalización tomando como 1 el valor más alto. Al lado de las imágenes correspondientes a los nervios ópticos (A) y al quiasma (B) tenemos una amplificación de las regiones de interés señaladas. En esta imagen es posible apreciar un valor de PEAK mayor en el nervio sano en comparación con el afectado con base en la escala de colores señalada. De igual modo, en el quiasma óptico, los fixeles que derivan de las fibras del nervio sano tienen un valor más elevado que los fixeles correspondientes al nervio afectado. En A las líneas

horizontales indican la misma posición en la imagen de la izquierda y en su magnificación a la derecha.

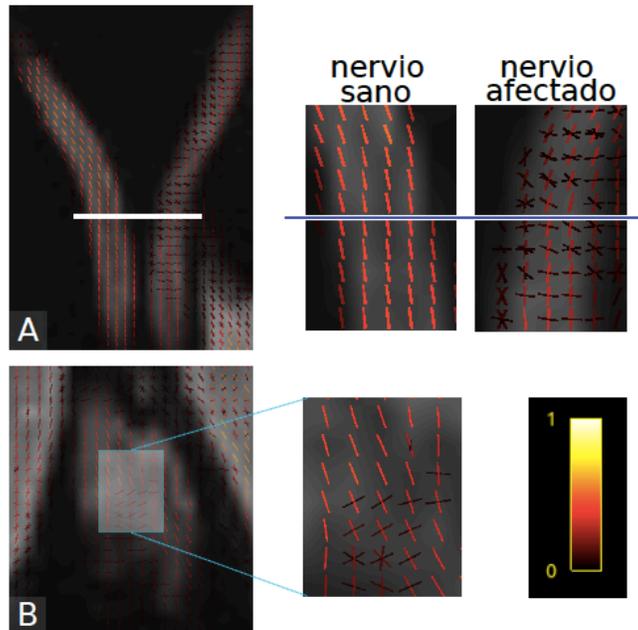


Figura 20. Mapas de fixeles correspondientes a la integral del lóbulo (AFD). Es posible notar valores de AFD más elevados en el nervio sano y en las fibras derivadas de este nervio en el quiasma óptico. Se notan, también, lóbulos perpendiculares a los nervios en las FODs en el nervio afectado, que refleja aumento de la difusión perpendicular a los axones (degenerados, en este caso). En A las líneas horizontales indican la misma posición en la imagen de la izquierda y en su magnificación a la derecha.

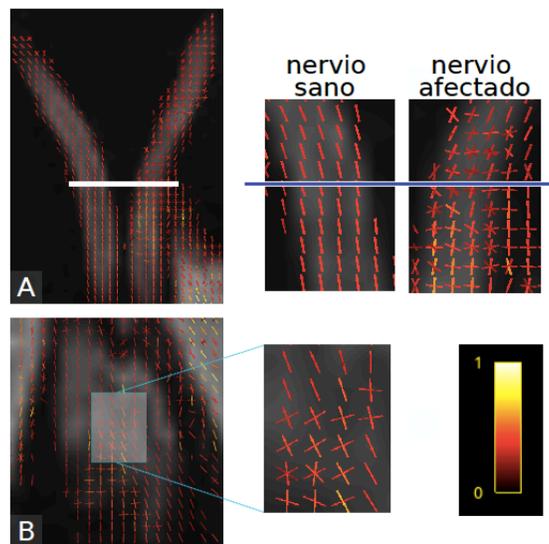


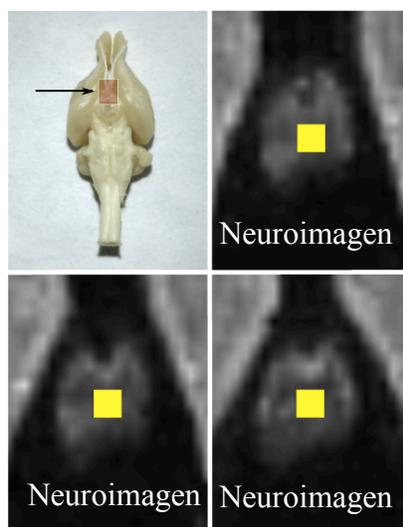
Figura 21. Mapas de fixeles correspondientes a la dispersión de fibras. El valor de dispersión está ligeramente disminuido en el nervio sano y en las fibras correspondientes en el quiasma

óptico. En A las líneas horizontales indican la misma posición en la imagen de la izquierda y en su magnificación a la derecha.

4. 4. 3. Selección de regiones de interés

Las regiones de interés (RI) fueron seleccionadas de una manera semiautomática. Primero se seleccionó una RI amplia, con base en la cual por medio de un algoritmo se detectaron las regiones en las que había una y dos fibras. Esta información se utilizó de referencia para hacer una selección manual de regiones de interés en los nervios y quiasma ópticos. En el caso de los nervios ópticos se seleccionaron alrededor de 200 voxeles por cada nervio. Se trató de tomar en cuenta la mayor parte de rebanadas de los nervios ópticos.

En el quiasma, esta selección consistió en una RI de 3x3 voxeles en tres rebanadas⁵ distintas (fig. 22). La justificación de este procedimiento reside en que al utilizar un algoritmo para ubicar las regiones de una y dos fibras reduce el sesgo que pudiera causar una selección arbitraria de la RI. Por otra parte, la especificación manual de lo que es el quiasma fue necesaria, pues se hubiera requerido un algoritmo nutrido de una gran cantidad de información, que hubiese sido equivalente, en el mejor de los casos, a una selección manual.



⁵ Por ejemplo, si pensamos en un volumen dividido en voxeles, una rebanada corresponde a los voxeles con posición 1xnxn, donde n son todos los voxeles de esa dimensión.

Figura 22. Regiones de interés en el quiasma óptico. En A tenemos una vista ventral de un cerebro de rata. Una flecha apunta a la región aproximada que vemos en las otras tres imágenes. En B (rebanada más ventral), C y D (rebanada más dorsal) encontramos el quiasma óptico visto en una DWI. Como puede apreciarse, la región de interés identificada con un recuadro amarillo se encuentra en el centro del quiasma.

4. 4. 4. Extracción de datos

Para el caso de las métricas por voxel generadas, se hicieron promedios de los valores de la estructura por cada animal. En el caso de las métricas por fixel, primero se obtuvo un promedio entre los los valores correspondientes a los fixeles intactos, y lo mismo para los fixeles afectados. Posteriormente, se realizó la suma de ambos valores para cada animal.

4.5. Pruebas estadísticas

Los análisis estadísticos y su visualización fueron realizadas con Python⁶, haciendo uso de las librerías matplotlib⁷, NumPy⁸, pandas⁹, SciPy¹⁰, seaborn¹¹. Tanto los datos de histología como los de resonancia magnética fueron sometidos a una prueba de normalidad, para determinar el tipo de pruebas estadísticas correspondientes.

La distribución de los datos no fue normal. Por ello, para la comparación entre muestras independientes se utilizó la prueba de Mann-Whitney U. En el caso de las muestras dependientes se usó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

Las correlaciones entre los datos derivados de la histología y los obtenidos por medio de los análisis de las imágenes sensibles a difusión se midieron por medio del coeficiente de correlación de Spearman.

⁶ Sitio web: <https://www.python.org>

⁷ Sitio web: <https://matplotlib.org>

⁸ Sitio web: <http://www.numpy.org>

⁹ Sitio web: <http://pandas.pydata.org>

¹⁰ Sitio web: <https://docs.scipy.org>

¹¹ Sitio web: <https://seaborn.pydata.org>

V. RESULTADOS

Los resultados obtenidos a partir del modelo del tensor (FA) reflejan adecuadamente la presencia de degeneración en el nervio óptico (fig. 23). En efecto, la FA de los nervios sanos fue más alta que la de los nervios degenerados ($p = 0.005$). Sin embargo, como se ha mencionado, el modelo del tensor no evalúa adecuadamente regiones de cruce de fibras (fig. 23). Las FA de los sujetos intactos fue similar a la de los sujetos que recibieron el daño ($p=0.212$) Los datos de los resultados obtenidos pueden encontrarse en el anexo I.

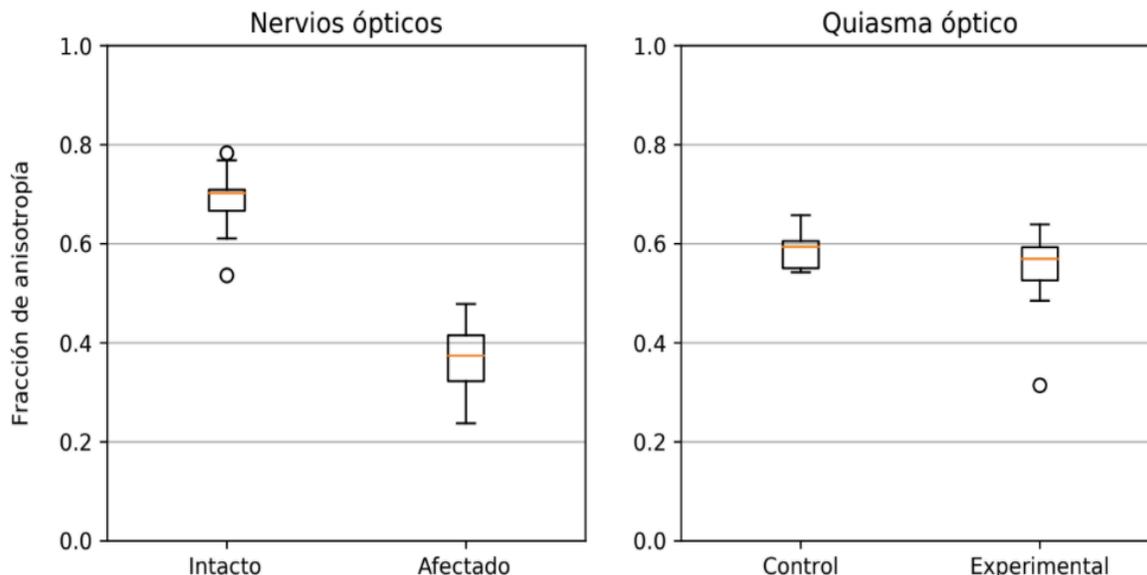


Figura 23. Valores de FA en los nervios ópticos sanos vs degenerados ($n=10$) de la muestra lesionada y en el quiasma óptico del grupo intacto ($n=5$) vs lesionado ($n=10$). Los sujetos fueron sacrificados 5 semanas después de isquemia retiniana.

En relación con CSD, AFD (*aparent fiber density*, Raffelt et al., 2012), nos ayuda a distinguir entre un nervio sano y uno degenerado ($p = 0.006$) con resultados similares a los obtenidos por medio de la FA, pero sin proporcionar información adecuada de las poblaciones de fibras presentes en el quiasma, cuando se compararon los valores de la suma de fixeles (intacto y afectado)

por animal ($p= 0.179$; fig. 24). Los datos de los análisis obtenidos pueden encontrarse en el anexo II.

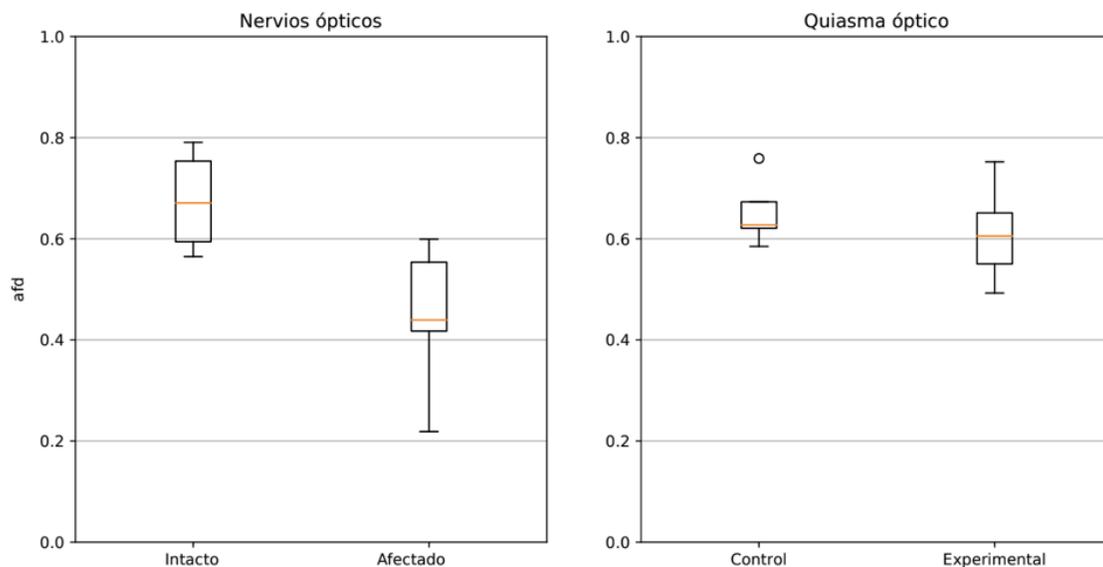


Figura 24. Valores de AFD en los nervios ópticos sanos vs degenerados ($n=10$) de la muestra lesionada y en el quiasma óptico del grupo intacto ($n=5$) vs lesionado ($n=10$). Los sujetos fueron sacrificados 5 semanas después de isquemia retiniana.

Por otro lado, la métrica de dispersión (que nos da información sobre la posible dispersión de los manojos de fibras), al contrario de lo mostrado con la AFD, fue útil para distinguir la degeneración en el quiasma ($p = 0.002$), si bien no en los nervios ($P = 0.712$; fig. 25). Los datos de los resultados obtenidos pueden encontrarse en el anexo III.

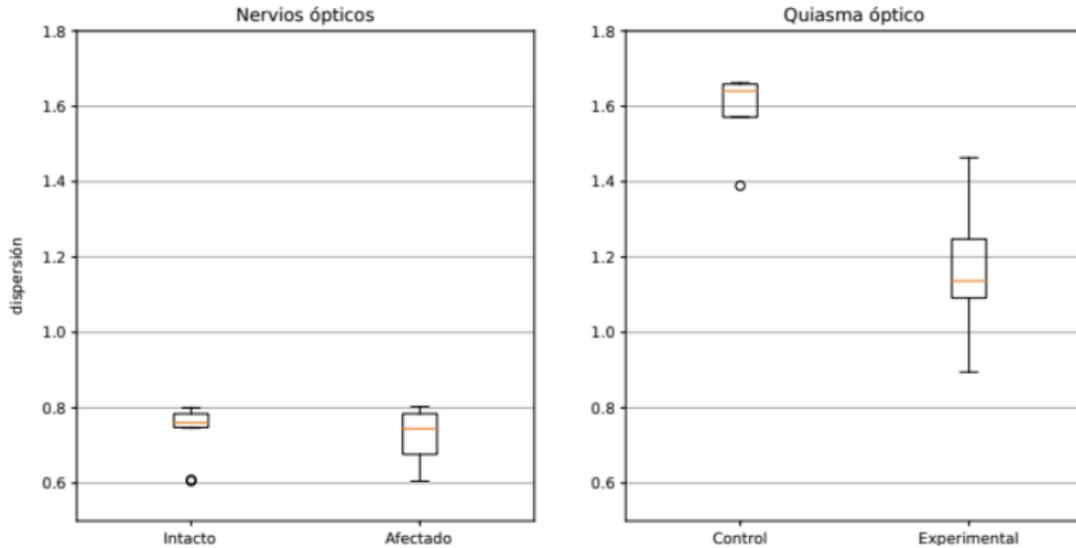


Figura 25. Valores de dispersión en los nervios ópticos sanos vs degenerados (n=10) de la muestra lesionada y en el quiasma óptico del grupo intacto (n=5) vs lesionado (n=10). Los sujetos fueron sacrificados 5 semanas después de isquemia retiniana.

Complexity (Riffert et al., 2014), la métrica obtenida a partir de AFD, arrojó resultados coherentes en relación con ambas estructuras, nervios ($p = 0.005$) y quiasma ($p = 0.002$), fig. 26. Los datos de los resultados obtenidos pueden encontrarse en el anexo IV.

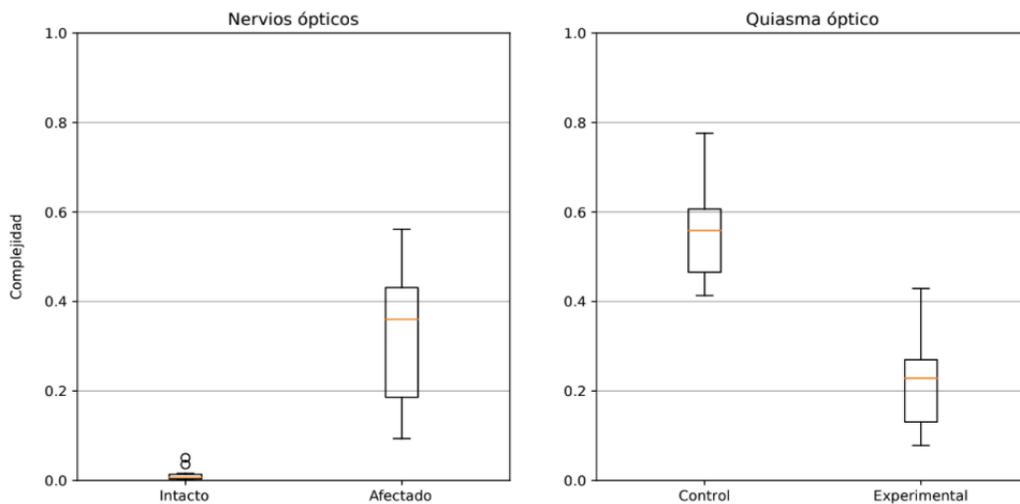


Figura 26. Valores de complejidad en los nervios ópticos sanos vs degenerados (n=10) de la muestra lesionada y en el quiasma óptico del grupo intacto (n=5) vs lesionado (n=10). Los sujetos fueron sacrificados 5 semanas después de isquemia retiniana.

Hasta aquí, los resultados mostrados hasta ahora han sido a nivel de voxel. Sin embargo, como se ha mencionado, CSD nos permite obtener resultados a nivel de fixeles. En el caso del quiasma óptico es posible obtener valores de los fixeles correspondientes a las fibras que han sufrido degeneración a causa del proceso de isquemia y de las fibras sanas. Los valores de fixeles a través de las métricas de PEAK, AFD y dispersión nos permitió distinguir claramente el fixel “intacto” del “afectado” (PEAK, $p=0.009$; AFD, $p=0.012$; disp, $p=0.016$).

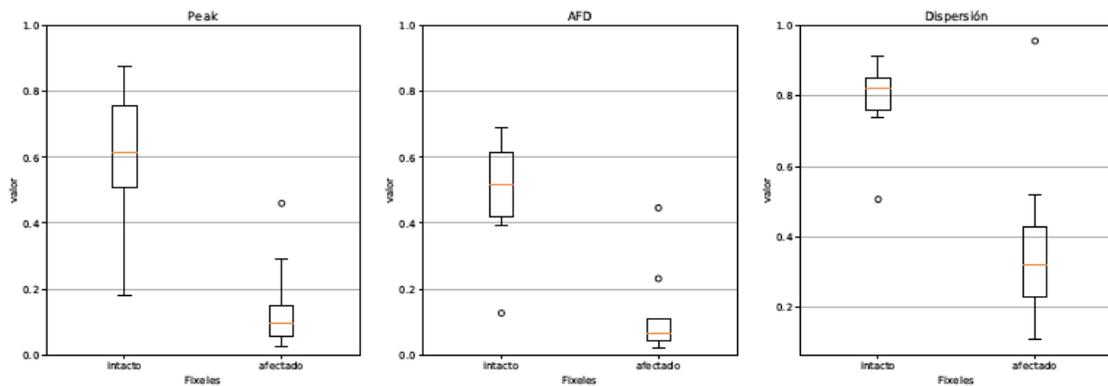


Figura 27. Valores de PEAK, AFD y dispersión por fixeles correspondientes al quiasma óptico.

En relación con la histología (ejemplos en la fig. 28), todos los parámetros derivados del análisis de las micrografías por medio de AxonSeg (Zaimi et al., 2016) nos permitieron distinguir el daño en los nervios. Sin embargo, en el quiasma óptico, no todos los parámetros nos ayudaron a diferenciar el grupo experimental respecto del grupo control (ver anexo V).

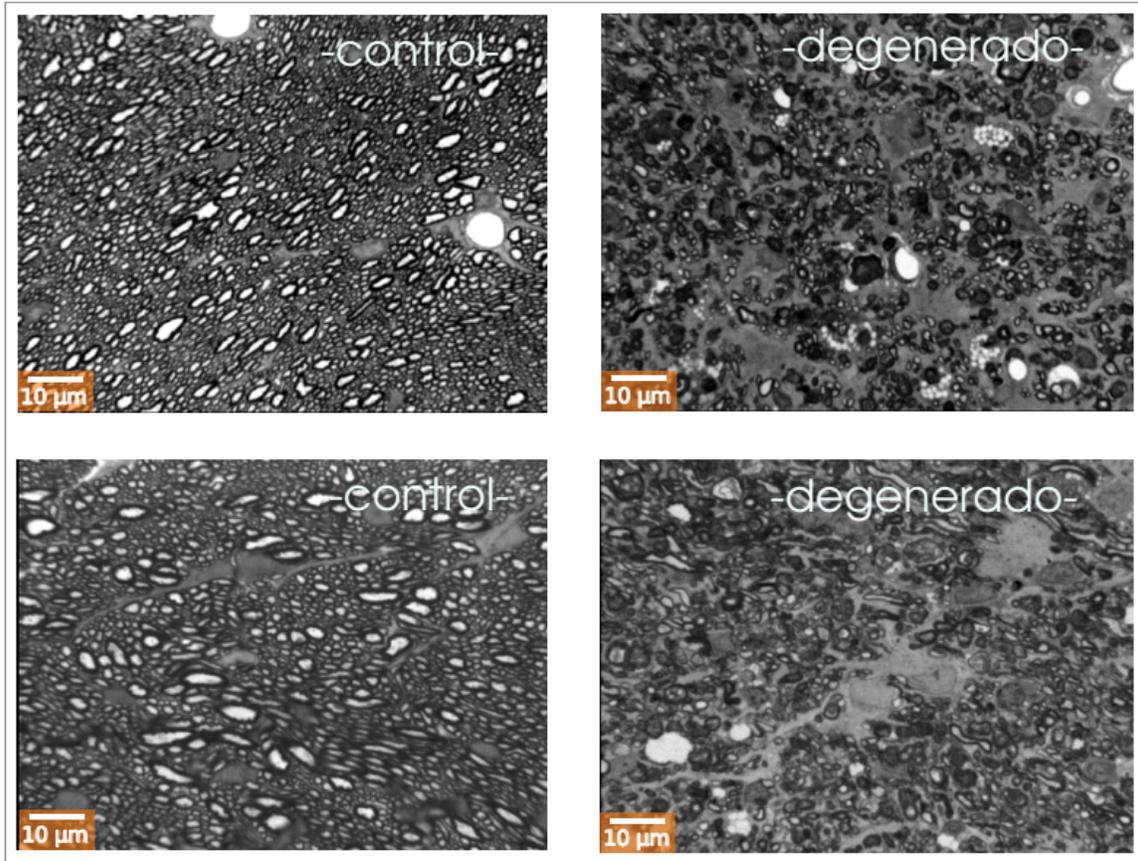


Figura 28. Micrografías de los nervios (panel superior) y quiasma (panel inferior) ópticos. Cortesía del Dr. Larriva-Sahd (Instituto de Neurobiología, UNAM).

Por tanto, dado que 1) la mayor parte de las fibras provenientes de los nervios ópticos decusa en el quiasma óptico, en el caso de la rata Wistar (Jeffery & Erskine, 2005), y 2) la información histológica obtenida de los nervios ópticos nos ayuda a distinguir adecuadamente la degeneración en todos los parámetros derivados de la segmentación axonal; se consideró que la información histológica de los nervios podría ser llevada al quiasma óptico. Por ejemplo, la cantidad total de axones del quiasma óptico de un animal se calculó sumando la cantidad de axones de los nervios ópticos izquierdo y derecho; lo mismo para los demás parámetros.

La relación entre los datos de resonancia y los de histología se resume en el siguiente mapa de correlaciones:

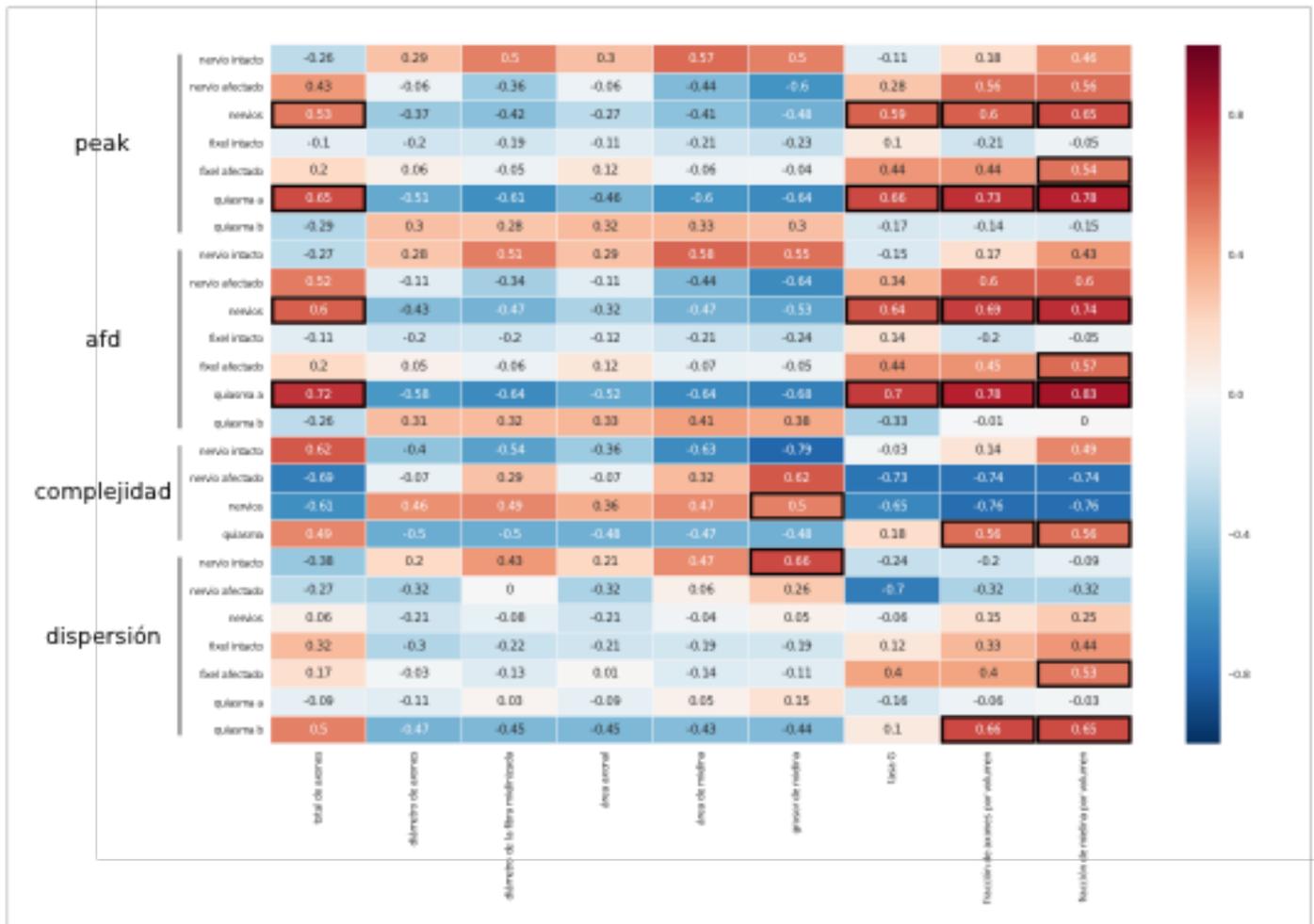


Figura 29. Mapa de correlaciones de los métricas de CSD con los parámetros derivados de la histología. En el eje y tenemos las distintas métricas obtenidas a partir de dMRI; en el eje x, los parámetros derivados de la histología. Los valores van de -1 a 1 y reflejan el índice de correlación de Spearman. Se han etiquetado con un recuadro negro aquellos valores con un valor p menor a 0.05. En el caso de PEAK, AFD y dispersión se anexa la correlación entre el fixel afectado con la histología correspondiente al nervio del cual depende. Además, la información de histológica provista para el *quiasma a* deriva de los datos de los nervios correspondientes, mientras que la información del *quiasma b* depende de las microfotografías del quiasma. Los valores p de todos los datos de este recuadro se pueden encontrar en el anexo VI.

Es posible notar que las mayores correlaciones de los parámetros de histología se encuentran en relación con la tasa-g, la fracción de axones por volumen y la fracción de mielina por volumen. En cuanto a las métricas de CSD, PEAK y AFD son las que más correlacionan con la histología. Sin

embargo, hay que considerar que la información que reporta PEAK y AFD es similar.

De este modo, para el caso de los nervios ópticos, es posible decir que existe una correlación positiva entre el valor de AFD y la cantidad total de axones de modo que un valor de AFD más alto refleja más axones en una región determinada. También encontramos una correlación positiva entre las proporciones de mielina y de axones por volumen. Estos dos parámetros histológicos reflejan una información similar debido a su interdependencia (fig. 30 A).

También se encontró que un mayor nivel de complejidad indica que el grosor de la mielina es mayor (fig. 30 B). Un mayor nivel de complejidad en el nervio nos indica que la degeneración causa que la difusión en los nervios no sea lo suficientemente coherente como para identificar un solo manojo de fibras. Sin embargo, se esperaría que el grosor de la mielina fuera menor. puede deberse a que este parámetro se ve influenciado por el proceso de degeneración en el cual la mielina pierde su estructura y se muestra menos compacta. La segmentación axonal por el programa utilizado (AxonSeg) está identificando una mielina más gruesa pero no más densa, pues su grosor deriva de que está más suelta.

La proporción entre el diámetro interno y el diámetro externo (tasa-g) nos refleja la integridad de la mielina, la cual se ve reducida en el caso del nervio degenerado (fig. 30), lo cual es consistente con lo anotado anteriormente. Un valor del diámetro externo (correspondiente a la mielina) más grande deriva en una tasa g menor.

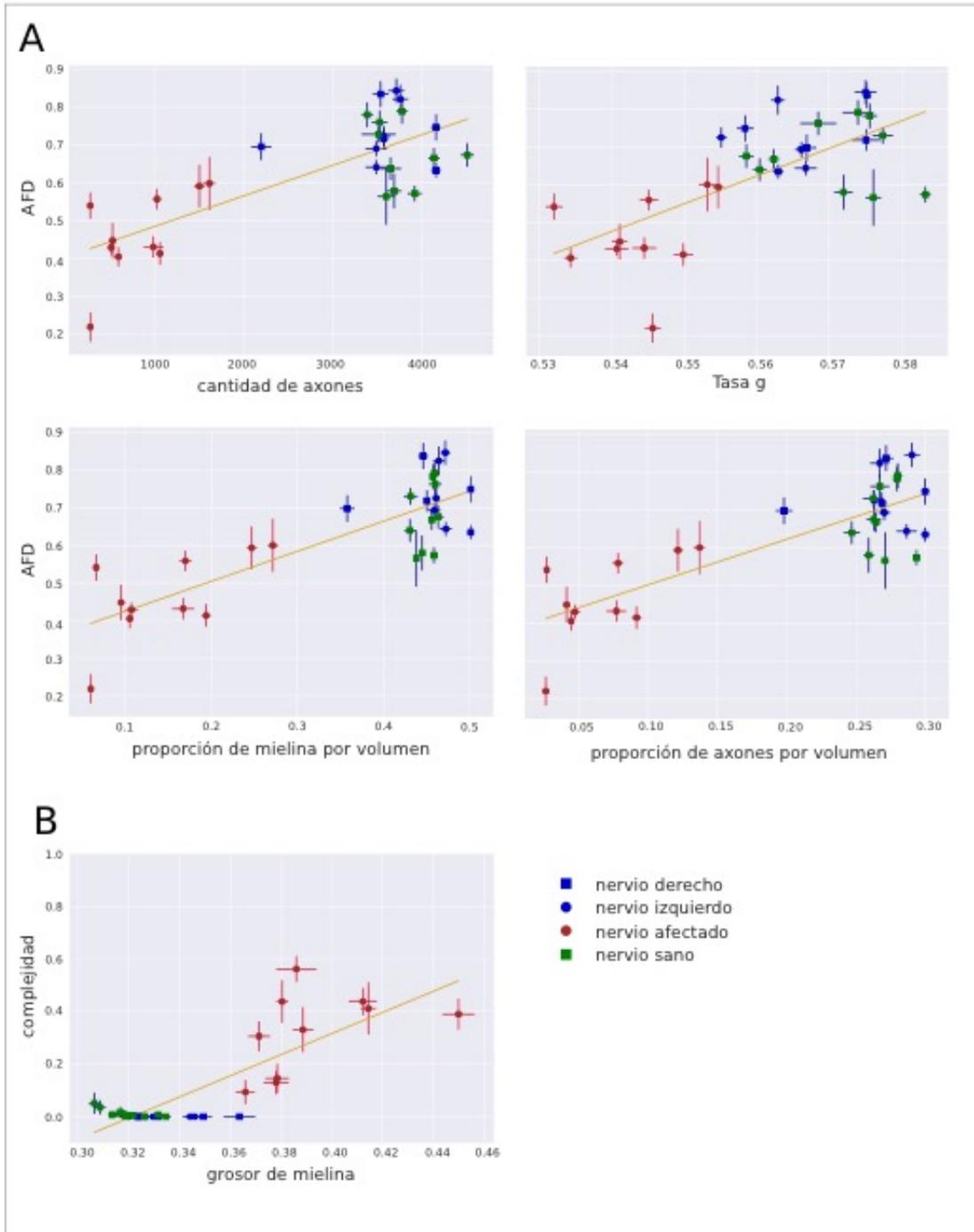


Figura 30. Gráficas de los valores de CSD que correlacionan con los parámetros derivados de la segmentación axonal de los nervios ópticos. En color dorado se muestra la línea de ajuste lineal de los datos. Las barras en los puntos de dispersión reflejan el error estándar.

En el caso del quiasma óptico, nutrido por la información de la histología de los nervios ópticos, la tasa-g (fig. 31, A) y la proporción de mielina por

volumen se encuentran correlacionados con los valores de AFD y PEAK, aunque especialmente en el caso de la proporción de la tasa-g (fig. 31, B) resulta difícil distinguir entre ambos grupos.

En cuanto a los valores del quiasma óptico los parámetros de proporción de mielina por volumen y proporción de axones son los mejores reporteros en relación con las métricas de complejidad (fig. 31, C) y dispersión (fig. 31, D). En estos casos una menor complejidad nos indicó que los cruces de fibras en el quiasma óptico se redujeron por la degeneración: a mayor degeneración se tienen menos fibras y la proporción de mielina en las micrografías es menor.

En cuanto a la métrica de dispersión, encontramos valores más altos en los controles, en relación con la proporción de mielina (D). La comparación de los fixeles en el quiasma óptico nos había indicado una mayor dispersión en el fixel intacto, en comparación con el fixel afectado (fig. 27). Por tanto, la suma de ambos valores para obtener la información correspondiente al quiasma del grupo experimental resulta menor en comparación con la de la suma de dos fixeles intactos correspondientes al grupo control.

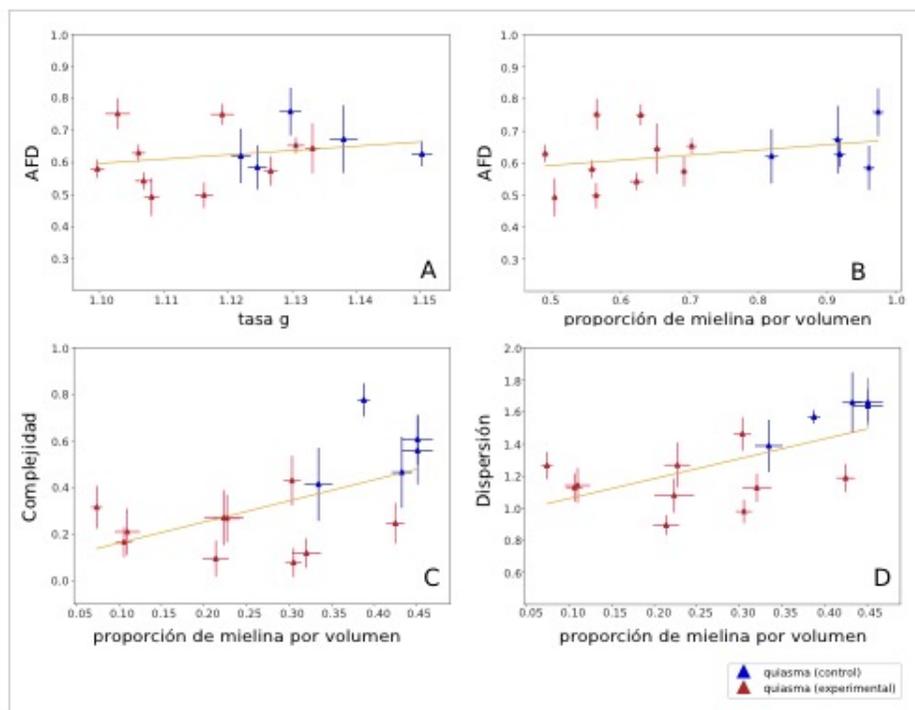


Figura 31. Gráficas de los valores de CSD que correlacionan con los parámetros derivados de la segmentación axonal del quiasma óptico; AFD (A y B), complejidad (C) y dispersión (D). En A y B los valores de la histología del quiasma se encuentran calculados con base en la información derivada de los nervios ópticos. En C y D estos valores derivan de la histología del quiasma. En color dorado se muestra la línea de ajuste de los datos. Las barras en los puntos de dispersión reflejan el error estándar.

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN

La resonancia magnética por difusión es una técnica que ha demostrado ser útil para la evaluación de la microestructura del tejido (Johansen-Berg & Behrens, 2006; Concha, 2014). A diferencia de otras técnicas de resonancia magnética, la dMRI permite la evaluación cuantitativa de las imágenes obtenidas a través de esta técnica. Para esto es necesario el uso de modelos matemáticos, llamados modelos locales (Riffert, 2014), que nos permiten la obtención de parámetros que intentan hacer inferencias acerca del substrato biológico de fondo. Uno de estos modelos es el tensor, el cual ha sido ampliamente usado debido a su facilidad de interpretación y parámetros de adquisición razonables, lo que permite su uso en la investigación y en la clínica. Se ha demostrado que este modelo permite evaluar adecuadamente regiones donde sólo existe un grupo de fibras (Song et al., 2003; Concha et al., 2010). Sin embargo, no nos proporciona información adecuada en voxels que contienen información de más de un grupo de fibras (Alexander et al., 2001; Tuch et al., 2002b). Ante esto se han desarrollado diversos modelos que intentan superar las limitaciones del tensor. Algunos de estos modelos son Constrained Spherical Deconvolution (Tournier, 2004), Diffusion spectrum imaging (Tuch, 2002a; Wedeen et al., 2000, 2005), QBall Imaging (Tuch DS, 2004) y diversos modelos multi-tensor (por ejemplo, MRDS, Coronado-Leija et al., 2017).

El problema radica en que no tenemos información de la correlación que tienen estos modelos con el substrato biológico a partir del cual están realizando las inferencias. Por ello resulta necesaria su validación. Para esto, en el presente proyecto fue elegido un modelo que nos permitió tener acceso a una región de cruce de fibras y que además pueda ser manipulable: el quiasma óptico. A través de la generación de isquemia retiniana se logró tener un grupo de fibras degenerado y uno sano en una región que abarcó varios voxels. A partir de esta preparación se realizó la adquisición de

imágenes *ex vivo* y se obtuvieron micrografías de los nervios y del quiasma ópticos por medio de microscopía de luz.

El conjunto de imágenes obtenidas a través de la resonancia son de gran valor para la determinación de marcadores biológicos, pues es posible evaluar el desempeño de cualquier modelo matemático en el tejido sano y dañado en una región de cruce de fibras, teniendo información del substrato biológico de fondo.

Como una primera aproximación, se ha elegido evaluar la correlación entre el análisis de las imágenes obtenidas a través del modelo de deconvolución esférica restringida (CSD), un modelo matemático que evalúa regiones de cruce de fibras, y los datos histológicos.

A través de CSD es posible distinguir adecuadamente entre el nervio sano y el nervio afectado por medio del proceso de isquemia retiniana. Sin embargo, la pregunta central es: ¿puede diferenciar adecuadamente en una región de cruce de fibras? La respuesta alcanzada en este trabajo es afirmativa. En efecto CSD nos permitió distinguir las fibras intactas de las dañadas (por el proceso de isquemia), analizando los voxels presentes en una región de cruce de fibras.

CSD resultó potencialmente útil para la evaluación de la degeneración axonal, pero ¿qué tan precisa es la información arrojada por este modelo? Para determinar esto se han elaborado las correlaciones entre las métricas derivadas de CSD y los parámetros obtenidos a través del análisis de la histología.

En términos generales, las métricas de CSD correlacionan principalmente con la proporción de mielina y la proporción de axones en las micrografías analizadas. Esto se extiende a las cuatro métricas de CSD analizadas, AFD, PEAK, dispersión y complejidad.

Hay que anotar que los valores que reportan las proporciones de mielina y de axones son similares. Lo cual se entiende en tanto que la micrografía de un grupo de fibras dañado debería tener una proporción de mielina menor y

correspondientemente una proporción de axones menor, y el caso contrario para un grupo de fibras sano.

Además, si bien algunas interpretaciones de las métricas son muy directas, es necesario hacer algunas anotaciones. Primero, resultó paradójico que un mayor nivel de complejidad estuviera relacionado con un mayor grosor de mielina. Como dijimos, un mayor nivel de complejidad en el nervio nos indica que la degeneración causa que la difusión en los nervios no sea lo suficientemente coherente como para identificar un solo manojito de fibras. Sin embargo, se esperaría que el grosor de la mielina fuera menor. Esto puede deberse a que este parámetro se ve influenciado por el proceso de degeneración en el cual la mielina pierde su estructura y se muestra menos compacta. Entonces, se podría conjeturar que la segmentación axonal con el programa utilizado (AxonSeg) está identificando una mielina más gruesa pero no más densa, pues el grosor identificado podría derivar de que está más suelta. En segundo lugar, la métrica de dispersión nos da información de la dispersión por voxel mediante una tasa entre la AFD y el PEAK. De acuerdo con los resultados obtenidos, consideremos esto debe ser interpretado como una medida de coherencia de fibras mielinizadas en regiones de cruce de fibras.

En cuanto a las limitaciones y perspectivas del presente estudio hay que considerar varios factores. Uno de ellos es que la adquisición es de una muestra *ex vivo*. En tanto la dMRI es sensible a la difusión del agua, un tejido *ex vivo*, en el cual la difusión de moléculas de agua es menor, deriva en información que no corresponde por completo con los parámetros del tejido vivo. Aunque la baja temperatura de la muestra *ex vivo* (en comparación con tejido *in vivo*) provoca una considerable disminución del coeficiente de difusión del agua, se ha demostrado que las barreras que provocan la difusión anisotrópica no se ven afectadas (Sun et al., 2003). Sin embargo, el tratamiento para fijar el tejido puede modular el fenómeno de anisotropía (Sun et al., 2009), además de que disminuye el espacio extracelular, por lo que resulta necesario una adquisición *in vivo* como corroboración de la información obtenida.

Otra limitación estriba en los artefactos que encontramos en las imágenes de resonancia. Una adquisición tan larga como la realizada (alrededor de 14 h) no estuvo exenta de problemas. En algunos casos los artefactos afectaron la obtención de métricas en las regiones de interés en el análisis de resonancia, sobre todo por burbujas de aire que se acumulaban en esa región. Por esta razón se hizo una cuidadosa selección de los voxeles que se incluyeron para el análisis realizado.

Por otra parte, aunque en la adquisición realizada pudimos obtener imágenes con una gran resolución (125 μm), la región de interés es lo suficientemente pequeña como para requerir aún mayor resolución espacial para así poder caracterizar mejor el quiasma.

En relación con los alcances del proyecto, es necesario subrayar que la información recabada aquí, esto es, la adquisición de imágenes de resonancia realizada y la histología utilizada, será de gran utilidad para la evaluación de otros modelos matemáticos diferentes al analizado en el presente proyecto que evalúen regiones de cruce de fibras. Cabe mencionar que la investigación realizada es parte de un estudio en colaboración con los grupos desarrolladores de MRDS (Coronado-Leija et al., 2017) y Diamond (Scherrer et al., 2016), dos modelos que, como CSD, permiten la evaluación de regiones de cruce de fibras.

Así como se ha facilitado la interpretación biológica del modelo del tensor mediante validaciones histológicas, tanto en modelos animales (Song et al., 2003), como en humanos (Concha et al., 2010). Este estudio aporta información importante en la misma línea, y extiende las interpretaciones biológicas donde se cruzan las fibras nerviosas. Esto permite conocer el substrato biológico de fondo de los resultados de los análisis de resonancia magnética. La investigación desarrollada aquí, entonces, sirve como un punto de referencia para conocer la información histológica que es posible obtener a partir del análisis de las imágenes obtenidas por medio de resonancia magnética con un modelo matemático, CSD, en regiones de cruce de fibras, con aplicaciones en la investigación y en la clínica.

ANEXOS

ANEXO I. VALORES DE PEAK EN LOS NERVIOS Y QUIASMA ÓPTICOS.

Animal	Nervios				Quiasma			
	Control	Desv. est.	Afectado	Desv. est.	Fixel sano	Desv. est.	Fixel afectado	Desv. est.
ct01	0,99574	0,26174	0,89855	0,15814	0,38751	0,19617	0,25467	0,14084
ct02	0,92706	0,19138	1,0545	0,27255	0,41297	0,23498	0,36182	0,26089
ct03	1,1142	0,23471	1,1544	0,23463	0,44108	0,082549	0,35913	0,13347
ct04	0,98431	0,18398	0,95165	0,22418	0,36704	0,20171	0,2614	0,12515
ct05	0,76976	0,10681	0,77623	0,084742	0,34624	0,14601	0,5567	0,23589
is01	0,80741	0,17645	0,27648	0,17975	0,77681	0,16441	0,040448	0,10328
is02	0,8951	0,16574	0,55157	0,12745	0,61414	0,12105	0,024471	0,065117
is03	0,97167	0,20874	0,52058	0,1417	0,81725	0,30201	0,15897	0,1323
is04	0,74905	0,38808	0,70432	0,20215	0,5011	0,2808	0,12624	0,17417
is05	0,89653	0,14709	0,56483	0,18537	0,61968	0,11772	0,099162	0,11257
is06	0,8908	0,27649	0,89679	0,32402	0,18136	0,15872	0,46062	0,10845
is07	0,93847	0,15412	0,77074	0,38222	0,69914	0,15917	0,050072	0,082408
is08	1,0437	0,23491	0,7957	0,18756	0,87928	0,27773	0,088568	0,10772
is09	1,0422	0,26098	0,64547	0,11937	0,52722	0,21613	0,075335	0,12391
is10	0,76944	0,13576	0,53749	0,15185	0,48162	0,31599	0,28904	0,32613

ANEXO II. VALORES DE AFD EN LOS NERVIOS Y QUIASMA ÓPTICOS.

Animal	Nervios				Quiasma			
	Control	Desv. est.	Afectado	Desv. est.	Fixel sano	Desv. est.	Fixel afectado	Desv. est.
ct01	0,7483	0,13543	0,69228	0,079963	0,35509	0,16667	0,22989	0,14088
ct02	0,71752	0,11026	0,82331	0,14915	0,36001	0,22939	0,31308	0,24264
ct03	0,83643	0,1341	0,84535	0,1253	0,34677	0,065309	0,28055	0,10476
ct04	0,69701	0,1376	0,72444	0,10522	0,35768	0,19369	0,26316	0,18503
ct05	0,63396	0,073776	0,64279	0,074627	0,29741	0,14536	0,46145	0,18511
is01	0,63891	0,11742	0,21873	0,14943	0,60057	0,092479	0,029361	0,075205
is02	0,66696	0,10358	0,43112	0,10985	0,52308	0,10907	0,019589	0,051294
is03	0,76176	0,12091	0,40491	0,099797	0,64232	0,19115	0,10995	0,1005
is04	0,56485	0,29097	0,54059	0,13479	0,39115	0,21733	0,10152	0,1508
is05	0,67493	0,12161	0,44778	0,18263	0,51047	0,098315	0,070428	0,080142
is06	0,57925	0,17898	0,59249	0,2202	0,12671	0,10676	0,44688	0,17692
is07	0,7296	0,086308	0,59944	0,27508	0,61812	0,095506	0,035179	0,06047
is08	0,7907	0,12731	0,55811	0,106	0,69171	0,12875	0,05882	0,069012
is09	0,78165	0,12809	0,42899	0,073104	0,43772	0,14658	0,060679	0,10246
is10	0,5728	0,081619	0,41367	0,11718	0,4131	0,25801	0,23164	0,23833

ANEXO III. VALORES DE DISPERSIÓN EN LOS NERVIOS Y QUIASMA ÓPTICOS.

Animal	Nervios				Quiasma			
	Control	Desv. est.	Afectado	Desv. est.	Fixel sano	Desv. est.	Fixel afectado	Desv. est.
ct01	0,77024	0,08019	0,77946	0,06252	0,91451	0,30568	0,74743	0,36754
ct02	0,78343	0,057632	0,79754	0,07675	0,72267	0,32762	0,66648	0,39823
ct03	0,75994	0,052884	0,74357	0,073804	0,79173	0,10898	0,77938	0,078014
ct04	0,70707	0,020909	0,77724	0,078142	0,80497	0,41015	0,8539	0,43803
ct05	0,82861	0,06989	0,82911	0,059354	0,82801	0,26246	0,81237	0,19466
is01	0,80003	0,06555	0,63689	0,35954	0,78674	0,08289	0,10803	0,26561
is02	0,75264	0,080099	0,78451	0,12082	0,86018	0,14797	0,12014	0,2941
is03	0,79736	0,093892	0,80287	0,19853	0,81815	0,17842	0,44915	0,3322
is04	0,60918	0,30261	0,79382	0,18796	0,73848	0,24125	0,34065	0,40425
is05	0,75236	0,074595	0,78417	0,20255	0,83	0,12814	0,35897	0,37286
is06	0,60566	0,17644	0,6056	0,18942	0,50695	0,35685	0,95652	0,3013
is07	0,78743	0,094761	0,68488	0,30713	0,91162	0,16103	0,21601	0,36169
is08	0,77437	0,11449	0,72486	0,15441	0,82647	0,17533	0,30326	0,35308
is09	0,76867	0,085803	0,67386	0,10374	0,87862	0,29926	0,26482	0,38757
is10	0,74667	0,082988	0,76401	0,16488	0,75072	0,41207	0,519	0,47241

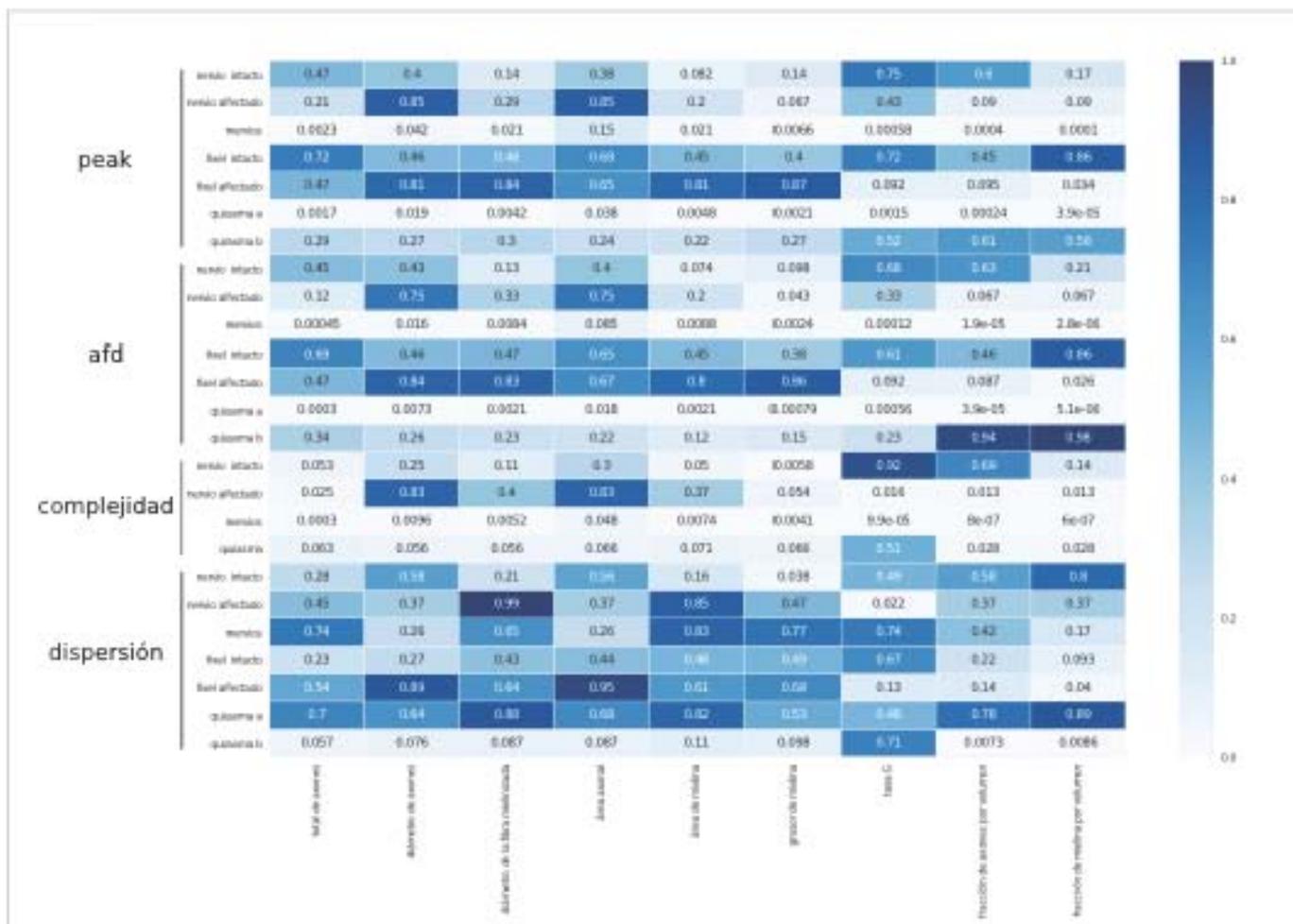
ANEXO IV. VALORES DE COMPLEJIDAD EN LOS NERVIOS Y QUIASMA ÓPTICOS.

Animal	Nervios				Quiasma	
	Nervio Control	Desv. est.	Nervio afectado	Desv. est.	Fixel sano	Desv. est.
ct01	0	0	0	0	0,55867	0,32618
ct02	0	0	0	0	0,41324	0,35052
ct03	0	0	0	0	0,77595	0,16068
ct04	0	0	0	0	0,46551	0,34264
ct05	0	0	0	0	0,60658	0,24106
is01	0	0	0,41152	0,38408	0,094931	0,24565
is02	0,0070589	0,050286	0,14583	0,21587	0,078304	0,19812
is03	0,0071326	0,047302	0,56144	0,19114	0,31505	0,29076
is04	0,0074471	0,062221	0,3897	0,22981	0,27068	0,37583
is05	0,050733	0,15643	0,43761	0,31367	0,24682	0,27675
is06	0,015804	0,082316	0,093621	0,17683	0,429	0,33992
is07	0,0029911	0,043552	0,12971	0,17249	0,11893	0,20038
is08	0,0050714	0,043912	0,30571	0,22135	0,1658	0,20581
is09	0	0	0,43757	0,2007	0,21029	0,31468
is10	0,035496	0,1053	0,3305	0,33025	0,26726	0,32222

ANEXO V. NIVELES DE SIGNIFICANCIA DERIVADOS DE LOS PARÁMETROS DE HISTOLOGÍA.

Index	total de axones	diámetro de axones	diámetro de la fibra mielinizada	área axonal	área de mielina	grosor de mielina	tasa G	fracción de axones por volumen	fracción de mielina por volumen
nervios	0.00506203	0.00506203	0.00506203	0.00691043	0.00506203	0.00506203	0.00506203	0.00506203	0.00506203
quiasma	0.0287132	0.0378763	0.0378763	0.0628932	0.079498	0.079498	0.122312	0.00290657	0.00290657

ANEXO VI. VALORES DE PROPABILIDAD DE LA CORRELACIÓN ENTRE LAS MÉTRICAS DE CSD Y LOS PARÁMETROS DERIVADOS DE LA SEGMENTACIÓN AXONAL.



LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de una neurona.

Figura 2. Corte coronal del cerebro humano.

Figura 3. Imagen por microscopía electrónica de un axón cortado transversalmente.

Figura 4. Vainas de mielina en el SNC.

Figura 5. Representación esquemática del modelo del tensor.

Figura 6. Número de poblaciones de fibras en el cerebro humano.

Figura 7. Evaluación de fibras a partir de la señal de resonancia magnética.

Figura 8. Representación gráfica de la función de respuesta.

Figura 9. Representación gráfica de las orientación de las fibras desde una vista axial del cerebro de rata Wistar.

Figura 10. Representaciones de manojos de fibras por medio de lóbulos.

Figura 11. Representación gráfica de dos fixeles correspondientes a dos poblaciones de fibras distintas en un voxel.

Figura 12. PEAK de un lóbulo.

Figura 13. Representación esquemática de las regiones de interés.

Figura 14. Procedimiento de isquemia retiniana por canulación de la cámara anterior en rata Wistar

Figura 15. Micrografía de un nervio óptico.

Figura 16. Principales propiedades morfológicas estimadas por Axonseg.

Figura 17. Imagen sensible a difusión antes (izquierda) y después de preprocesamiento.

Figura 18. Estimación de las FOD en nervios y quiasma ópticos.

Figura 19. Mapas de fixeles correspondientes a la amplitud del lóbulo (PEAK).

Figura 20. Mapas de fixeles correspondientes a la integral del lóbulo (AFD).

Figura 21. Mapas de fixeles correspondientes a la dispersión de fibras.

Figura 22. Regiones de interés en el quiasma óptico.

Figura 23. Valores de FA en los nervios y quiasma ópticos.

Figura 24. Valores de AFD en los nervios y quiasma ópticos.

Figura 25. Valores de dispersión en los nervios y quiasma ópticos.

Figura 26. Valores de complejidad en los nervios y quiasma ópticos.

Figura 27. Valores de PEAK, AFD y dispersión por fixeles correspondientes al quiasma óptico.

Figura 28. Micrografías de los nervios y quiasma ópticos.

Figura 29. Mapa de correlaciones de los métricas de CSD con los parámetros derivados de la histología.

Figura 30. Gráficas de los valores de CSD que correlacionan con los parámetros derivados de la segmentación axonal de los nervios ópticos.

Figura 31. Gráficas de los valores de CSD que correlacionan con los parámetros derivados de la segmentación axonal del quiasma óptico.

REFERENCIAS

- Adachi M, Takahashi K, Nishikawa M, Miki H, Uyama M (1996). High intraocular pressure-induced ischemia and reperfusion injury in the optic nerve and retina in rats. *Graefe's Arch Clin Exp Ophtalmol*, 234: 445-451.
- Alexander A, Hasan K, Lazar M, Tsuruda J, Parker D (2001). Analysis of partial volume effects in diffusion-tensor MRI. *Magn Reson Med*, 45: 770-780.
- Alexander DC, Barker GJ, Arridge SR (2002). Detection and modeling of non-Gaussian apparent diffusion coefficient profiles in human brain data. *Magn Reson Med*, 48: 331-340.
- Amaral D, Strick P (2013). *The Organization of the Central Nervous System*. En E. Kandel J, Schwartz T, Jessell S, Siegelbaum, Hudspeth A (Edits.), *Principles of Neural Science*. Mc Graw Hill, New York. 337-354.
- Basser PJ, Pierpaoli C (1996). Microstructural and physiological features of tissue elucidated by quantitative-diffusion tensor MRI. *J Magn Reson*, 111: 209-219.
- Cohen R, Ptiff D (2008). *Citology and Organization of Cell Types: Light and Electron Microscopy*. En M. Conn (Ed.), *Neuroscience in Medicine*. Humana Press, New Jersey. 1-24.
- Concha L, Livy DJ, Beaulieu C, Wheatley BM, Gross DW (2010). In Vivo Diffusion Tensor Imaging and Histopathology of the Fimbria-Fornix in Temporal Lobe Epilepsy. *J. Neurosci*. 30 (3): 996-1002.
- Concha L (2014). A macroscopic view of microstructure: Using diffusion-weighted images to infer damage, repair, and plasticity of white matter. *Neuroscience*, 276: 14-28.

Coronado-Leija R, Ramirez-Manzanares A, Marroquin JL (2017). Estimation of individual axon bundle properties by a Multi-Resolution Discrete-Search method. *Medical Image Analysis*, 42: 26 – 43.

Dhollander T, Raffelt D, Connelly A (2016). Unsupervised 3-tissue response function estimation from single-shell or multi-shell diffusion MR data without a co-registered T1 image. *ISMRM Workshop on Breaking the Barriers of Diffusion MRI*, Lisbon.

Edgar JM, Griffiths IR (2014). *White Matter Structure: A Microscopist's View*. En Johansen-Berg, H. and Behrens, T. E. J. (Edits.), *Diffusion MRI: From Quantitative Measurement to In vivo Neuroanatomy*. Amsterdam: Elsevier. 127-152.

Fawcett DW, Bloom W, Raviola E, Angevine JB, Maximov F (1994). *A textbook of Histology*. New York: Chapman & Hall.

Frank LR (2002). Characterization of anisotropy in high angular resolution diffusion-weighted MRI. *Magn Reson Med*, 47: 1083–1099.

Friede RL, Samorajski T (1970). Axon caliber related to neurofilaments and microtubules in sciatic nerve fibers of rats and mice. *Anat Rec*, 167: 379–388.

Genesser F (2009). *Histología*. Madrid: Médica Panamericana.

Hildebrand C, Remahl S, Persson H, Bjartmar C, 1993. Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog Neurobiol*, 40: 319–384.

Huang H, Shu N, Mishra V, Jeon T, Chalak L, Wang Z, Rollins N, Gaolang G, Cheng H, Peng Y, Dong Q, He Y (2015). Development of Human Brain Structural Networks Through Infancy and Childhood. *Cerebral Cortex*, 25: 1389-1404.

Jeurissen B, Leemans A, Tournier JD, Jones D, & Sijbers, J (2013). Investigating the prevalence of complex fiber configurations in white matter tissue with diffusion magnetic resonance imaging. *Human Brain Mapping*, 34: 2747-2766.

Jeurissen B, Tournier JD, Dhollander T, Connelly A, Sijbers J (2014). Multi-tissue constrained spherical deconvolution for improved analysis of multi-shell diffusion MRI data. *NeuroImage*, 103: 411–426

Jahn O, Tenzer S, Werner HB (2009). Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Mol Neurobiol*, 4: 55–72.

Jeffery G, Erskine L (2005). Variations in the Architecture and Development of the Vertebrate Optic Chiasm. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24 (6): 721–53.

Johansen-Berg H, Behrens TE (2006). Just Pretty Pictures? What Diffusion Tractography Can Add in Clinical Neuroscience. *Curr Opin Neurol*, 19 (4): 379–85.

Glen J, Erskine L (2005). Variations in the Architecture and Development of the Vertebrate Optic Chiasm. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24 (6): 721–53.

Jones D (2014). *Gaussian modeling of the diffusion signal*. En Johansen-Berg, H. and Behrens, T. E. J. (Edits.), *Diffusion MRI: From Quantitative Measurement to In vivo Neuroanatomy*. Amsterdam: Elsevier. 37-64.

Kandel E, Barres B, Hudspeth A (2013). *Nerve Cells, Neural Circuitry and Behavior*. En E. Kandel, Schwartz James, T. Jessell, S. Siegelbaum, & A. Hudspeth (Edits.), *Principles of Neural Science*. Mc Graw Hill. 21-38.

Morell P (1984). *Myelin*. Plenum Press, New York and London.

MRtrix (2017), sitio web: www.mrtrix.org

Riffert T, Schreiber J, Anwander A, Knösche T (2014). Beyond fractional anisotropy: Extraction of bundle-specific structural metrics from crossing fiber models. *NeuroImage*, 100: 176–191.

Scherrer B, Schwartzman A, Taquet M, Sahin M, Prabhu SP, Warfield SK (2016) Characterizing brain tissue by assessment of the distribution of anisotropic microstructural environments in diffusion-compartment imaging (DIAMOND), *Magn Reson Med*, 76(3): 963-77.

Song SK, Sun SW, Ju WK, Lin SJ, Cross AH, Neufeld AH (2003). Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia. *NeuroImage*, 20(3): 1714 – 22.

Sun S, Neil JJ, Song S (2003). Relative Indices of Water Diffusion Anisotropy Are Equivalent in Live and Formalin-Fixed Mouse Brains. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 50 (4): 743–48.

Sun S, Liang HF, Xie M, Oyoyo U, Lee A. (2009). Fixation, Not Death, Reduces Sensitivity of DTI in Detecting Optic Nerve Damage. *NeuroImage*, 44 (3): 611–19.

Tax C, Jeurissen B, Vos S, Viergever M, Leemans A (2014). Recursive calibration of the fiber response function for spherical deconvolution of diffusion MRI data. *NeuroImage*, 86: 67–80.

Tournier J, Calamante F, Connelly A (2004). Direct estimation of the fiber orientation density function from diffusion-weighted MRI data using spherical deconvolution. *NeuroImage*, 23: 1176-1185.

Tournier J, Calamante F, Connelly A (2007). Robust determination of the fibre

orientation distribution in diffusion MRI: non-negativity constrained super-resolved spherical deconvolution. *NeuroImage*, 35: 1459-1472.

Tournier J-D, Mori S, Leemans A (2011). Diffusion tensor imaging and beyond. *Magn Reson Med*, 65(6):1532–1556.

Trapp BD, Kidd GJ, (2004). Structure of the myelinated axon. In: Lazarini, R.A., Griffin, J.W., Lassmann, H., Nave, K.-A., Miller, R.H., Trapp, B.D. (Eds.), *Myelin Biology and Disorders*. Elsevier, Amsterdam. 3-27

Tuch D (2002a). *Diffusion MRI of complex tissue structure*. Tesis, Biomedical Imaging, Massachusetts Institute of Technology.

Tuch D, Reese, T, Wiegell M, Makris N, Belliveau J, Wedeen V (2002b). High angular resolution diffusion imaging reveals intravoxel white matter fiber heterogeneity. *Magn Res Med*, 48: 577–582.

Tuch DS (2004). Q-Ball imaging. *Magn Reson Med*, 52: 1358–1372.

UBC Medicine (2014). UBC Flexible Neuroanatomy. Sitio web: UBC Medicine: <https://www.youtube.com/watch?v=InJByqg1x-0&t=538s>.

Veraart J, Fieremans E, Novikov DS (2016a) Diffusion MRI noise mapping using random matrix theory. *Magn Res Med*, 76(5): 1582-1593.

Veraart J, Novikov DS, Christiaens D, Ades-aron B, Sijbers J, Fieremans E (2016b). Denoising of diffusion MRI using random matrix theory. *NeuroImage*, 142: 394-406.

Waller AV (1850). Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Onservations of the Alterations Produced

Thereby in the Structure of Their Primitive fibres. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 140: 423— 429.

Wedeen VJ, Reese TG, Tuch DS, Dou J-G, Weiskoff RM, Chessler D (2000). Mapping fiber orientation spectra in cerebral white matter with Fourier-transform diffusion MRI. In: *Proceedings of the 8th Annual Meeting of the ISMRM*, 82.

Wedeen VJ, Hagmann P, Tseng W-YI, Reese TG, Weisskoff RM (2005). Mapping complex tissue architecture with diffusion spectrum magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*, 54: 1377–1386.

Wheeler-Kingshott C, Gareth B, Stefan S, Mark V (2003). *D: the Diffusion of Water*. En Tofts P (Ed.), *Quantitative MRI of the Brain: Measuring changes caused by disease*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex. 203-249.