



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina

Programa de Doctorado 3139 Medicina

**DETECCIÓN DE NUEVOS MARCADORES ASOCIADOS A DAÑO POR
REPERFUSIÓN Y FIBROSIS EN INFARTO DE MIOCARDIO VALIDADOS
HISTOPATOLÓGICAMENTE MEDIANTE ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE
RESONANCIA MAGNÉTICA MULTIMODAL**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Itziar Pérez Terol (Licenciada en Biología)

Codirigida por: Dr. Vicente Bodí Peris

Dr. Daniel Monleón Salvadó

Dr. José Manuel Morales Tatay

Valencia, enero de 2022



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina

Programa de doctorado en medicina 3139

**DETECCIÓN DE NUEVOS MARCADORES ASOCIADOS A DAÑO POR REPERFUSIÓN Y FIBROSIS
EN INFARTO DE MIOCARDIO VALIDADOS HISTOPATOLÓGICAMENTE MEDIANTE ANÁLISIS
MULTIVARIANTE DE RESONANCIA MAGNÉTICA MULTIMODAL**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Itziar Pérez Terol (Licenciada en Biología)

Codirigida por: Dr. Vicente José Bodí Peris

Dr. Daniel Monleón Salvadó

Dr. José Manuel Morales Tatay

Valencia, enero de 2022

INFORME DIRECTORS/AS, TUTOR/A PER A DIPÒSIT DE TESI

Director (es) / Codirector (es):

- 1.- Cognoms, Nom: **Bodí Peris**, N.I.F: 29018152-H
Vicente José Departament/Institut: **Medicina**
Centre: Facultat de Medicina i Odontologia
- 2.- Cognoms, Nom: **Monleón Salvadó**, N.I.F: 29179910-V
Daniel Departament/Institut: **Patologia**
Centre: Facultat de Medicina i Odontologia
- 3.- Cognoms, Nom: **Morales Tatay**, N.I.F: 52649917-L
José Manuel Departament/Institut: **Patologia**
Centre: Facultat de Medicina i Odontologia

Com a director (a) /codirector (a) de la tesi doctoral “**Detección de nuevos marcadores asociados a daño por reperfusión y fibrosis en infarto de miocardio validados histopatológicamente mediante análisis multivariante de resonancia magnética multimodal**” de D/D^a **Itziar Pérez Terol**, estudiant del programa de doctorat **3139 Medicina (RD99/2011)**, de la Universitat de València, emeten informe **favorable** (*favorable/desfavorable*) per a la realització del dipòsit i defensa de la tesi doctoral.

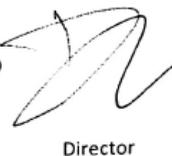
Data: València, 28 de gener de 2022

Signat: Dr. Vicente Bodí Peris



Director

Signat: Dr. Daniel Monleón Salvadó



Director

Signat: Dr. José Manuel Morales Tatay



Director

ESCOLA DOCTORAL

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directores por ofrecerme la oportunidad de avanzar en mi carrera profesional y enseñarme los entresijos de esta profesión. Entré con una idea muy romántica sobre la investigación, y salgo con una percepción más realista acerca de este sector, pero con las mismas ganas de generar conocimiento y aportar soluciones con las que entré.

Gracias también a todas las personas de mi entorno que me han acompañado durante este sinuoso pero excitante camino que es el doctorado. Han sido años con muchos altibajos, de lidiar con muchas emociones, desde la ilusión hasta la frustración, sin duda, esta experiencia supera con creces hasta a la mejor de las montañas rusas del mundo. Sois muchos y muchas a los que os estaré eternamente agradecida, tanto por compartir buenos momentos como por alentarme a continuar cuando vivía en una nube de cortisol. Gracias por no dejarme bajar del vagón y animarme a seguir. Tengo la suerte de estar rodeada por personas maravillosas.

Esta etapa no ha sido fácil, muchas veces ni siquiera ha sido bonita, pero ha valido la pena. Ahora puedo decir que me ha servido para crecer como investigadora y como persona.

A todos vosotros y a todas vosotras, muchísimas gracias por seguir a mi lado, incluso durante la tempestad.

A los futuros doctorandos, ¡ánimo!

“No fracasé, sólo descubrí 999 maneras de cómo no hacer una bombilla”

-Thomas Alva Edison-

PUBLICACIONES

La realización de esta tesis doctoral ha dado como fruto la publicación de un artículo y ha contribuido en el contenido de otro:

- Perez-Terol, I., Rios-Navarro, C., de Dios, E., Morales, J. M., Gaviria, J., Perez-Sole, N., Diaz, A., Minana, G., Segura-Sabater, R., Bonanad, C., Bayés-Genis, A., Husser, O., Monmeneu, J. V., Lopez-Lereu, M. P., Nunez, J., Chorro, F. J., Ruiz-Sauri, A., Bodi, V., & Monleon, D. (2019). Magnetic resonance microscopy and correlative histopathology of the infarcted heart. *Scientific reports*, 9(1), 20017. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56436-5>
- Hervas, A., Ruiz-Sauri, A., Gavara, J., Monmeneu, J. V., de Dios, E., Rios-Navarro, C., Perez-Sole, N., Perez, I., Monleon, D., Morales, J. M., Minana, G., Nunez, J., Bonanad, C., Diaz, A., Vila, J. M., Chorro, F. J., & Bodi, V. (2016). A Multidisciplinary Assessment of Remote Myocardial Fibrosis After Reperfused Myocardial Infarction in Swine and Patients. *Journal of cardiovascular translational research*, 9(4), 321–333. <https://doi.org/10.1007/s12265-016-9698-9>

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	INFARTO DE MIOCARDIO.....	1
1.1.1	EPIDEMIOLOGÍA Y DEFINICIÓN.....	1
1.1.2	FISIOPATOLOGÍA.....	1
1.1.3	EVALUACIÓN DEL MIOCARDIO POR TÉCNICAS DE IMAGEN: FOCO EN LA RESONANCIA MAGNÉTICA CARDIOVASCULAR (RMC).....	5
1.2	RMN.....	8
1.2.1	FUNDAMENTOS FÍSICOS.....	9
1.2.1.1	ECUACIONES DE BLOCH.....	12
1.2.1.1.1	ECUACIONES DE BLOCH EN PRESENCIA DE DIFUSIÓN.....	13
1.2.1.2	FENÓMENO DE RELAJACIÓN.....	15
1.2.1.2.1	PROCESO LONGITUDINAL T ₁	16
1.2.1.2.2	PROCESOS TRANSVERSALES T ₂ Y T ₂ *.....	17
1.2.2	FUNCIONAMIENTO DEL EQUIPO DE RM.....	18
1.2.2.1	IMÁN DEL CAMPO PRINCIPAL.....	19
1.2.2.2	EMISOR DE RF.....	19
1.2.2.3	RECEPTOR DE LA SEÑAL.....	20
1.2.2.4	SISTEMA DE GRADIENTES.....	20
1.2.2.5	ESPÍN-ECO.....	22
1.2.3	POTENCIACIÓN DE LAS IMÁGENES EN RM.....	24
1.2.4	CONTRASTE EN RM.....	24
1.2.4.1	TIEMPO DE REPETICIÓN Y TIEMPO DE ECO.....	25
1.2.5	RECONOCIMIENTO DE ESTRUCTURAS POR RMN.....	25
1.3	Microscopía de resonancia magnética (MRM).....	26
1.3.1	POTENCIAL BIOMARCADOR.....	27

2	HIPÓTESIS	29
3	OBJETIVOS	31
4	MATERIAL Y MÉTODOS	33
4.1	DISEÑO DEL ESTUDIO	33
4.1.1	MODELO PORCINO DE IM	33
4.1.2	FLUJO DE TRABAJO	35
4.2	METODOLOGÍA	38
4.2.1	SELECCIÓN DE MUESTRAS	38
4.2.2	MRM	39
4.2.3	HISTOPATOLOGÍA	44
4.2.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
4.2.5	QUIMIOMETRÍA MULTIVARIANTE Y MAPAS PARAMÉTRICOS	47
5	RESULTADOS	53
5.1	DESARROLLO DE METODOLOGÍA DE IMAGEN DE ALTO CAMPO E HISTOPATOLOGÍA CORRELATIVA PARA PLATAFORMAS DE VALIDACIÓN DE MARCADORES DE MRM EN IMAGEN CARDÍACA	53
5.1.1	METODOLOGÍA DE MRM E HISTOPATOLOGÍA CORRELATIVA	53
5.1.1.1	DELIMITACIÓN DE LA ZONA DE INFARTO	54
5.1.1.2	ADQUISICIÓN DE MRM	58
5.1.1.3	HISTOLOGÍA CORRELATIVA	58
5.1.1.3.1	MODELO DE IM EN FASE AGUDA	59
5.1.1.3.2	MODELO DE IM EN FASE CRÓNICA	61
5.1.2	VALIDACIÓN DE MARCADORES DE IRM EN IMAGEN CARDÍACA	63
5.1.2.1	MODELO DE IM EN FASE AGUDA	63
5.1.2.2	MODELO DE IM EN FASE CRÓNICA	68
5.2	ANÁLISIS MULTIVARIANTES PARA DISCRIMINAR EL DAÑO MIOCÁRDICO EN FASE AGUDA Y EN FASE CRÓNICA TRAS UN INFARTO	73
5.2.1	MODELOS PARAMÉTRICOS MULTIVARIABLES	73

5.2.1.1	MODELO INICIAL PARA LA FASE CRÓNICA POST-IM	73
5.2.1.2	MODELO INICIAL PARA LA FASE AGUDA POST-IM	82
5.2.1.3	MODELOS FINALES PARA LA FASE AGUDA Y CRÓNICA POST-IM.....	91
5.2.2	MAPAS PARAMÉTRICOS	96
5.2.2.1	MODELO DE IM EN FASE AGUDA	96
5.2.2.2	MODELO DE IM EN FASE CRÓNICA.....	99
6	DISCUSIÓN.....	101
6.1	DESARROLLO DE METODOLOGÍA DE IMAGEN DE ALTO CAMPO E HISTOPATOLOGÍA CORRELATIVA PARA PLATAFORMAS DE VALIDACIÓN DE MARCADORES DE MRM EN IMAGEN CARDÍACA.....	101
6.2	ANÁLISIS MULTIVARIANTES PARA DISCRIMINAR EL DAÑO MIOCÁRDICO EN FASE AGUDA Y EN FASE CRÓNICA TRAS UN INFARTO DE MIOCARDIO	108
7	CONCLUSIONES.....	117
8	BIBLIOGRAFÍA	119
9	ANEXOS.....	133

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADC: Coeficiente de difusión aparente.

AUC: Área bajo la curva.

ADA: Arteria coronaria descendente anterior izquierda.

B: Campo magnético.

ECG: Electrocardiograma.

FoV: Marco de visión.

FSN: Fibrosis sistémica nefrogénica.

HE: Hematoxilina-eosina.

HIM: Hemorragia intramiocárdica.

I: Momento angular o espín.

IM: Infarto de miocardio.

IRM: Imagen por resonancia magnética.

ISA: Análisis de secuencia de imágenes.

LV: Variable latente.

M: Magnetización.

MGE: *Multigradient echo*.

MRM: Microimagen por resonancia magnética.

MSC: Corrección de dispersión multiplicativa.

MSME: *Multi-slice multi-echo*.

OMV: Obstrucción microvascular.

PC: Componente principal.

PCA: Análisis de componentes principales.

PLS-DA: Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales.

PQN: Normalización del cociente probabilístico.

RARE: *Rapid acquisition with relaxation enhancement*.

RF: Radiofrecuencia.

RMC: Resonancia magnética cardiovascular.

RMN o RM: Resonancia magnética nuclear.

ROI: Región de interés.

ROC: Característica operativa del receptor.

RTG: Realce tardío de gadolinio.

SNR: Ratio señal/ ruido.

SNV: Variable normal estándar.

STIR: *Short-tau inversion-recover*.

TE: Tiempo de eco.

TR: Tiempo de repetición.

TS: Tioflavina-S.

TTZ: Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio.

VIP: Importancia de la variable en la proyección.

LISTA DE TABLAS

Tabla I1. Contraste en las imágenes de resonancia magnética.

Tabla M1. Protocolo de adquisición para las muestras de tejido de corazón del modelo de IM en fase aguda y en fase crónica.

Tabla R1. Delimitación de los distintos grados de lesión tisular en el infarto de miocardio según las tinciones de TS y TTZ.

Tabla R2. Media y desviación estándar para la ratio señal/ruido de las imágenes potenciadas en T1, T2, Y T2* de los modelos porcinos de IM en fase aguda y crónica, y del control.

Tabla R3. Resultados para la prueba T de Dunnett (bilateral) para el modelo de IM en fase aguda.

Tabla R4. Resultados para la prueba T de Dunnett (bilateral) para el modelo de IM en fase crónica.

Tabla R5. Combinaciones probadas de variables magnéticas empleadas en la construcción de modelos discriminativos entre los tejidos a estudio.

LISTA DE FIGURAS

Figura I1. Evolución del infarto de miocardio.

Figura I2. Imágenes de RMC con RTG para un IM en fase aguda y en fase crónica.

Figura I3. Momento magnético del protón.

Figura I4. Comportamiento de la magnetización a un campo magnético aplicado.

Figura I5. Comportamiento de la magnetización al añadir una perturbación al campo magnético principal.

Figura I6. Procesos de relajación de las distintas componentes de la magnetización.

Figura I7. Transferencia de energía entre espines.

Figura I8. Gradiente G_z .

Figura I9. Gradiente G_y .

Figura I10. Comportamiento de la magnetización en el fenómeno eco-espín y esquema del proceso.

Esquema M1. Flujo de trabajo.

Esquema M2. Proceso de construcción de la matriz multivariable de la IRM para la validación del modelo PLS-DA.

Esquema M3. Proceso de construcción de los mapas paramétricos.

Figura R1. Delimitación de las regiones a estudio en el IM en fase aguda (arriba) y crónica (abajo).

Figura R2. Imágenes representativas de microscopía óptica a 20X del tejido miocárdico aislado de los grupos de IM en fase aguda.

Figura R3. Imágenes representativas de la correlación entre cortes histológicos y las IRM de las tres condiciones de tejido cardíaco consideradas en el IM en fase aguda.

Figura R4. Imágenes representativas de la correlación entre cortes histológicos y las IRM de las tres condiciones de tejido cardíaco consideradas en el IM en fase crónica.

Figura R5 a. Diagramas de cajas y tablas Kruskal-Wallis para el modelo de IM en fase aguda.

Figura R5 b. Diagramas de cajas y tablas Kruskal-Wallis para el modelo de IM en fase aguda.

Figura R6 a. Diagramas de cajas y tablas Kruskal-Wallis para el modelo de IM en fase crónica.

Figura R6 b. Diagramas de cajas y tablas Kruskal-Wallis para el modelo de IM en fase crónica.

Figura R7. PCA evaluados en el modelo de IM en fase crónica.

Figura R8. PCA del modelo de IM en fase crónica.

Figura R9. PLS-DA inicial del modelo de IM en fase crónica.

Figura R10. Curvas ROC del PLS-DA inicial del modelo de IM en fase crónica.

Figura R11. PLS-DA inicial del modelo de IM en fase crónica por pares y sus diagramas VIP scores.

Figura 12. PCA del modelo de IM en fase aguda.

Figura R13. PLS-DA inicial del modelo de IM en fase aguda.

Figura R14. Curvas ROC del PLS-DA inicial del modelo de IM en fase aguda.

Figura R15. PLS-DA inicial del modelo de IM en fase aguda por pares y sus diagramas VIP scores.

Figura R16. PLS-DA final del modelo de IM en fase crónica.

Figura R17. Curvas ROC del PLS-DA final del modelo de IM en fase crónica.

Figura R18. PLS-DA final del modelo de IM en fase aguda.

Figura R19. Curvas ROC del PLS-DA final del modelo de IM en fase aguda.

Figura R20. Evolución de los mapas paramétricos del modelo de IM en fase aguda.

Figura R21. Evolución de los mapas paramétricos del modelo de IM en fase crónica.

RESUMEN

La resonancia magnética cardiovascular (RMC) con realce tardío es la técnica de referencia para la evaluación no invasiva del daño cardíaco después de un infarto de miocardio (IM). Sin embargo, la interpretación de estas imágenes en términos de daño tisular es aún complicado y el uso de agentes de contraste en esta técnica está contraindicado en un amplio sector de la población con insuficiencia renal crónica. La microscopía de resonancia magnética (MRM) proporciona un nivel de detalle comparable al objetivo macroscópico de la microscopía óptica. Por ello, podría ser una herramienta muy útil en la interpretación de la imagen de RMC y en la identificación de nuevos marcadores de imagen de resonancia en el IM.

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es caracterizar, utilizando la MRM e histopatología correlativa, el tejido miocárdico en las regiones remota, adyacente e infartada en corazones porcinos con IM en fase aguda (1 semana) y en fase crónica (1 mes), y de corazones sanos mediante MRM multiseuencia sin hacer uso de ningún agente de contraste exógeno.

Se estableció un grupo control (n= 3 animales) y dos grupos experimentales de IM: 90 min de isquemia seguida de 1 semana tras perfusión (IM en fase aguda, n= 6 animales) o 1 mes tras perfusión (IM en fase crónica, n= 5 animales). La MRM se realizó en un espectrómetro de campo ultra alto de eje vertical de 14,1 Tesla (Bruker Avance III 600). Las distintas regiones representativas del corazón infartado (remoto, adyacente e infarto) se analizaron mediante varias secuencias de RMN: imágenes potenciadas en T1, imágenes potenciadas en T2,

imágenes potenciadas en T2*, mapeo T2, mapeo T2* y coeficiente de difusión aparente (ADC).

Los cortes histopatológicos de las mismas muestras adquiridas con MRM permitieron identificar estructuras y relieves que contribuyeron a realizar una caracterización adecuada del tejido a estudio. Las imágenes de MRM revelaron diferencias de intensidad de señal para los diferentes componentes estructurales y anatómicos del tejido de IM en fase aguda y los de IM en fase crónica (valor $p < 0,05$), pudiendo identificar con un elevado grado de detalle tanto el tipo de región al que pertenecían como el grado de daño tisular. Los modelos multivariantes permitieron clasificar con precisión las regiones de interés (IM en fase aguda: especificidad 93 % y sensibilidad 80 %; IM en fase crónica: especificidad 100 % y sensibilidad 98 %). Los mapas probabilísticos basados en nuestros modelos de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) delinearon claramente las regiones remotas e infartadas.

Estos resultados ilustran el potencial de MRM contrastada con histopatología correlativa como plataforma para explorar nuevos biomarcadores de RMN sin uso de agentes de contraste exógenos tras un IM.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 INFARTO DE MIOCARDIO

1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y DEFINICIÓN

Las enfermedades coronarias son la primera causa de muerte a nivel mundial (1). En Europa causan cada año unos 4 millones de fallecimientos, lo que supone el 47 % de todas las muertes. En España, según datos del Instituto Nacional de Estadística, el 31 % de las defunciones se deben a cardiopatía isquémica. Dentro de éstas, el infarto de miocardio (IM) es la de mayor prevalencia y supone un importante problema en el sistema de salud público (2). Como consecuencia del envejecimiento de la población, y a pesar de los esfuerzos realizados en investigación (3), los avances en el tratamiento temprano y las mejoras en su monitorización, la morbilidad y mortalidad en occidente por esta patología sigue al alza (4).

La definición de IM ha variado con el tiempo. En 2018, la acción conjunta de diferentes organismos a nivel mundial en el ámbito de la cardiología definió el IM como “un evento clínico o patológico en el contexto de enfermedad miocárdica isquémica (síntomas isquémicos, cambios isquémicos en el ECG, intervención de una arteria coronaria, nuevas anomalías del movimiento de la pared o defectos fijos en la exploración con radioisótopos) en los que hay evidencia de muerte de células miocárdicas” (5).

1.1.2 FISIOPATOLOGÍA

La causa principal de un IM es la oclusión completa del lumen de una arteria coronaria ocasionada por el desprendimiento de un trombo que se desarrolla a partir de la rotura de una placa de ateroma inestable (6). Los depósitos de

lipoproteínas de baja densidad promueven la liberación de sustancias proinflamatorias que favorecen la formación de estas placas (3), que, con el tiempo, se endurecen y reducen la luz de la arteria, limitando la cantidad de sangre que llega al miocardio. La disminución del volumen sanguíneo produce un aporte pobre de nutrientes y oxígeno a las células cardíacas, estableciendo un cuadro isquémico en el territorio irrigado por dicha arteria (5).

El infarto cardíaco progresa como un frente de onda desde el endocardio hacia el epicardio. Inmediatamente después de suspenderse el suministro de oxígeno, se producen los primeros cambios bioquímicos y funcionales (3). En el interior de los cardiomiocitos las reservas de ATP se agotan rápidamente produciendo la acumulación de residuos metabólicos como el lactato que acidifican el citoplasma. Al mismo tiempo las especies reactivas de oxígeno aumentan la permeabilidad de la membrana mitocondrial, que acabará por desintegrarse (7), incrementando aún más el desequilibrio iónico entre el interior de la célula y la matriz extracelular, y, por ende, disminuirá el potencial de acción (8).

Esta situación, junto al aumento de la permeabilidad capilar, promueve la extravasación de líquido al espacio intersticial y al interior de las células (9, 10). Si no se revierte rápidamente este escenario, el territorio isquémico se verá gravemente comprometido. Por lo que la respuesta inmunológica innata entra en acción tan pronto como las señales de alerta liberadas desde los cardiomiocitos isquémicos a la matriz extracelular son detectadas (8). Los fragmentos de células necrosadas también actúan como señal de alarma para la activación del complemento y el reclutamiento de células inflamatorias, en orden de llegada, neutrófilos, monocitos, y finalmente linfocitos (11, 12).

En los primeros 3 días tras el IM, después de iniciarse la necrosis celular, se produce una intensa inflamación (fase inflamatoria) e infiltración miocárdica de

neutrófilos y monocitos que activarán la apoptosis de células dañadas. Entre el 4° y 7° día, empieza la fase de transición hacia un estado de reparación, donde la inflamación se resuelve, los monocitos y los macrófagos limpian la zona de detritos celulares y restos matriciales, las células dendríticas también fagocitan parte de estos restos para presentárselas a los linfocitos T y movilizarlos hacia la zona dañada. Asimismo, los miofibroblastos proliferan, promoviendo la deposición de proteínas de la matriz extracelular: colágeno, actina, fibrina y fibronectina. En la última fase, la de maduración, las células inflamatorias desaparecen y la cicatriz sufre un proceso de maduración caracterizado por el depósito de colágeno y la quiescencia de los miofibroblastos (10, 11) (figura 11 adaptada de (6)).

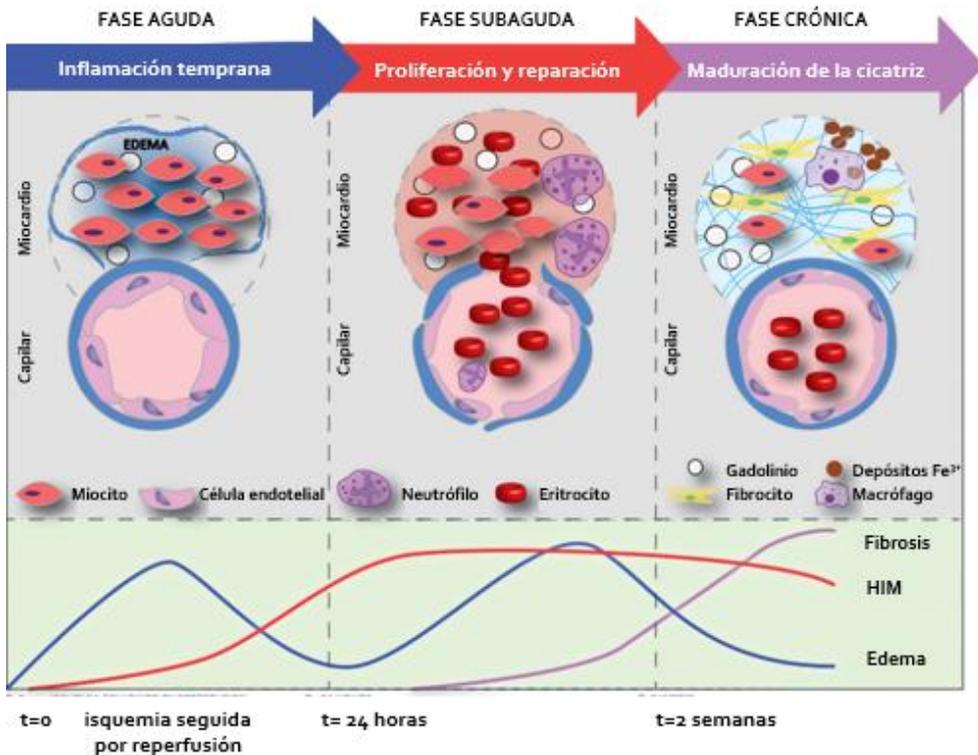


Figura 11. Evolución del infarto de miocardio. Procesos fisiopatológicos y celulares que se producen desde las fases iniciales del IM (fase aguda) hasta su fase de maduración (fase crónica). El tejido necrótico del infarto desencadena a su alrededor primero una reacción inflamatoria, que a partir de las 24 horas se manifiesta en una infiltración leucocitaria. La liberación de enzimas leucocitarios contribuye a la lisis del tejido necrótico. En la segunda mitad de la primera semana se produce una proliferación de macrófagos que inician la eliminación de los detritos. Aproximadamente después de una semana aparece tejido granuloso alrededor del infarto. A medida que avanza el proceso de reabsorción y reparación en la zona infartada, este tejido es reemplazado por una cicatriz fibrótica. Figura adaptada de (6). IM= Infarto de miocardio; HIM= Hemorragia Intramiocárdica; t= tiempo.

1.1.3 EVALUACIÓN DEL MIOCARDIO POR TÉCNICAS DE IMAGEN: FOCO EN LA RESONANCIA MAGNÉTICA CARDIOVASCULAR (RMC)

El diagnóstico precoz y la reperfusión inmediata son las formas más eficaces de limitar la extensión del infarto y maximizar el miocardio viable (7).

Tras el diagnóstico de IM mediante la presentación clínica, los cambios en el ECG y la elevación de biomarcadores séricos como la troponina ultrasensible, (2) se realiza la reperfusión coronaria. La restauración del flujo sanguíneo al miocardio isquémico idealmente mediante la intervención coronaria percutánea primaria ayuda a salvar parte del miocardio isquémico y disminuye el tamaño final de tejido necrosado. En consecuencia, el período comprendido entre el inicio de los síntomas y el restablecimiento del flujo coronario es un factor crucial en la evolución del paciente a corto y largo plazo (8-10).

Las técnicas de imagen juegan un papel esencial en la evaluación miocárdica tras la revascularización y el pronóstico del paciente. La amplia gama de técnicas de imágenes que existen (ecocardiografía, tomografía por emisión de positrones, tomografía computarizada, y la RMC) permiten detectar los diversos grados de afección tisular (7, 11).

De todas ellas, la RMC es la técnica de imagen más utilizada para la evaluación no invasiva de las diferentes etapas del IM (12, 13). Presenta varias ventajas sobre otras modalidades de imagen: no es invasiva ni ionizante (14), tiene capacidades de reconstrucción multiplanar (15), proporciona alta resolución espacial y alto contraste entre tejidos blandos, y permite obtener imágenes anatómo-funcionales y cambios moleculares en una única sesión (16). Sin embargo, la utilización de agentes de contraste externos limita su uso, ya que aumenta la duración de los estudios, puede producir efectos secundarios, y está contraindicada en pacientes con insuficiencia renal crónica (17, 18).

Como cualquier otra técnica de imagen, la RMC requiere de un amplio conocimiento de las estructuras anatómicas y de la fisiología cardíaca (19). Cada secuencia de un estudio de RMC proporciona una información específica que, cuando se toman en conjunto, resuelve la estructura cardíaca completa (20). El protocolo básico de evaluación cardíaca se compone de: secuencias CINE, secuencias *short tau inversion recovery* (STIR) (21), y secuencias de realce tardío con gadolinio (RTG) (22).

Las imágenes CINE permiten evaluar la morfología y la función cardíaca (23). Con las imágenes STIR podemos determinar el edema de la fase aguda del IM (21). Las imágenes con RTG se utilizan para resaltar las zonas de necrosis y fibróticas, así como para determinar la obstrucción microvascular (OMV) (6).

De todas ellas, las imágenes con RTG (figura 12) tienen una especial importancia, puesto que su alta resolución espacial permite medir el tamaño del infarto y determinar la extensión transmural del mismo (22, 24, 25). Además, permiten evaluar también la OMV. Se basa en el equilibrio entre el aumento del volumen de distribución del contraste en el intersticio y la disminución de la velocidad del lavado. En el IM en fase aguda, se producen zonas hipointensas allá donde hay OMV, puesto que no deja fluir al contraste. En el IM en fase crónica, la baja densidad capilar dentro del tejido fibrótico miocárdico produce una acumulación del contraste que provoca un acortamiento del tiempo de relajación T₁, y que se traduce en una señal hiperintensa de esa región. En el miocardio normal el lavado es mucho más rápido y la señal es nula. Por lo que la discriminación entre ambas condiciones depende de una adecuada elección de los parámetros de cada secuencia para extraer el máximo contraste entre regiones miocárdicas (14).

IMAGEN DE RTG DE IM EN FASE AGUDA

IMAGEN DE RTG DE IM EN FASE CRÓNICA

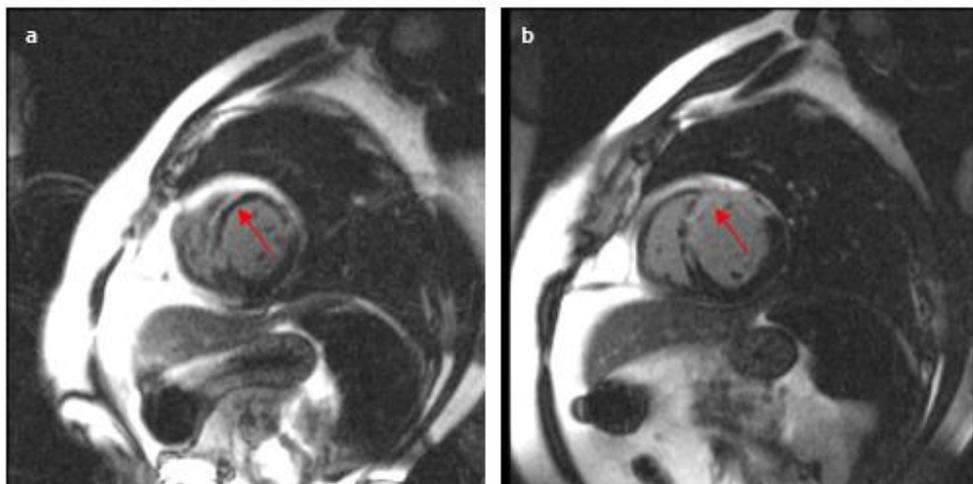


Figura 12. Imágenes de RMC con RTG para un IM en fase aguda y en fase crónica. En el IM en fase aguda (a), la OMV se observa hipointenso dentro de la zona de infarto (con captación de contraste) en las imágenes de RMC con RTG a la semana del evento, mientras que en fase crónica (b) la cicatriz fibrótica se realza hiperintensa en el estudio realizado a los 6 meses. Se indica con una flecha roja el lugar del infarto. RMC= Resonancia magnética cardiovascular; RTG= Realce tardío de gadolinio; IM= Infarto de miocardio; OMV= Obstrucción microvascular.

Recientemente se han incorporado a la práctica clínica nuevas secuencias que permiten una valoración cuantitativa de los tiempos de relajación T1 y T2 (mapa T1 nativo, mapa T2 y mapa T2*) de cada píxel en una escala estandarizada para caracterizar el tejido miocárdico (26, 27). Los mapas T1 nativo están en auge ahora por sus múltiples implicaciones sin necesidad de contraste. Los mapas de T2 se utiliza en la detección y cuantificación del edema, mientras que los mapas de T2* sirve para detectar hemorragias (28).

A pesar del diseño de nuevas secuencias, y los beneficios proporcionados por el contraste endógeno de las imágenes potenciadas en T1, T2 y T2*, la RMC con RTG sigue siendo la herramienta de rutina en las imágenes postinfarto.

En contra, el hecho de que los pacientes con insuficiencia renal crónica no puedan acceder a esta tecnología por tener un elevado riesgo de sufrir fibrosis sistémica nefrogénica (FSN) como consecuencia del metal utilizado en el contraste, y que más de la mitad de los pacientes con IM desarrollan insuficiencia renal (29), hace necesario invertir en nuevas estrategias que prescindan de contraste exógeno con metales pesados.

Por tanto, parece importante avanzar hacia biomarcadores de RMC validados histológicamente que no requieran medios de contraste exógenos para delimitar la zona de infarto.

1.2 RMN

La historia de la RMN está llena de Premios Nobel. Comenzó en 1933, cuando Otto Stern midió los momentos magnéticos de un protón interaccionando con un campo magnético (Premio Nobel de Física 1943). Siguiendo con este hilo, Isaac Rabi (Premio Nobel de Física 1944) y su equipo descubrieron que la interacción medida por Stern era máxima para determinados valores de frecuencia en dicho campo (frecuencia de resonancia), y que cada átomo tenía una frecuencia de resonancia propia (30). Tras la Segunda Guerra Mundial, Edward Purcell y Felix Bloch (Premio Nobel de Física 1952) extrapolaron los descubrimientos de Rabi a moléculas de líquidos y sólidos (31). Finalmente, las bases físicas de la RMN quedaron establecidas con el descubrimiento del desplazamiento químico (32) y de los ecos de espín (33). En 1966, Richard Ernst (Premio Nobel 1991) demostró que era posible mejorar sustancialmente la sensibilidad para generar espectros de RMN a partir de muestras inorgánicas, orgánicas y, en última instancia, materiales biológicos, aplicando la transformada de Fourier a RMN. Más tarde, Lauterbur introdujo los gradientes de campo y Mansfield asentó las bases de las imágenes de alta velocidad con las imágenes eco- planares (Premio Nobel de Medicina y Fisiología 2003) (13). Gracias a todos

ellos, hoy en día disponemos de una tecnología de gran resolución y sensibilidad, que permite desarrollar estudios en un gran número de campos (34).

1.2.1 FUNDAMENTOS FÍSICOS

La materia está formada por átomos, que a su vez están compuestos de partículas: electrones, protones y neutrones. Los átomos tienen características intrínsecas, como el número atómico, el peso atómico o el momento angular de espín (o espín), cuyos valores dependen de su composición particular.

La resonancia magnética (RM) se basa en el análisis de la interacción entre las partículas que poseen espín y electrones desapareados, es decir, aquellos núcleos con número atómico impar como el ^1H , el ^{13}C , el ^{15}N , el ^{19}F , o el ^{31}P . Se dice que estos núcleos tienen número cuántico de espín nuclear (I) distinto de 0, y esta propiedad los hace magnéticamente activos. De entre los núcleos con $I = \frac{1}{2}$ mencionados anteriormente, la RM mide la relajación de los núcleos de hidrógeno, ya que están formados por un único protón y representa una proporción elevada en los tejidos del cuerpo humano (35).

El espín de un protón es el movimiento de rotación que tiene una partícula sobre su propio eje. Sólo por el hecho de estar girando sobre sí mismo, el protón posee un cierto momento angular en la dirección de su eje de rotación. Por otro lado, toda partícula cargada en movimiento genera un campo magnético, caracterizado por su momento magnético (μ), que es un vector paralelo al eje de rotación del protón y también a la dirección del campo generado (figura 13).

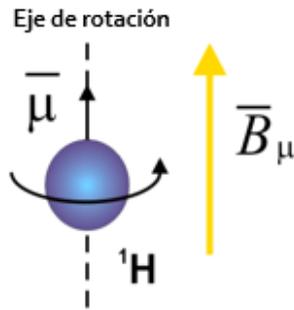


Figura I3. Momento magnético del protón. μ = momento magnético; ^1H = protón; B = dirección del campo magnético aplicado.

Normalmente, en un volumen de tejido los protones estarán girando de manera aleatoria con los espines orientados de manera arbitraria, y su magnetización (M) neta será nula. Cuando los protones son sometidos a la fuerza de un campo magnético externo (B_0), reorientan sus espines en la dirección de este campo, de manera paralela o antiparalela. De este modo M pasa a ser paralela, dado que hay una mayor cantidad de espines orientados en el mismo sentido que el campo B_0 (figura I4).

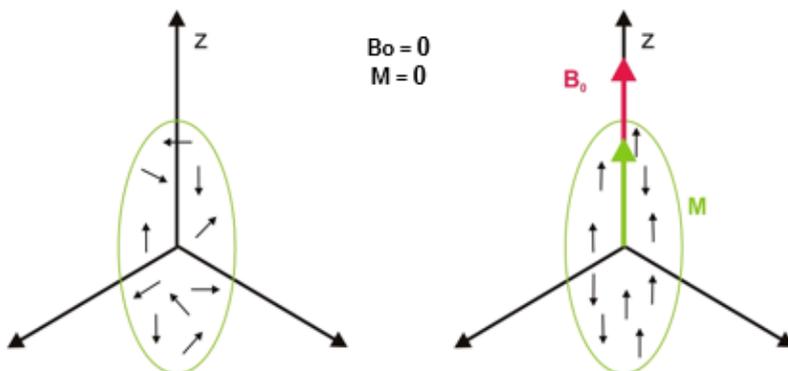


Figura I4. Comportamiento de la magnetización a un campo magnético aplicado. En la naturaleza los núcleos se orientan arbitrariamente, pero cuando están bajo la influencia de un campo magnético más fuerte, se orientan en sentido paralelo y antiparalelo con éste. B_0 = campo magnético; M = magnetización.

Al aplicar otro campo magnético más potente (B_1), conocido como pulso de radiofrecuencia (RF), M tiende a alinearse con el campo resultante ($B = B_0 + B_1$). Cuando B_1 desaparece, M vuelve a su estado inicial mediante un movimiento de precesión (figura I5).

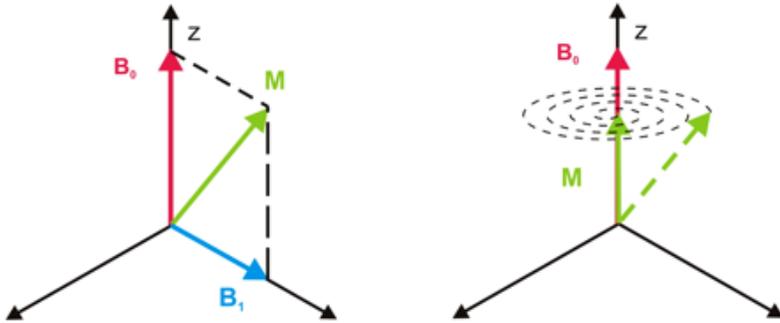


Figura I5. Comportamiento de la magnetización al añadir una perturbación al campo magnético principal. Al aplicar un campo magnético externo B_1 más potente que B_0 , los núcleos se reorientan hacia éste, y vuelven a su estado inicial con un movimiento de precesión cuando se elimina el estímulo perturbador. B_0 = campo magnético principal; B_1 = campo magnético externo o pulso de radiofrecuencia; M = Magnetización.

Un momento magnético μ que se encuentra inmerso en un campo magnético B , sufre un par de fuerzas (τ) que viene dado por la fórmula I1:

$$\bar{\tau} = \bar{\mu} \times \bar{B} \quad (I1)$$

Teniendo en cuenta que la razón de cambio del momento angular I de un sistema es igual a la torsión que actúa sobre el sistema, entonces se cumple que:

$$\bar{\tau} \propto d\bar{I}/dt \quad (I2)$$

Esto implica que el cambio infinitesimal en el momento angular I tiene la misma dirección que el torque. Además, como τ es perpendicular a I , entonces la

derivada de \vec{I} también lo será. Esto implica que el vector momento angular, así como el eje de rotación, cambia su dirección, pero no su módulo. Por otra parte, debido a los procesos de disipación de la energía, el torque va desapareciendo, con lo que el vector magnetización volverá progresivamente a su estado inicial, generándose un movimiento en espiral. La frecuencia (ω) de este movimiento viene expresada por la frecuencia de Larmor (13), donde γ es la constante giromagnética y B_0 el vector del campo magnético principal.

$$\omega_0 = \gamma |\vec{B}_0| \quad (13)$$

Este movimiento de precesión es la base de la técnica empleada para obtener información mediante la RM.

1.2.1.1 ECUACIONES DE BLOCH

El modelo clásico sólo puede interpretar una parte del fenómeno de resonancia, pero no puede explicar la interacción entre núcleos. En 1946, el físico suizo Felix Bloch consiguió resolver este problema, y describió el comportamiento de la magnetización en presencia de un campo magnético externo de la siguiente manera (36):

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = (\vec{M} \times \gamma \vec{B}) + \frac{\vec{M}_0 - \vec{M}_z}{T1} - \frac{\vec{M}_{xy}}{T2} \quad (14)$$

donde γ es el constante giromagnética, M_0 es la magnetización en ausencia de perturbación, y M_z y M_{xy} son las proyecciones de M sobre el eje Z y sobre el plano XY respectivamente (componentes longitudinal y transversal). Los dos últimos términos expresan la relajación de las distintas componentes de M , mientras que el primero, se refiere al movimiento de precesión del que hablábamos antes.

Bloch sugirió que, tras la aplicación de un pulso RF, la magnetización M vuelve a su estado de equilibrio debido a las perturbaciones térmicas, que afectan a M_z , y a las interacciones entre núcleos, que afectan a M_{xy} . La relajación para cada una de estas componentes viene dada por:

$$\overline{M}_z(t) = \overline{M}_{z0} \left(1 - e^{-t/T_1} \right) \quad (15)$$

$$\overline{M}_{xy}(t) = \overline{M}_{xy0} e^{-t/T_2} \quad (16)$$

Es decir, que la componente longitudinal M_z se relaja con un tiempo que viene dado por T_1 , y la transversal M_{xy} por un tiempo que viene dado por T_2 . Y por general se cumple que $T_2 \leq T_1$.

1.2.1.1.1 ECUACIONES DE BLOCH EN PRESENCIA DE DIFUSIÓN

La difusión es el fenómeno mediante el cual se produce un flujo de partículas entre una zona de alta concentración a otra de baja concentración. En este apartado nos centraremos en el análisis teórico de este fenómeno, descrito en (37).

Supongamos un volumen con un cierto momento magnético μ , y un campo magnético aplicado B con dirección única, y que n_{\pm} son las concentraciones de espines orientados positiva y negativamente según la dirección del campo.

Si este volumen diferencial está sometido a una cierta energía potencial U , ésta genera una fuerza $F = -\nabla U$ sobre las partículas, a lo que ellas responden moviéndose con una velocidad $v = \sigma^{-1} \cdot F$, siendo σ la conductividad. A consecuencia de esto y siguiendo el principio de la mínima energía, cuando se alcance el equilibrio, las partículas se habrán distribuido en las áreas de menor

potencial. Sin embargo, debido a la difusión, algunas se habrán alejado, apareciendo dos tipos de corrientes: corrientes derivadas, que llevan a las partículas a las zonas de menor potencial (fórmula 17), y corrientes de difusión, que tienden a dispersar las partículas (fórmula 18).

$$\bar{J}_D = n_{\pm} \bar{v}_{\pm} \quad (17)$$

$$\bar{J}_{Diff} = -D \bar{\nabla} n_{\pm} \quad (18)$$

Donde el signo negativo indica el sentido del flujo natural de las partículas (de mayor a menor potencial) y D es el coeficiente de difusión.

De manera compactada, la corriente total (35) viene dada por la fórmula 119:

$$\bar{J}_{\pm} = n_{\pm} \pm \mu \frac{D}{KT} \bar{\nabla} B_x - D \bar{\nabla} n_{\pm} \quad (119)$$

Por otro lado, la corriente neta en la dirección del campo viene dada por ($\bar{J}_+ - \bar{J}_-$), y puede demostrarse que (35):

$$\mu(\bar{J}_+ - \bar{J}_-) = -D \bar{\nabla}(M_x - M_{0x}) \quad (120)$$

También se demuestra que la tasa de incremento de la magnetización en la dirección x dentro del elemento de volumen y debido a la corriente de difusión viene dada por:

$$\int_V \left. \frac{\partial \bar{M}_x}{\partial t} \right|_{Diff} dV = \bar{\nabla} D \bar{\nabla}(M_x - M_{0x}) \Delta V \quad (121)$$

Esto también se aplica a las demás direcciones del espacio:

$$\frac{1}{\Delta V} \int_V \left. \frac{\partial \overline{M}_x}{\partial t} \right|_{Diff} dV = \overline{\nabla} D \overline{\nabla} (M_x - M_{0x}) \quad (122)$$

$$\frac{1}{\Delta V} \int_V \left. \frac{\partial \overline{M}_y}{\partial t} \right|_{Diff} dV = \overline{\nabla} D \overline{\nabla} (M_y - M_{0y}) \quad (123)$$

$$\frac{1}{\Delta V} \int_V \left. \frac{\partial \overline{M}_z}{\partial t} \right|_{Diff} dV = \overline{\nabla} D \overline{\nabla} (M_z - M_{0z}) \quad (124)$$

Esta es la cantidad que debe añadirse a las ecuaciones de Bloch si queremos tener en cuenta el efecto de la difusión (38).

1.2.1.2 FENÓMENO DE RELAJACIÓN

Anteriormente hablábamos de que los dos últimos términos de las ecuaciones de Bloch hacían referencia a los procesos de relajación de la magnetización: la relajación transversal experimentada por M_z , y la relajación longitudinal por M_{xy} . En la componente longitudinal tenemos un crecimiento exponencial con un tiempo característico T_1 , mientras que en la componente transversal se produce un decaimiento exponencial caracterizado por T_2 . Por lo que M_z y M_{xy} se relajan a velocidades distintas (39).

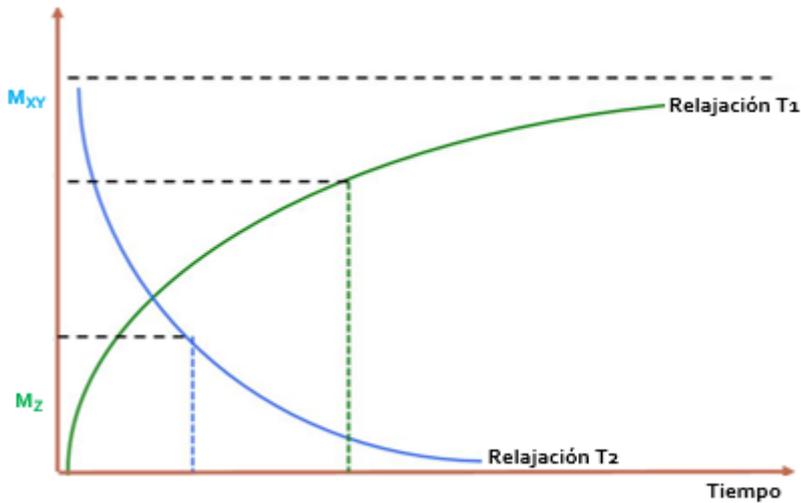


Figura 16. Procesos de relajación de las distintas componentes de la magnetización. El T_1 mide el tiempo que un tejido tarda en recuperar el 63 % de su magnetización longitudinal, es decir, los protones devuelven al entorno la energía absorbida. El T_2 mide el tiempo que tarda un tejido en perder el 63 % de la magnetización transversal adquirida tras el pulso de radiofrecuencia, es decir, los protones recuperan la coherencia de fase. Figura adaptada de (39). M_z = Magnetización Z; M_{xy} = Magnetización XY.

Explicado desde un punto de vista energético, la relajación es el proceso por el cual los protones liberan la energía que han absorbido del pulso de RF (40).

1.2.1.2.1 PROCESO LONGITUDINAL T_1

El tiempo de relajación T_1 es el tiempo que tarda la componente Z de la magnetización en recuperarse un 63 % tras el pulso de RF. También se le llama tiempo de relajación longitudinal o tiempo de relajación espín-red. En la relajación T_1 el protón en estado excitado transmite su energía a su entorno. En los alrededores del protón excitado existe un movimiento molecular con frecuencia ω_L , que cuanto más próximo se encuentra de ω_0 , con más facilidad se transferirá la energía desde los protones hacia sus alrededores, y antes volverán a su estado inicial.

En los tejidos, la estructura proteica o la posible presencia de iones metálicos en los tejidos infieren directamente en ω_L . Aunque cada tejido tiene una estructura particular, se cumple que, para la mayor parte de las proteínas esta frecuencia es del orden de 1 MHz. Así pues, a frecuencias de resonancia bajas como las que tienen los campo B_0 poco intenso, existe una concordancia mayor entre ω_L y ω_0 y, en consecuencia, T_1 es más corto. Esto explica por qué T_1 es dependiente de la frecuencia.

Los protones sólo son capaces de absorber una cantidad de energía limitada. Cuando esto ocurre se llega a la saturación. El vector magnetización rotará alrededor de B_0 e irá disminuyendo su módulo poco a poco hasta desaparecer cuando los niveles de ambas poblaciones se igualen y, por ende, la señal también desaparezca.

Para evitar la saturación del sistema la RF se emite en pulsos. De esta manera, los protones excitados pueden ir liberando la energía, y absorberla de nuevo en el siguiente pulso. Cuanto más se recupere M , mayor será la señal generada.

1.2.1.2.2 PROCESOS TRANSVERSALES T_2 Y T_2^*

El tiempo de relajación T_2 es el tiempo que tarda la componente XY de la magnetización en recuperarse un 37 % tras el pulso de RF. También se llama tiempo de relajación transversal o tiempo de relajación espín-espín. Cuando los protones ya han absorbida la energía del pulso RF, cada uno de ellos está precesionando a la misma frecuencia (ω_0) y todos tienen la misma fase. Esta semejanza entre el estado de los protones hace que la energía liberada pueda ser absorbida por cualquiera de los protones colindantes que tengan la misma frecuencia (figura 17).

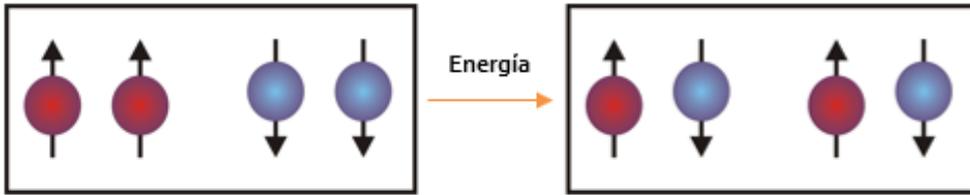


Figura 17. Transferencia de energía entre espines. En los procesos transversales de magnetización, los núcleos excitados transfieren la energía a los núcleos colindantes que resuenan con la misma frecuencia.

Al final, la coherencia se pierde por fluctuaciones de ω_0 , y tanto M_{XY} como la señal recogida, van decreciendo. Estas fluctuaciones se deben a la rotación o vibración molecular, que es directamente responsable de T_2 , y a las inhomogeneidades del campo B_0 que experimentan los protones. Estas desigualdades proceden del instrumental que se utiliza para generar el campo principal, diferencias en la susceptibilidad magnética de los distintos tejidos adyacentes, o bien de los gradientes empleados para la adquisición de la imagen. Cuando estos factores se tienen presentes en la adquisición (T_2^{inh}), hablamos de tiempo de relajación T_2^* (41).

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2^{inh}} \quad (125)$$

1.2.2 FUNCIONAMIENTO DEL EQUIPO DE RM

Los espines de los átomos tienden a alinearse con el campo magnético principal B_0 , excitándose cuando son perturbados por un pulso de RF y volviendo a su posición de equilibrio una vez éste desaparece. Esta señal es la que recoge el equipo de RM y la que contiene la información.

Los elementos fundamentales de un equipo de RM son básicamente: un imán que genera el campo magnético constante, un par de bobinas o antenas que envían y captan la señal procedente de los átomos, y un sistema de gradientes para la formación de las imágenes (42).

1.2.2.1 IMÁN DEL CAMPO PRINCIPAL

Este imán genera un campo magnético B_0 constante en el plano Z, que es el que orientará a los espines del tejido en sentido paralelo y antiparalelo. Su intensidad es variable, desde los equipos de 1,5 T empleados en clínica hasta el equipo de 14,1 T que hemos usamos nosotros, e incluso los hay de mayor potencia.

Normalmente se emplean imanes superconductores formados por aleaciones de niobio-titanio. Estos imanes presentan una resistencia casi nula cuando funcionan a temperaturas entorno a los 4 K, que se consiguen con la inyección de helio líquido en el sistema.

El campo principal B_0 debe ser homogéneo para que no se generen distorsiones durante las adquisiciones. Esta homogeneidad se puede mejorar mediante ajustes de *shimming*, que son reajustes realizados por unas bobinas dispuestas estratégicamente.

1.2.2.2 EMISOR DE RF

El sistema empleado para generar la RF es un solenoide que genera una corriente eléctrica, que, a modo de antena, induce un campo magnético B_1 perpendicular a B_0 en la frecuencia de las ondas de radio en la zona deseada.

Existen muchos diseños y tamaños de bobinas, desde las usadas en los equipos clínicos con diámetros de hasta un metro, hasta las microbobinas de 1 cm usadas en los equipos de investigación (43, 44).

1.2.2.3 RECEPTOR DE LA SEÑAL

Estas antenas receptoras se encargan de recoger la señal que se produce en el plano transversal tras la emisión del pulso de RF. Estas bobinas se deben ajustar a la frecuencia de resonancia de la señal que queremos tomar, y deben ser perpendiculares a B_0 . A veces, las antenas que reciben la señal son las mismas que las emisoras de RF de las que hablábamos en el apartado anterior.

Su tamaño es determinante para su sensibilidad y su resolución, siendo más sensibles cuanto más pequeñas son. Para el estudio de muestras pequeñas suelen ser bobinas planas de gran sensibilidad (en torno a 100 μm) (45).

Estas bobinas deben estar aisladas del entorno con una caja de Faraday de cobre o acero inoxidable para evitar señales externas a las procedentes del campo magnético del imán.

1.2.2.4 SISTEMA DE GRADIENTES

Los gradientes son el elemento del sistema de RM que permite la resolución espacial de la muestra y la formación de las imágenes. Está formado por un conjunto de imanes que generan variaciones lineales del campo longitudinal en una región concreta a lo largo de tres direcciones ortogonales (corte, fase, y frecuencia).

El primer gradiente en actuar es el de selección de corte (G_z). Este se aplica en la dirección Z de manera que cada punto Z tiene un valor diferente. Cambiando la frecuencia de B_1 seleccionamos qué valores de B_0 queremos elegir, activando únicamente la zona en la que $\omega_1 = \omega_0$, o sea, el plano que queremos. Además, cambiando la anchura de la excitación podremos también modular la anchura del corte.

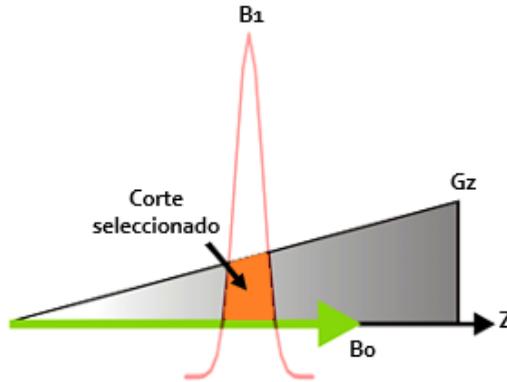


Figura 18. Gradiente G_z . Selección del corte del que queremos recoger la información. G_z = Gradiente de corte; B_0 = Campo magnético principal; B_1 = pulso de radiofrecuencia.

A continuación, se aplicará un gradiente de fases (G_y) en la dirección y para que los espines que han sido seleccionados con G_z se orienten linealmente a lo largo de la dirección del gradiente aplicado (figura 19), de manera que todos los espines seleccionados precesionen con fases diferentes, pero a la misma frecuencia.

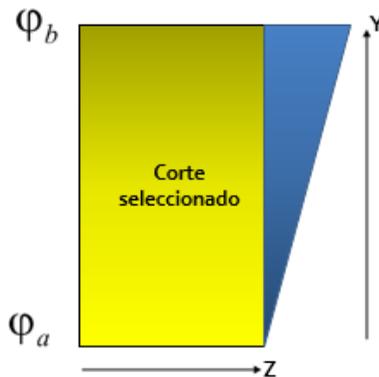


Figura 19. Gradiente G_y . Dispone a todos los espines en la misma fase. Se cumple que $\phi_b > \phi_a$, donde ϕ es el desfase. G_y = Gradiente de fase; ϕ = Desfase.

Por último, se aplica un gradiente G_x o de frecuencia para conseguir que cada punto tenga una frecuencia diferente, cumpliendo con la ecuación 126.

$$\omega(x) = \gamma(B_0 - G_x x) \quad (126)$$

Aplicando estos tres gradientes se selecciona espacialmente el corte que queremos, con una fase y una frecuencia determinadas. En este punto se recoge la señal y se guarda en una matriz del espacio k (46), donde el eje horizontal se corresponde con la frecuencia, y el vertical con la fase. La imagen final se obtiene aplicando la transformada de Fourier a esta matriz (47).

1.2.2.5 ESPÍN-ECO

Como dijimos anteriormente, las heterogeneidades de B_0 causan un desfase de los espines del tejido y, en consecuencia, una pérdida de la señal. Las inhomogeneidades residuales del campo B_0 que no se han podido eliminar mediante ajustes de *shimming*, se minimizan con el fenómeno espín-eco. Esto es la señal que se produce cuando un conjunto de espines se refasa tras la aplicación de un pulso de 180° , es decir, este pulso invierte la magnetización 180° (48). En la figura 110 podemos ver el proceso completo.

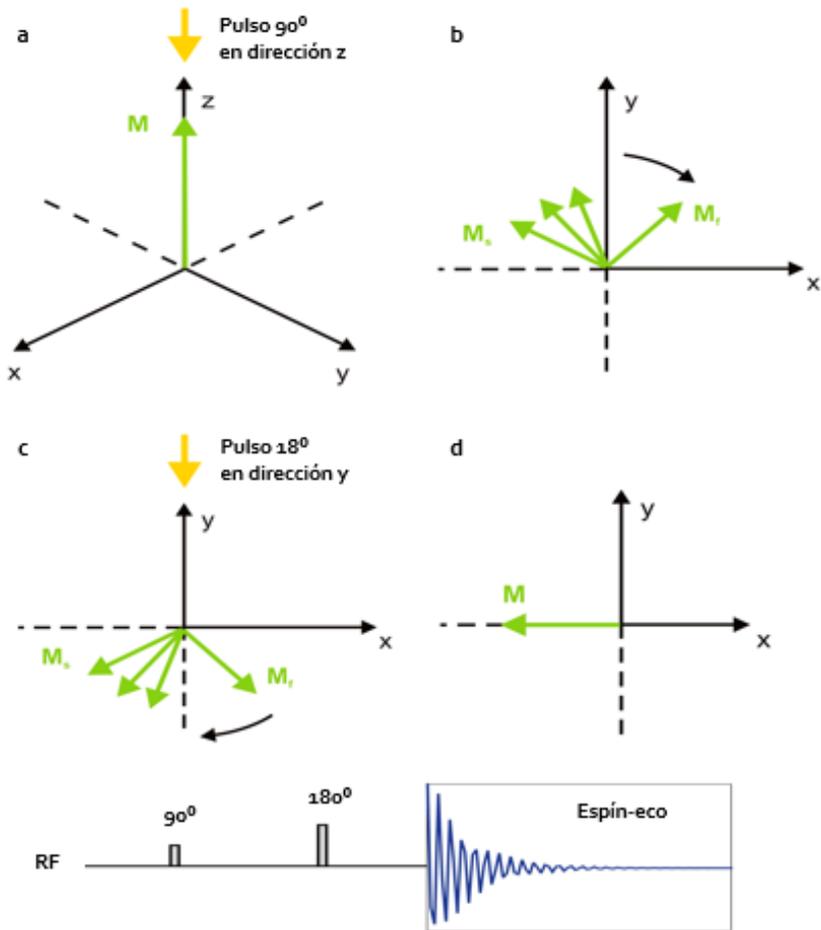


Figura 110. Comportamiento de la magnetización en el fenómeno eco-espín y esquema del proceso. a) Tras orientar la magnetización del campo se aplica un pulso de 90° que hace que M rote alrededor del eje z estos mismos grados. b) Una vez en el plano XY , empieza el movimiento de precesión y desfase. Las componentes lentas (M_s) se desfazan con respecto a las rápidas (M_f). c) Ahora se aplica otro pulso, pero de 180° en la dirección j , de manera que ahora las componentes rápidas quedarán detrás de las lentas. d) Transcurrido un tiempo, las componentes rápidas alcanzarán a las lentas y se refazarán. En este momento se emite el eco. En la parte baja se representa el fenómeno eco-espín. M = Magnetización; M_s = Componentes lentas; M_f = Componentes rápidas; RF= Pulso de radiofrecuencia.

1.2.3 POTENCIACIÓN DE LAS IMÁGENES EN RM

La potenciación de las imágenes la determinan los parámetros de adquisición empleados. En general, las imágenes T1 son buenas para determinar la anatomía, incluso para detectar algunas lesiones si se emplean agentes de contraste exógenos. Cuando los tiempos T1 son cortos, es decir, a los protones no les es difícil desprenderse de la energía, la señal es hiperintensa, mientras que aquellas que tienen más dificultad para hacerlo, como es el caso de los líquidos, aparecen hipointensas. Es decir, las imágenes potenciadas en T1 son directamente proporcionales a la liberación de energía desde los núcleos de hidrógeno. Por su parte, las imágenes potenciadas en T2 son buenas para detectar patologías, ya que estas llevan asociado edema. Los líquidos se observan hiperintensos porque los núcleos están prácticamente aislados y se relajan de manera coherente al campo que los envuelve. Lo contrario ocurre con los elementos sólidos, que aparecen hipointensos.

También podemos obtener imágenes potenciadas en T2*. Estas imágenes proporcionan la misma información que las imágenes T2 e incorporan el efecto de las inhomogeneidades del campo B₀ y de la susceptibilidad magnética, por lo que son buenas para detectar zonas ricas en hierro como las hemorragias.

1.2.4 CONTRASTE EN RM

Las diferentes estructuras que conforman un tejido tienen diferentes características magnéticas, que son las que conformarán el contraste en las imágenes de RM. Como mencionábamos antes, se pueden establecer los parámetros de la RM para que las señales recogidas formen una imagen potenciada en T1, T2 o T2*. El contraste endógeno de los tejidos se puede mejorar mediante el uso de agentes de contraste (49, 50), como se hace en la

técnica de RTG de RMC que ya hemos comentado. Como veremos en el desarrollo de este trabajo, a potencias de campo ultra alto esto no es necesario.

1.2.4.1 TIEMPO DE REPETICIÓN Y TIEMPO DE ECO

Los parámetros más importantes para determinar el tipo de imagen y, por tanto, el contraste en una imagen de RM son el tiempo de repetición (TR) y el tiempo de eco (TE). El TR es el tiempo que pasa entre la emisión de un tren de pulsos de RF y la emisión del siguiente, mientras que el TE es el tiempo que transcurre entre la emisión del pulso de reenfoque de RF y el pico de emisión de la señal de los núcleos. Los pulsos de RF desplazan M_z , por los que si se encuentran muy seguidos (TR bajos), no se puede recuperar a tiempo y no se puede captar la señal. Por este motivo, el TE no afecta a la componente longitudinal. Por otro lado, M_{xy} es la componente que produce el eco, y está relacionada con el TE. Así pues, el TR se relaciona principalmente con T1 y el TE con T2 (tabla I1).

Tabla I1. Contraste en las imágenes de resonancia magnética.

	TE	TR
Contraste T1	bajo	bajo
Contraste T2	alto	alto

TR= Tiempo de repetición; TE= Tiempo de eco.

A modo de curiosidad mencionaré que cuando tenemos un TE bajo y un TR largo se dan señales en densidad protónica. Sin embargo, no las comentaré porque no se han empleado en ningún momento para este trabajo.

1.2.5 RECONOCIMIENTO DE ESTRUCTURAS POR RMN

En el caso del IM en fase aguda y en fase crónica el interés recae en poder identificar procesos como el edema, la infiltración leucocitaria, la necrosis

miocárdica y la fibrosis de la cicatriz de la misma manera que se realiza en histopatología.

Como ya se ha comentado en el apartado de RMC, es necesario emplear distintas secuencias para determinar cada uno de ellos. Aquí radica la necesidad de desarrollar una técnica que permita caracterizar de manera fiable las estructuras del tejido cardíaco, y particularmente el daño tisular acontecido en el IM.

1.3 Microscopía de resonancia magnética (MRM)

Desde que empezó a aplicarse la RMN en el campo de la biomedicina, el interés en aumentar su resolución y la intensidad de campo ha sufrido un crecimiento exponencial (51, 52).

Hoy en día, la mayoría de los escáneres clínicos cuentan con campos magnéticos de 1,5 y 3 T, e incluso, ya se están aplicando campos magnéticos de 7 T (53, 54). Por otro lado, los espectrómetros de investigación cada vez alcanzan campos más altos y, por ende, resoluciones más finas. Se conocen con el nombre de equipos de RM de ultra alto campo y la tecnología que utilizan es muy avanzada, aunque se basan en los mismos principios que la RM convencional.

El término MRM se refiere a imágenes de RM de ultra alta resolución ($<100 \mu\text{m}$). Esta resolución es inferior a la de la microscopía óptica ($0,25 \mu\text{m}$), pero mucho más alta que la de la RM clínica (aproximadamente 1 mm de resolución en el plano) (55).

La susceptibilidad magnética es un parámetro que indica el grado de magnetización de un material debido a la presencia de un campo magnético. A mayor fuerza del campo magnético, mayor susceptibilidad magnética de los tejidos, por lo que la capacidad de discernir entre estructuras dentro del tejido tras un IM será mucho más sencilla por este aumento del contraste endógeno.

La RM de campo ultra alto, además, tiene una SNR magnífica y un elevado grado de resolución espacial, lo que le confiere potencial más que suficiente para caracterizar las microestructuras tisulares.

Son varios los estudios que se han utilizado en diferentes áreas para caracterizar los tejidos en los últimos años, aunque mayoritariamente en el campo de la neurología. Por ejemplo, Cleary y asociados (56), obtuvieron un gran nivel de microestructura en tejido cerebral murino, que validaron histológicamente mediante una tinción específica para neurofilamentos; otro estudio que utilizó MRM con un equipo de 7T para el seguimiento de las vías neuronales en el cerebelo humano en muestras *post-mortem* concluyó que esta técnica podría ser un link de unión entre el mapeo de redes a gran escala y la histología microscópica (57). Este enfoque de validación de MRM con histología también se ha llevado a cabo en patología hepática (58).

Son escasos los estudios realizados en otras áreas pese al gran potencial que presenta esta técnica. Por lo que uno de los objetivos que abordamos en este trabajo es trasladar también el poder de la MRM como herramienta de caracterización estructural validada mediante histología al ámbito de la cardiología.

1.3.1 POTENCIAL BIOMARCADOR

Los biomarcadores de imagen deben responder a criterios de coherencia conceptual, reproducibilidad técnica, sensibilidad y especificidad. La definición del problema, la adquisición de las imágenes fuente, la metodología de análisis y la extracción del biomarcador a partir de modelos computacionales y herramientas de medida, son aspectos imprescindibles para utilizarlos adecuadamente en el estudio de una enfermedad.

Cualquier candidato a biomarcador debe ser validado con la realidad objetivada (estructural, fisiológica, biológica o molecular) de antemano (59). De este modo, la validación histopatológica podría actuar como puente entre la MRM y la RM clínica (12-14) y ayudar a desarrollar nuevos biomarcadores de RMC sin agentes de contraste en el campo de las enfermedades miocárdicas.

Además, la tecnología de ultra alta resolución es cada vez más accesible para las clínicas y cada vez son más los estudios que utilizan MRM con buenos resultados para evaluar patologías. En imagen cardíaca ya se están empezando a usar escáneres 7T (60, 61).

Nosotros proponemos unir las virtudes de la MRM y de las actuales técnicas computacionales para generar nuevos biomarcadores de imagen en la evaluación del IM en fase aguda y en fase crónica.

2 HIPÓTESIS

La MRM de ultra alto campo detecta sin necesidad de contraste los distintos grados de afección tisular que se producen tras un IM. La medición mediante distintas secuencias magnéticas por microimagen, su comparación con imágenes histopatológicas correlativas y su posterior combinación en un modelo multivariante permite establecer un perfil magnético de daño tisular que acontece en la fase aguda (tras una semana) y crónica (tras un mes) de un IM.

3 OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es ilustrar el potencial de la MRM para la caracterización del daño miocárdico en fase aguda y en fase crónica en muestras aisladas de un modelo porcino de IM sin uso de agentes de contraste exógenos como una posible plataforma para el desarrollo de nuevos biomarcadores de RMC mediante el uso de modelos multiparamétricos.

Los objetivos específicos son:

- Correlacionar las imágenes histológicas derivadas del tejido cardíaco aislado en fase aguda y en fase crónica tras un IM con las imágenes adquiridas con el equipo de RMN de 14,1 T.
- Realizar un análisis multivariante para discriminar el daño miocárdico en fase aguda y en fase crónica tras un IM.
- Construir mapas probabilísticos píxel a píxel a partir de los modelos multivariantes generados mediante análisis multiseuencia y validados histológicamente para el modelo de IM en fase aguda y en fase crónica.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Todos los estudios con animales empleados en esta tesis fueron aprobados por el Comité de Experimentación y Bienestar Animal de la Universitat de València y se atienen a lo establecido en la normativa actual de España (Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero), en la Directiva Europea 2010/63/EC, a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud de EEUU (Publicación del NIH No. 85-23, revisada en 1996) y a las pautas de ARRIVE (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>).

Todos los animales se mantuvieron en el animalario de barrera de la Facultad de Medicina de la Universitat de València, adscrito en la Conselleria de Agricultura como Centro usuario de animales de experimentación ES 46250 0001003.

El número de autorización del proyecto para el modelo porcino fue 2016/VSC/PEA/00074 (anexo 1).

4.1.1 MODELO PORCINO DE IM

Se emplearon cerdos hembra jóvenes de *Sus scrofa domestica* de 25- 30 kg de peso y 3 meses de edad, adquiridos a la Granja El Pombo. Los animales se estabularon en tandas de 2 en el Servicio de estabulación animal y quirófanos experimentales de la Unidad Central de Investigación de Medicina en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València, donde el personal se encargó de su cuidado bajo las directrices de la responsable de bienestar animal de la unidad.

Los ejemplares estuvieron en ayunas entre 6-12 horas antes de la intervención. Todos los procedimientos quirúrgicos fueron hechos por una cardióloga intervencionista, con amplia experiencia en el modelo, y su equipo. Además, las intervenciones estuvieron supervisadas por las veterinarias del centro, que velaron en todo momento por el bienestar del animal.

Una vez en el quirófano, se les inyectó una mezcla de ketamina (8 mg/kg) y medetomidina (0,1 mg/kg) intramuscular, y se les sustentó con ventilación mecánica endotraqueal con una mezcla de oxígeno y gases 1:1. La vena yugular derecha fue canulada para la administración de fármacos. La anestesia se mantuvo con propofol al 2 % por infusión intravenosa continua a 10 mg/kg/h durante todo el experimento. Además, las constantes vitales (presiones, frecuencia y ritmo cardíaco) fueron monitorizadas en todo momento, al igual que los cambios en el segmento ST, mediante ECG. Antes del infarto, se les administró heparina (3000 U), amiodarona (300 mg) y lidocaína (30 mg) para prevenir la aparición de trombos y arritmias. En caso de fallo cardíaco se disponía de desfibrilador para reanimar al animal.

Se accedió a la arteria coronaria descendente anterior (ADA) a través de la arteria femoral derecha mediante una vaina 7 F, que a su vez se usó para registrar la presión arterial. A través de ésta, se introdujo un catéter 7 F Amplatz Left 0,75 para seleccionar la zona proximal de la ADA, y una guía de angioplastia hidrófila estándar hasta la zona distal del vaso. En la zona medial se hinchó un balón de angioplastia de 2,5x15 mm a 6 atm, inmediatamente distal a la primera rama diagonal. La oclusión de esta arteria coronaria se confirmó con la inyección de una pequeña cantidad de contraste y por la elevación del segmento ST en el ECG.

Se distribuyeron los animales en un grupo control y 2 grupos experimentales de IM independientes. En los grupos de IM, después de una oclusión de 90 minutos

de la parte media de la ADA mediante el balón de angioplastia, los experimentos se clasificaron según el tiempo de reperfusión: a) fase aguda (1 semana de reperfusión, n= 6), y b) fase crónica (1 mes después de la reperfusión, n= 5). En el grupo control (n = 3) se aplicó el mismo protocolo experimental utilizado en los grupos de IM, pero no se hinchó el balón de angioplastia y, por consiguiente, no se indujo isquemia ni infarto.

Previamente al sacrificio, los animales de ambos grupos de IM, se los sometió al mismo cateterismo cardíaco que durante la inducción del infarto. Antes de sacrificarlos con una infusión intravenosa de cloruro de potasio al 0,9 % y aislar el corazón, se les inyectó 20 ml de una solución de tioflavina-S (TS) al 4 % (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, EE. UU.) en la ADA para determinar el área en riesgo.

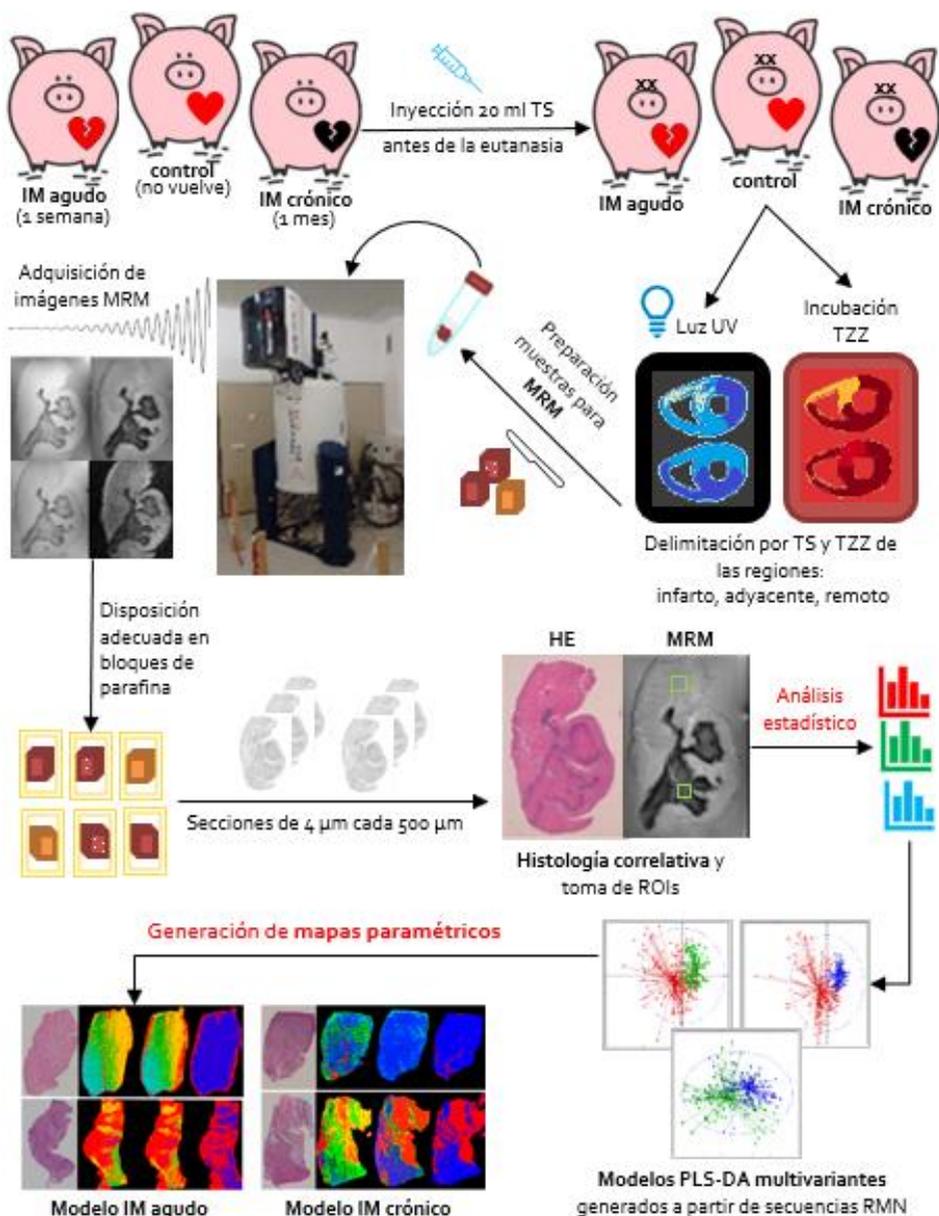
A los animales del grupo control se les aplicó el mismo procedimiento, pero sin hinchado del balón, por lo que no sufrieron ningún evento adverso cardíaco y se les sacrificó el mismo día de la intervención.

Las muestras de tejido cardíaco de este modelo se utilizaron para el desarrollo de la metodología de alto campo y la histopatología correlativa para plataformas de validación de marcadores en imagen cardíaca, y en la interpretación de los datos multivariados para mejorar la comprensión de los mecanismos implicados en el infarto de miocardio.

4.1.2 FLUJO DE TRABAJO

Después del sacrificio, se aislaron los corazones, se cortaron en secciones de 5 mm en su eje axial y se incubaron con una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTZ). Las tinciones de TS y TTZ delimitaron las regiones a estudio: infarto, adyacente y remoto. De cada una de las muestras extraídas de cada corazón se tomaron uno o dos octaedros de aproximadamente 1 cm de

ancho destinados al análisis de MRM. Una vez procesadas y adquiridas las muestras en el espectrómetro, se orientaron en función de las imágenes de MRM y se llevaron al Departamento de Patología para realizar cortes histológicos de 4 μm de espesor cada 500 μm . Tras teñir una de las réplicas con hematoxilina-eosina (HE, en ambos modelos) y con *picrosirius red* (en el modelo de IM en fase crónica), se correlacionaron con las imágenes de MRM, comparando los cortes histopatológicos y las imágenes potenciadas en T2 y localizando las mismas estructuras, siluetas y direccionalidad de las fibras en ambas. Esto permitió un buen corregistro de cada una de las áreas a estudio dentro de las imágenes de MRM. Tras los análisis estadísticos pertinentes que discernían bien entre tejidos, realizamos análisis multivariantes tanto para el modelo en fase aguda como en fase crónica. En base a los resultados de los modelos predictivos, se llevaron a cabo mapas paramétricos, que clasificaban píxel a píxel la imagen completa de MRM en tejido infartado o remoto. Tanto el modelo predictivo final de IM en fase aguda como el de fase crónica eran buenos clasificando muestras externas (esquema M1).



Esquema M1. Flujo de trabajo. Se representa, a modo esquemático, los pasos principales realizados en esta tesis, cuyos objetivos están resaltado. HE= Hematoxilina-eosina; IM= Infarto de miocardio; MRM= Microimagen por resonancia magnética; PLS-DA= Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales; ROI= Región de interés; TS= Tioflavina-S; TZZ= Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio; UV= Radiación ultravioleta.

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS

Las tinciones de TS y TTZ nos sirvieron para determinar las distintas regiones a estudio (infarto, adyacente y remoto) en los modelos porcinos de IM en fase aguda y en fase crónica.

La TS es la mezcla resultante de la metilación de la deshidrotiotoluidina con el ácido sulfónico. Esta tinción se utiliza habitualmente en el campo de la neurociencia. Aunque tiene más aplicaciones, como es nuestro caso, donde una perfusión de 20 ml de TS al 4 % en la circulación coronaria del animal permitió determinar, *post mortem*, el área en riesgo por la oclusión. Los corazones de cerdo, tras ser aislados, fueron cortados en láminas de 5 mm en su eje corto. Estas secciones se expusieron bajo una luz ultravioleta para determinar el área en riesgo como aquella zona con captación del TS (azul claro).

Por otra parte, el TTZ (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.) es un indicador redox del metabolismo celular soluble en agua e inestable a la luz. Al incubar a 37 °C durante 20 minutos un tejido metabólicamente activo en este colorante, las enzimas deshidrogenasas lo reducen a formazán, un producto de color rojo. Por el contrario, en tejidos necróticos el TTZ no cambia su coloración debido a la desnaturalización de estos enzimas.

Una vez localizadas las tres áreas, se seccionó al menos un fragmento representativo de aproximadamente 1 mm³ de cada región tisular (remota, adyacente e infartada) de la sección transversal del corazón de 5 mm de grosor. Posteriormente, las muestras de tejido fueron almacenadas en un ultracongelador (Thermo Scientific™ Revco™ UxF, Waltham, EE. UU.) a -80 °C hasta el momento de su medición. Una vez descongeladas, se retiró cualquier

resto de sangre con lavados superficiales con suero salino, con el fin de evitar interferencias de sustancias ferromagnéticas, como es el caso del grupo hemo. A continuación, cuando fue necesario, se redujo el tamaño de la muestra a las dimensiones del tubo de microimagen con un bisturí.

4.2.2 MRM

En el Laboratorio de Imagen Molecular y Metabolómica, espacio mixto INCLIVA/ Universitat de València, y que forma parte de la Unidad Central de Investigación de Medicina, se dispone de un espectrómetro Bruker Avance III 600 de eje vertical de 14,1 Teslas y frecuencia protónica de 600,13 MHz, y una unidad de refrigeración BCU Xtreme (Bruker Biospin SA, Wissembourg, Francia). El equipo está equipado con la electrónica, sondas de medida y software necesarios para poder funcionar en dos regímenes de trabajo: en MRM y en espectroscopía de líquidos y semisólidos.

Para realizar la imagen por resonancia magnética (IRM), el equipo está dotado de unos gradientes X, Y, Z de potencia máxima 60 A/h, de una sonda para microimagen y 3 bobinas de transmisión- recepción ^1H de diámetro interior variable (2 mm, 5 mm, 10 mm) para abarcar los diferentes tamaños muestrales. La sonda de microimagen está equipada con una termosonda interna situada muy próxima al tubo de medición para asegurar que la temperatura se mantendrá constante durante todo el proceso de experimentación.

Las muestras necesitan de una preparación antes de ser introducidas en el equipo de RMN, ya que el campo de visión del que dispone para tomar las mediciones está limitado por la longitud de la bobina. Ésta consta de un cable de oro que hace a la vez de receptor y de emisor, de modo que cuanto más cerca se encuentre el tubo que contiene la muestra de la bobina, mayor será la resolución obtenida.

La elección del tamaño de la bobina depende de las dimensiones de la muestra. En esta tesis, se empleó la bobina de mayor tamaño (\varnothing 10 mm), que permite estudiar volúmenes sólidos de aproximadamente 1 cm³. El marco de visión (FoV), en este caso, queda restringido a un máximo de 10x16 mm.

La muestra debe ir embebida dentro de una matriz de agarosa en el tubo de RMN, de modo que quede fijada y las vibraciones durante la adquisición de la IRM sean mínimas. Se disolvieron 100 mg de agarosa (Scharlau, S.L. Sentmenat, Barcelona, España) en 6,5 ml de agua desionizada en un vaso de precipitados, y se calentó en el microondas mediante pequeños choques térmicos hasta su completa disolución. De este modo, se evita la formación de burbujas de aire y la polimerización temprana del polímero. La disolución de agarosa se repartió en dos tubos de microimagen, de forma que el tercio inferior de éste quedase totalmente cubierto.

El siguiente paso fue introducir una muestra en cada tubo y posicionarla dentro de los límites del campo de visión de la bobina, con cuidado de no generar burbujas de aire, que darían artefactos en las imágenes adquiridas más tarde.

Cuando la muestra estuvo correctamente posicionada, el tubo se dejó sumergido en agua a temperatura ambiente. De este modo la muestra queda retenida al gelificar la agarosa.

Todas las muestras para MRM se prepararon con 24-48 horas de antelación a su adquisición, y se preservaron a 4 °C para evitar la degradación del tejido.

Primero, se ajustó la altura del flotador que sostiene el tubo dentro de la sonda de IMR mediante un calibrador, de manera que la muestra quede lo más centrada posible en la bobina de medida. Luego, se introdujo por la parte superior del equipo de RMN, donde un chorro de aire ascendente amortigua la

caída. Todas las muestras de esta tesis se adquirieron a temperatura ambiente (25 °C).

Para cada muestra, previamente a su medición, se sintonizó el máximo de la frecuencia del protón mediante los tornillos de *matching* y *tuning* de la sonda con el software de adquisición y procesado de la señal de IRM (ParaVision 4.0 y 6.0, Bruker BioSpin MRI GmbH Rüdolf-Plank-Str. 23 D-76275 Ettlingen Alemania). El gradiente espacial máximo que se empleó fue de 210 gauss/ cm.

Una vez las condiciones fueron las óptimas para la adquisición, se ajustó el protocolo de medida a cada muestra. En primer lugar, sobre una matriz de resolución de 128x128 píxeles, se seleccionó la orientación de los cortes de cada muestra mediante el experimento *TriPilot*, equivalente a *1_Localizer* en el ParaVision 6.0. Esta prueba, mediante tres imágenes planares (coronal, transversal y sagital), permite centrar la muestra dentro del FoV y seleccionar el plano que recoge el área de mayor superficie de la muestra para obtener la máxima información posible. En todos los casos el FoV estuvo en torno a 10 mm. Una vez la muestra estuvo centrada, se ajustó la sonda mediante *wobbling* para sintonizarla a la frecuencia de transmisión relevante, que es aquella de mayor sensibilidad.

El segundo paso fue establecer el número de cortes virtuales y su grosor. El espesor es un parámetro de adquisición importante porque determinará la resolución y el contraste final de la imagen. Para todos los experimentos de esta tesis se usó un espesor de 0,5 mm sin separación entre cortes. Este grosor permite obtener una buena resolución de la imagen sin solapamientos de la señal de los distintos cortes. El número de cortes depende del volumen de la muestra, variando entre 5 y 12 en el caso de las muestras del modelo porcino de IM.

Una vez definida la geometría, se lanzó una rutina de ajustes automáticos (*shimming*) para conseguir la máxima homogeneidad del campo en la región de medida.

Por último, se establecieron las variables a medir y las secuencias. Tras ajustar los parámetros en cada una de ellas, se lanzó el protocolo cuya duración depende del número de experimentos y de los parámetros elegidos para cada variable (tiempo de repetición, tiempo de eco, número de repeticiones y de cortes, etc.).

El protocolo duró aproximadamente 8-10 horas y consistió en: dos secuencias rápidas eco de espín (RARE y TurboRARE) y una secuencia eco multigradiente (MGE) para la obtención de las imágenes potenciadas en T₁, T₂ y T₂*; una secuencia *multi-slice multi-echo* (MSME) y otra MGE para adquirir los mapas de T₂ y T₂* respectivamente; por último, una secuencia de difusión (*m_diffse*). Cabe señalar que, pese al cambio de versión de software, los protocolos en el ParaVision 6.0 son equivalentes a los establecidos en la versión 4.0. En todos los casos se utilizó una matriz de 256x256. En la tabla M1 se incluye de manera resumida los principales parámetros de medida empleados en la adquisición de las diferentes secuencias de IRM.

Tabla M1. Protocolo de adquisición para las muestras de tejido de corazón del modelo de IM en fase aguda y en fase crónica.

	TR (ms)	TE (ms)	Ecos	Número de pulsos	RF	Ángulo mágico	Método de medición
Imagen potenciada T1	1500	9,3	1/1	128	4	180°	RARE
Imagen potenciada T2	4000	38,4	1/1	64	4	180°	RARE
Imagen potenciada T2*	2000	9	1/1	1	-	30°	MGE
Difusión	1500	38,4	1/1	1	-	90°	m_diffse
Mapa T2	2000-2500	De 9,8 a 156	1/16	16	-	180°	MSME
Mapa T2*	1500-2000	De 4 a 70	1/12	8	-	30°	MGE

TR= Tiempo de repetición; TE= Tiempo de eco; RF= Pulsos de radiofrecuencia; RARE= Secuencia eco de espín; MGE= Secuencia eco multigradiente; m_diffse= Secuencia de difusión; MSME= Secuencia *multi-slice multi-echo*.

Una vez adquiridas las IRM, la muestra se recuperó íntegramente y se conservó sumergido en una solución de 4 % formaldehído.

La calidad de la imagen resultante se evalúa con la ratio señal/ ruido (SNR). Este dato se obtiene a partir de las imágenes potenciadas de cada tiempo de relajación mediante la siguiente fórmula:

$$\text{SNR} = \text{media ROI}_{\text{señal}} / \text{desviación estándar ROI}_{\text{ruido}} \quad (\text{M1})$$

La desviación estándar del ruido se obtiene de una región de interés (ROI) de la región externa al tubo de microimagen, mientras que la media de la señal nos la

da una zona homogénea dentro de la muestra, ambas ROIs circulares y del mismo tamaño.

La toma de datos en IRM se hizo con el software propio del espectrómetro de RMN, el ParaVision. Tanto la versión 4.0 como la 6.0 de este software, utilizan la misma interfaz para el cálculo de los mapas y la extracción de datos de las IRM. Los valores de los tiempos de relajación T₂ y T₂* se obtienen a partir del análisis de secuencias de imagen (ISA) multieco y multigradiente que, tras el ajuste de la curva de recuperación de T₂ con cada píxel/ ROI, genera un mapa paramétrico de T₂. Del mismo modo, se obtuvo el coeficiente de difusión aparente (ADC).

Estos mapas son el resultado de las siguientes fórmulas (M₂ y M₃), cuando las aplicamos a una selección de regiones, representativas del espectro de brillos, sobre las imágenes potenciadas:

$$Y = A + C \cdot \exp(-t/T_2) \quad (M_2)$$

$$Y = A + I \cdot \exp(-b \cdot D) \quad (M_3)$$

Sobre los mapas, se seleccionaron todas las ROIs que se consideraron oportunas para el estudio. Cada una de ellas aporta el valor promedio y la desviación estándar de los píxeles que conforman el vóxel para la variable a estudio.

En el tejido cardíaco tomamos un total de 20 ROIs cuadradas por muestra, 10 por corte, de aquellos que mejor correlación tenían, normalmente los centrales, para caracterizar el tejido en el IM, tanto en fase aguda como crónica.

4.2.3 HISTOPATOLOGÍA

Una vez adquiridas las imágenes de MRM, se recuperaron todas las muestras de tejido cardíaco porcino usadas en este trabajo. Cada fragmento fue extraído de la matriz de agarosa que lo contenía y lavado con suero salino. Posteriormente,

fueron posicionados en los casetes para histología según la orientación de la serie de imágenes adquiridas por MRM y preservadas en una solución al 4 % de formalina. Las muestras fueron orientadas con mayor cuidado a la hora de incluirlas en los bloques de parafina. Esto nos aseguró una buena correlación entre los cortes histológicos del tejido y las IRM obtenidas más tarde. Así, en el Departamento de Patología de la Universitat de València se realizaron 5 cortes histológicos de 4 μm de espesor cada 500 μm hasta consumir los bloques de parafina por completo.

La tinción de HE es una tinción de rutina que permite diferenciar los componentes celulares ácidos de los básicos.

Los cortes de tejido fueron primero desparafinados mediante xilol y un tren de alcoholes decreciente durante 20 minutos. Luego, se sumergieron en hematoxilina durante 5 minutos y se eliminó el exceso de colorante con agua del grifo. Seguidamente, se lavó de forma breve con HCl, y se introdujo durante 30 minutos en eosina. El exceso de colorante se eliminó nuevamente con agua corriente. Para terminar, se deshidrató la muestra con el tren de alcoholes en sentido inverso.

Las estructuras con carácter ácido son teñidas por la hematoxilina en tonos azulados o violáceos, mientras que aquellas de naturaleza básica lo hacen de rosa por la eosina.

De todas las muestras de corazón que utilizamos en esta tesis se teñió, al menos, una réplica de cada corte con esta tinción.

La tinción *picrosirius red* (Sigma Aldrich, Sant Louis, MO, EE. UU.) se utilizó para la detección del colágeno tipo I y tipo III, particularmente abundantes en el tejido

conjuntivo, como es el caso de la cicatriz fibrótica que se genera tras la reparación de la zona necrosada en la fase crónica tras un IM.

Esta tinción se usa de manera adicional a la clásica HE. De modo que, una vez hecha la tinción de rutina y antes de pasar por el tren de alcoholes de deshidratación, los cortes se dejan sumergidos en *picrosirius red* durante una hora.

Las zonas con alto contenido en colágeno tipo I se pueden ver bajo la luz polarizada del microscopio óptico en tonos intensamente anaranjados, mientras que las fibras de colágeno tipo III lo hacen a modo de iridiscencias verdosas.

La buena correlación de los cortes histopatológicos con la serie de imágenes potenciadas en T2 nos permitió seleccionar básicamente las mismas secciones y caracterizar el tejido adecuadamente para una selección más que acertada de las ROIs.

4.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el software SPSS (versión 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.) para el análisis estadístico.

Para describir a la población, se obtuvo la media y la desviación estándar. Estos dos parámetros son imprescindibles para conocer la dispersión y centralización de nuestros datos. La elaboración del diagrama de cajas de cada variable permitió entender el comportamiento de nuestros datos y detectar valores atípicos.

Luego, se comprobó si la población presentaba una distribución normal con la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Para evaluar si había diferencias estadísticamente significativas entre los tejidos se utilizó una prueba no

paramétrica de Kruskal-Wallis de un factor. Además, se aplicó el contraste de hipótesis *post hoc* de Games-Howell para averiguar de dónde procedían las diferencias, y una prueba Dunnett para comparar todos los tejidos a estudio con el tejido de referencia o control.

En toda la estadística inferencial se empleó $\alpha = 0,05$ como valor de significancia estadística para rechazar o aceptar la hipótesis nula.

4.2.5 QUIMIOMETRÍA MULTIVARIANTE Y MAPAS PARAMÉTRICOS

Todo el análisis multivariante se realizó con la aplicación PLS_toolbox (Eigenvector Research, Inc., Washington, EE. UU.) para Matlab.

La introducción de los datos se hizo de manera independiente: por un lado, la matriz de datos multivariante que describen cada muestra y, por otro lado, un vector que indica el diagnóstico de cada una de ellas.

Como paso previo al análisis de datos, se realizó un preprocesado, que incluye ciertas transformaciones matemáticas como el centrado y escalado de los mismos. En los datos de MRM aplicamos un autoescalado de la matriz multivariante. Éste emplea la desviación estándar como factor de escalado. Se consigue de esta manera que cada variable tenga un peso similar en el análisis independientemente de la intensidad de la señal de RMN.

Tras la normalización de los datos, se selecciona el tipo de estudio que queremos hacer. Entre los distintos tipos de análisis multivariante que nos permite realizar el PLS_toolbox, los más utilizados son el análisis de componentes principales (PCA) para la descomposición de los datos, y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para la clasificación de éstos.

La estimación de la capacidad discriminante de los modelos para MRM se evaluó mediante el cálculo de las curvas de característica operativa del receptor (ROC). En este tipo de gráficas se representan los pares de valores (especificidad y sensibilidad), obtenidos al considerar todos los posibles “puntos de corte”. Mediante estas curvas se puede valorar la precisión del modelo en la predicción, más allá del conjunto de datos de entrenamiento, y garantizar que no existe un sobreajuste de los datos. La capacidad de predicción del modelo es proporcional al valor del área bajo la curva (AUC), y puede tomar valores entre 1 y 0,5, siendo 0,5 un valor de predicción nulo.

Para la reconstrucción de las imágenes de RM del tejido cardíaco infartado basadas en las predicciones del modelo generado por PLS-toolbox fue necesario la aplicación de una serie de transformaciones matemáticas a las matrices de datos de MRM.

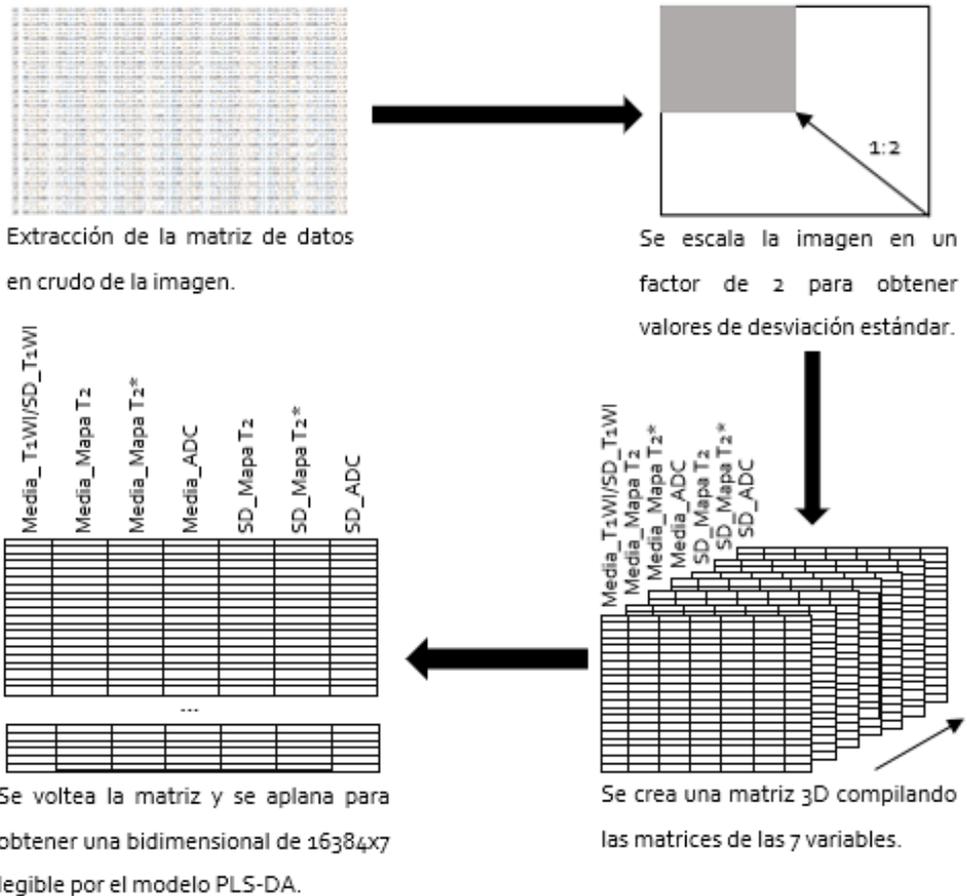
Primero la matriz cruda (65536 píxel) se redujo con la función “escalar”. Esta función devuelve dos matrices de cada variable, media y desviación estándar, redimensionadas a la mitad del tamaño original (16384 píxel). Cada celda contiene el resultado de los 4 píxeles colindantes. Y seguidamente, se normalizaron los valores de brillo T1 mediante la ratio entre la matriz media y la matriz desviación estándar celda a celda.

A continuación, se generó una matriz tridimensional de 128x128x7. Y cada plano se ocupó por una variable en el siguiente orden: ratio media de la intensidad de brillo relativa T1 entre su desviación estándar, medias de los tiempos de relajación T2 y T2*, y media del ADC, seguidas de las desviaciones estándar correspondientes de T2, T2* y ADC.

Esta megamatriz es trasladada al plano bidimensional mediante la función “aplanarmat”. La nueva matriz tiene unas dimensiones de 16384x7, donde en las

filas se alinean los valores del plano XY de la matriz 3D, y cada columna recoge una variable, dispuestas antes en el plano Z.

El procedimiento para la generación de la matriz multivariante lo resumo de manera gráfica en el esquema M2.



Esquema M2. Proceso de construcción de la matriz multivariante de la IRM para la validación del modelo PLS-DA. En la imagen está representado el procedimiento de construcción de la matriz con 7 variables, pero el proceso es el mismo independientemente del número de variables. IRM= Imagen por resonancia magnética; PLS-DA= Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales; T1WI= Imagen potenciada en T1; ADC= Coeficiente de difusión aparente; SD= Desviación estándar.

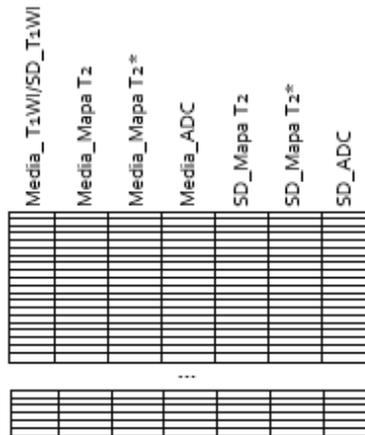
Tras aplicar el modelo, se obtiene la probabilidad de cada píxel de pertenecer a cada tipo de tejido.

A partir de las probabilidades obtenidas se construyeron 3 nuevas matrices. A cada una se le asignó un canal RGB: rojo para el tejido infartado, verde para el tejido adyacente, y azul para el tejido remoto. Luego se devolvió a las matrices a su tamaño original, 128×128 , con la función “*reshape*”, y se reorientaron. A continuación, se generó una matriz tridimensional de $128 \times 128 \times 3$, y se ocupó cada plano Z con uno de los canales RGB, es decir, con las matrices de probabilidad para cada tejido.

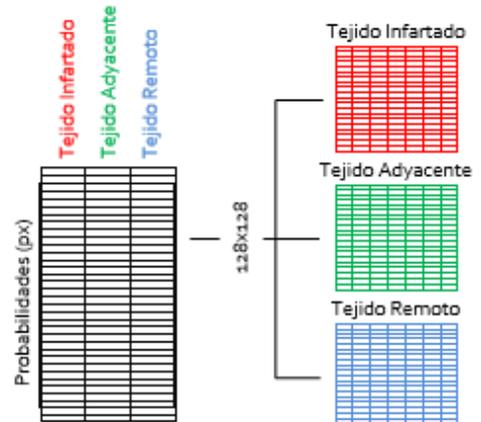
Al visualizar la imagen, se genera un mapa paramétrico RGB que clasifica los píxeles de la IRM uno a uno según la probabilidad de pertenecer a un tipo de tejido u otro.

Además, se aplicó una máscara sobre los mapas que mejora la visualización de las muestras sobre la agarosa. De este modo, la matriz gel que la envuelve, que es magnéticamente activa, queda oculta y el mapa de la muestra contorneado.

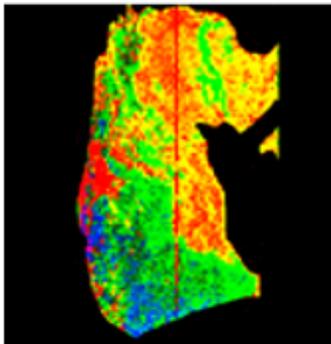
Este proceso queda resumido gráficamente en el esquema M3.



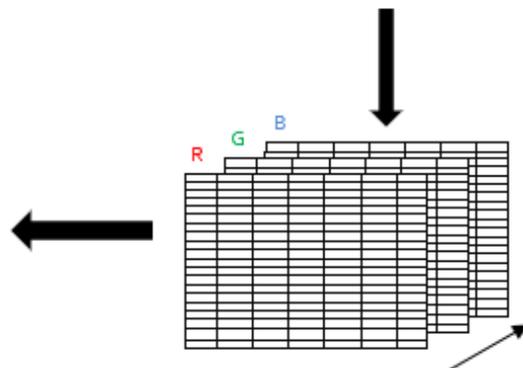
Se aplica el modelo a la matriz de la imagen entera con todas las variables magnéticas.



Se extraen las probabilidades de pertenecer a cada categoría de cada píxel y se construye la matriz de cada una de ellas.



Se aplica la máscara y se visualiza el mapa paramétrico.



Se genera una matriz 3D con asignación de los canales RGB.

Esquema M3. Proceso de construcción de los mapas paramétricos. Se representa la construcción de un mapa paramétrico con los tres canales activos. En los modelos duales (infarto y remoto), el canal G se apagó con una matriz de ceros. RGB= rojo, verde y azul; T1WI= Imagen potenciada en T1; ADC= Coeficiente de difusión aparente; SD= Desviación estándar.

5 RESULTADOS

5.1 DESARROLLO DE METODOLOGÍA DE IMAGEN DE ALTO CAMPO E HISTOPATOLOGÍA CORRELATIVA PARA PLATAFORMAS DE VALIDACIÓN DE MARCADORES DE MRM EN IMAGEN CARDÍACA

La premisa de partida para este objetivo fue que la medición de distintas características magnéticas de una misma muestra de corazón aislado de un modelo porcino de IM con MRM y su posterior combinación en un modelo multivariante, permitiría establecer un perfil magnético del daño tisular por reperfusión que se produce en la fase aguda tras un IM, y la fibrosis del tejido cicatricial que se instaura en fases más avanzadas.

5.1.1 METODOLOGÍA DE MRM E HISTOPATOLOGÍA CORRELATIVA

Estudios realizados con anterioridad en nuestro grupo, ya demostraron el potencial de la MRM para realizar biopsias virtuales, mediante la correlación entre cortes histológicos de tumores cerebrales y sus correspondientes IRM (62).

Hemos querido expandir esta idea a otro órgano que habitualmente también requiere de contraste para detectar patologías mediante IRM, el corazón. Particularmente, en el IM, tanto en su fase inicial o aguda como en su fase de resolución o crónica. Y demostrar que, también en este caso, el contraste endógeno es suficiente para diferenciar el tejido sano del afectado.

5.1.1.1 DELIMITACIÓN DE LA ZONA DE INFARTO

De manera macroscópica, el equipo de cardiología definió las áreas a estudio dentro del ventrículo izquierdo con el siguiente criterio: el miocardio ubicado en el área de riesgo que no se tiñó con TTZ se etiquetó como tejido infartado; por el contrario, la región fuera del área teñida por la TS se identificó como tejido remoto. La zona limítrofe con el tejido infartado, positiva para ambas tinciones, se consideró tejido adyacente (tabla R1).

Tabla R1. Delimitación de los distintos grados de lesión tisular en el infarto de miocardio según las tinciones de TS y TTZ.

	TS	TTZ
Tejido infartado	+	-
Tejido adyacente	+	+
Tejido remoto	-	+

TS= Tioflavina-S; TTZ= Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio.

Por otra parte, de manera microscópica caracterizamos bajo la luz del microscopio óptico cada una de las regiones mencionadas para ambos modelos (figura R1).

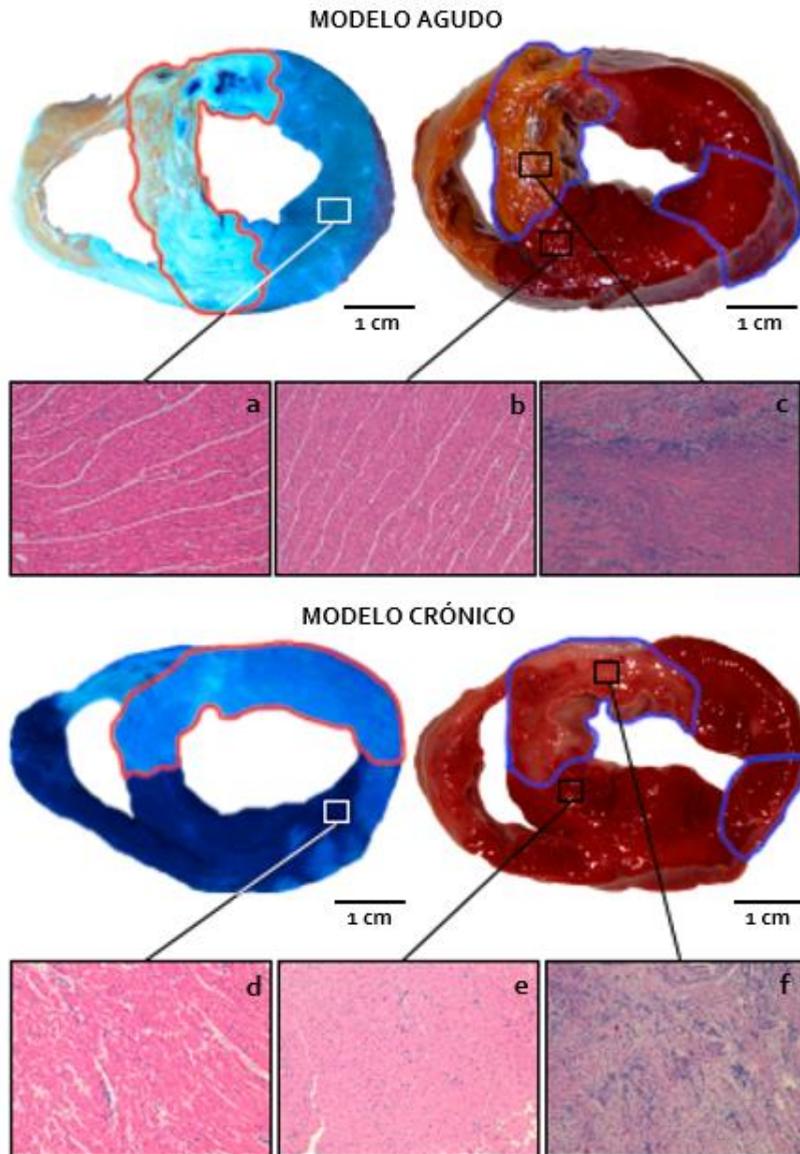


Figura R1. Delimitación de las regiones a estudio en el IM en fase aguda (arriba) y en fase crónica (abajo). Las tinciones de TS y TZZ ayudan a delimitar las tres áreas que se distinguen dentro del tejido cardíaco tras un IM. Además, se muestran imágenes de microscopía óptica a 10X para cada uno de ellos: (a y d) tejido remoto (TS - y TZZ +); (b y e) tejido adyacente (TS + y TZZ +); (c y f) tejido infartado (TS + y TZZ -). IM= Infarto de miocardio; TS= Tioflavina-S; TZZ= Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio.

El tejido control presenta cardiomiocitos íntegros con el citoplasma teñido de un rosa fuerte por la eosina, con pequeños núcleos bien definido por la hematoxilina, fibrillas musculares muy juntas, separadas únicamente por el tejido conjuntivo que rodeo los paquetes musculares.

En los cortes histopatológicos teñidos con HE del modelo de infarto de miocardio agudo se distinguen tres procesos fundamentalmente: edema, infiltración leucocitaria y necrosis. El edema se caracteriza por la presencia de espacios sin teñir entre las miofibrillas rosadas por la eosina (edema extracelular) y/o en el interior de las células, separando el núcleo del citoplasma (edema intracelular). En la infiltración, los grandes agregados de leucocitos extravasados a la matriz extracelular aparecen teñidos de hematoxilina. Por último, la necrosis se distingue por la ausencia de límites entre células, que se refleja como una mezcla de los dos colorantes debido a la degradación del tejido.

Estos tres procesos los podemos observar en diferentes grados en las tres regiones estudiadas. El área remota presenta un leve edema, donde la matriz extracelular empieza a distenderse. En la zona adyacente al infarto, el edema extracelular es mucho más pronunciado y el infiltrado leucocitario hacen acto de presencia. Además, el citoplasma de los cardiomiocitos está hinchado, y la membrana citoplasmática tiene un aspecto ondulado, aunque aún se mantiene la direccionalidad de las fibras. En la región donde se ha producido el infarto, podemos ver ejemplos de los tres procesos, aunque la necrosis es el acontecimiento más relevante. Se observa una ausencia total de estructura con huecos heterogéneos en la matriz del tejido (figura R2).

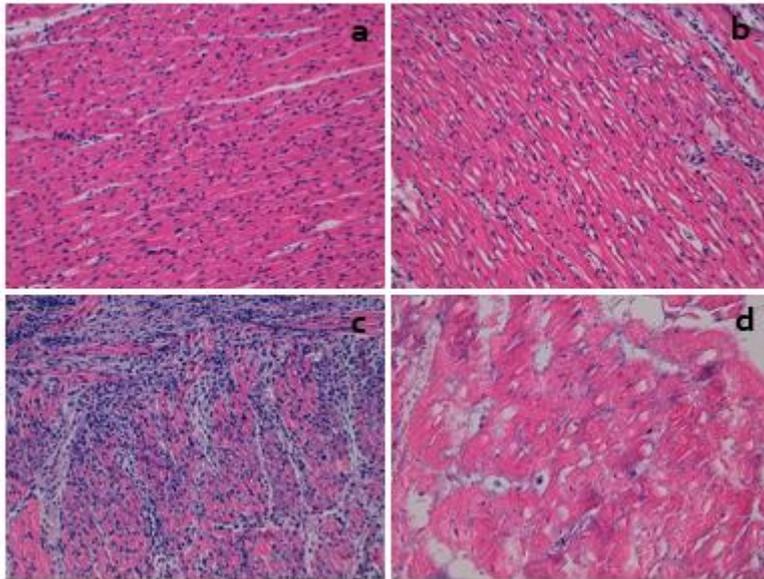


Figura R2. Imágenes representativas de microscopía óptica a 20X del tejido miocárdico aislado de los grupos de IM en fase aguda. Se muestra los diferentes procesos que ocurren en la fase inicial del IM, comparados con tejido sano: a) control, b) edema, c) infiltración y d) necrosis. IM= Infarto de miocardio.

En cuanto al modelo de IM en fase crónica, observamos una mayor definición de las áreas a estudio. Tanto el edema como la infiltración leucocitaria han desaparecido, y el tejido necrótico ha sido sustituido por tejido cicatricial. La región remota se ha restaurado por completo, al igual que los cardiomiocitos supervivientes del área adyacente, aunque las uniones entre los haces de fibras se ven más laxas. La zona de infarto se observa como una región pálida, formada por colágeno, que bajo la luz polarizada del microscopio óptico se desvela de naranja intenso gracias a la tinción de *picrosirius red*.

5.1.1.2 ADQUISICIÓN DE MRM

La SNR proporciona una manera de evaluar la calidad de la imagen de manera objetiva y reproducible. En todos los casos se adquirieron imágenes de calidad, como atestiguan los elevados valores de SNR obtenidos (tabla R2). En el anexo 2 se pueden consultar la calidad de todas las imágenes.

Tabla R2. Media y desviación estándar para la ratio señal/ruido de las imágenes potenciadas en T1, T2, y T2* de los modelos porcinos de IM en fase aguda y en fase crónica, y del control.

Ratio señal/ruido	Imágenes potenciadas en T1	Imágenes potenciadas en T2	Imágenes potenciadas en T2*
Control	139,7 ± 8,7	145,0 ± 28,7	125,2 ± 14,1
Modelo IM en fase aguda	153,1 ± 33,2	168,5 ± 69,4	111,3 ± 35,8
Modelo IM en fase crónica	144,6 ± 39,5	126,0 ± 75,5	67,5 ± 36,5

IM= Infarto de miocardio.

5.1.1.3 HISTOLOGÍA CORRELATIVA

Poder identificar las mismas estructuras (vasos, direccionalidad de las fibras de tejido conectivo, capas) y un perfil similar tanto con histopatología como con MRM nos asegura que estamos describiendo correctamente el tejido que nos interesa, con el valor añadido de que esto podría reemplazar a las biopsias en un futuro.

La cuidada obtención de los cortes histopatológicos permitió conseguir una buena correlación con las imágenes de MRM, como se puede apreciar en las imágenes incluidas en los próximos apartados.

Las imágenes tomadas por el espectrómetro de campo ultra alto y los cortes de histología de HE de cada muestra utilizada en la tesis pueden consultarse en el anexo 2.

5.1.1.3.1 MODELO DE IM EN FASE AGUDA

En el modelo de IM en fase aguda (figura R3), la gran heterogeneidad en la intensidad de la señal que mostró el tejido infartado en las imágenes de MRM, en comparación con la uniformidad del tejido remoto, nos permitió diferenciar claramente entre ambos tipos de tejidos.

Además, pudimos diferenciar dentro de la zona infartada los tres procesos descritos en el examen histopatológico: edema, infiltrado inflamatorio y necrosis. Las franjas purpúreas del infiltrado inflamatorio, tanto en el tejido infartado como en el adyacente, forman bandas con la señal más hipointensa de todo el tejido en todas las secuencias de MRM. Dentro de estos límites, el tejido necrosado se muestra isointenso en las imágenes potenciadas en T1 y en T2*, e hipointenso en las imágenes potenciadas en T2 y difusión. En cuanto al edema que dejaba al descubierto la tinción de eosina, aparece en las imágenes de MRM en un amplio espectro de intensidades de señal, que van desde isointenso (imágenes potenciadas en T2 y T2*) hasta hiperintenso (imágenes potenciadas en T1), según el grado de acumulación de líquido. Este fenómeno se observa, sobre todo, en las imágenes de difusión, donde el tejido edematoso contrasta profundamente con la elevada hipointensidad de la matriz gel que lo contiene.

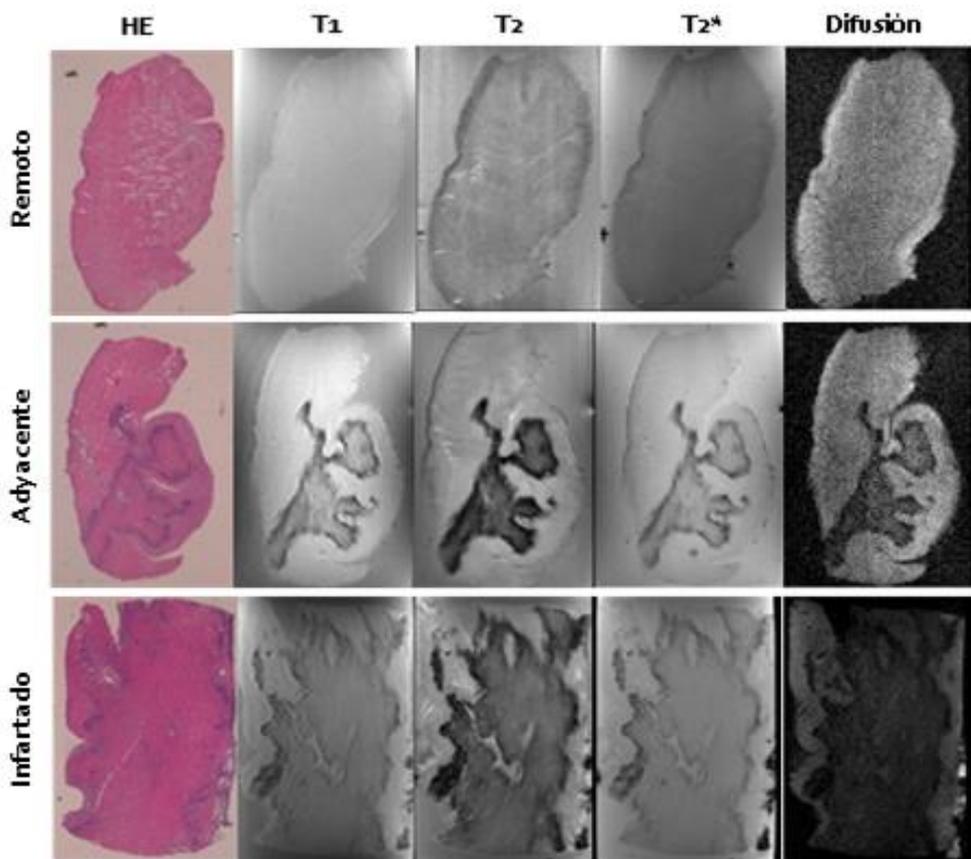


Figura R3. Imágenes representativas de la correlación entre cortes histológicos y las IRM de las tres condiciones de tejido cardíaco consideradas en el IM en fase aguda. Las tres muestras pertenecen al corazón del mismo animal. De izquierda a derecha se incluyen un corte histológico y las correspondientes imágenes magnéticas potenciadas en T₁, en T₂, en T₂^{*}, y en difusión para el mismo corte, de las zonas remota (arriba), adyacente (central) e infartada (abajo). IRM= Imagen por resonancia magnética; IM= Infarto de miocardio; HE= Hematoxilina-eosina.

5.1.1.3.2 MODELO DE IM EN FASE CRÓNICA

En el modelo de IM en fase crónica (figura R4), la diferencia en la intensidad de la señal en las imágenes de MRM entre el tejido infartado y el remoto es mucho más marcada.

Al igual que veíamos en la fase aguda del IM, la zona remota mantiene el brillo isointenso en todas las secuencias. Pero en el tejido infartado la situación se invierte. El tejido que se ha restaurado en la zona adyacente aparece isointenso en las imágenes potenciadas en T1 y T2*, e hipointenso en las imágenes potenciadas en T2, pero se mantiene hiperintenso en las imágenes potenciadas en difusión. Por el contrario, el tejido necrótico, ahora sustituido por colágeno, presenta un brillo hiperintenso en las tres secuencias de relajación magnética, mientras que en la imagen potenciada en difusión se muestra hipointenso respecto al resto de la muestra, aunque no tanto como la matriz de agarosa.

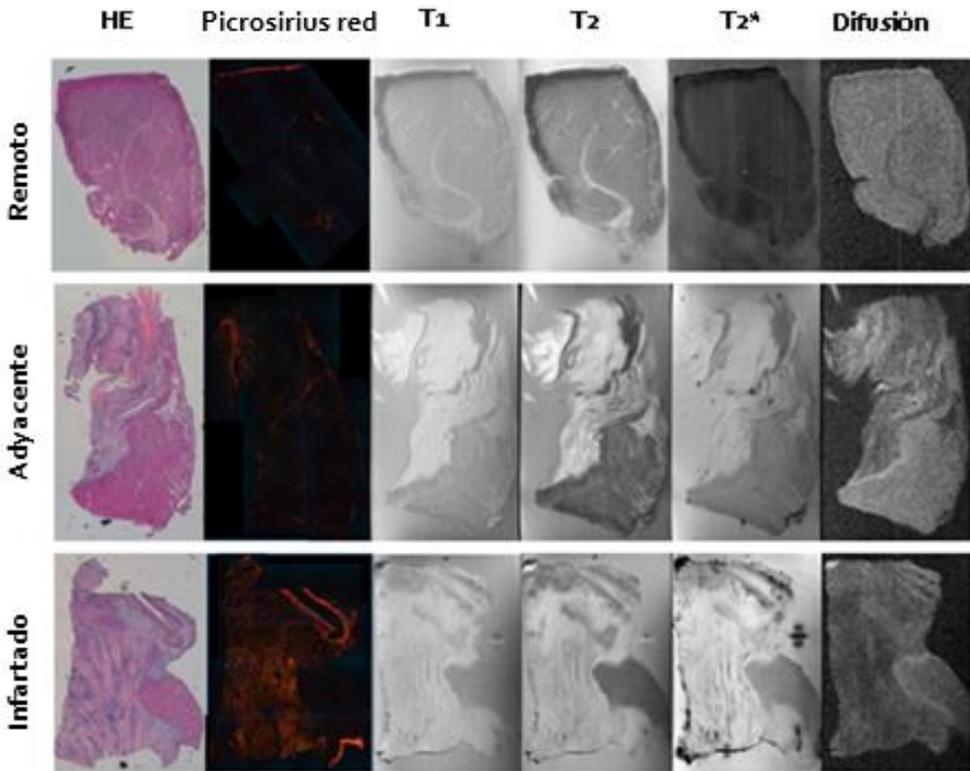


Figura R4. Imágenes representativas de la correlación entre cortes histológicos y las IRM de las tres condiciones de tejido cardíaco consideradas en el IM en fase crónica. Las tres muestras pertenecen al corazón del mismo cerdo. De izquierda a derecha se incluyen un corte histológico, seguido de la imagen polarizada del corte teñido con *picrosirius red*, y las secuencias magnéticas de las imágenes potenciadas en T₁, en T₂, en T₂^{*}, y en difusión para el mismo corte, de las zonas remota (arriba), adyacente (central) e infartada (abajo). IRM= Imagen por resonancia magnética; IM= Infarto de miocardio; HE= Hematoxilina-eosina.

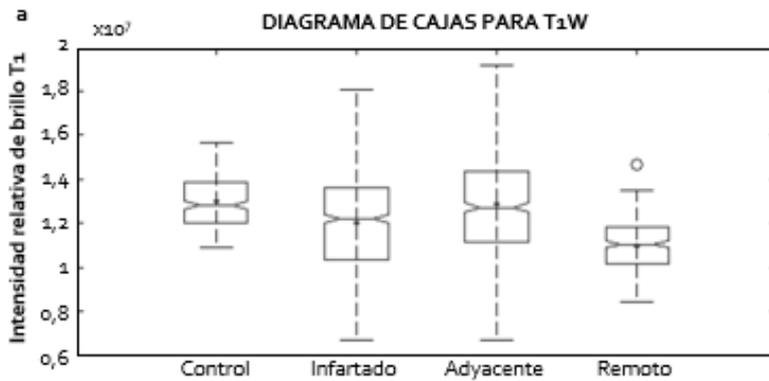
5.1.2 VALIDACIÓN DE MARCADORES DE IRM EN IMAGEN CARDÍACA

La estadística descriptiva nos ayuda a conocer la naturaleza de nuestros datos y situarlos en contexto. Los diagramas de cajas son una manera de obtener esta información de forma visual. Por otro lado, la estadística inferencial nos permite analizar nuestros datos, para poder sacar conclusiones *a posteriori*. Los estadísticos de contraste pueden ser paramétricos o no paramétricos. Algunos ejemplos son los tests de normalidad, como la prueba de Kolmogórov-Smirnov que hemos utilizado en este trabajo. En toda la estadística, tanto de los experimentos de IM en fase aguda como en fase crónica, usamos los datos de brillo de las imágenes potenciadas en T1 y los valores de relajación de los mapas de T2 y T2*, y del ADC.

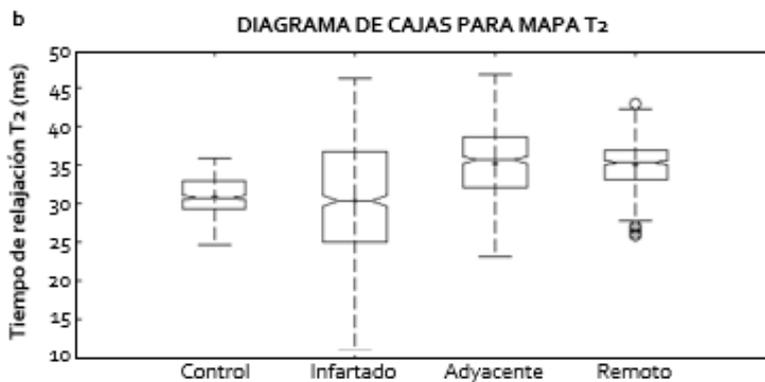
5.1.2.1 MODELO DE IM EN FASE AGUDA

La prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov con corrección de significación de Lilliefors indicó que las variables, a excepción de T1, no seguían una distribución normal. Por tanto, realizamos la prueba de Kruskal-Wallis en lugar de ANOVA para averiguar si había diferencias entre tejidos. Esta prueba concluyó que había diferencias estadísticamente significativas en todas las variables.

En la figura R5 a y R5 b se muestran los diagramas de cajas y la tabla de resultados para la prueba Kruskal-Wallis de los diferentes experimentos de RMN realizados sobre las distintas áreas del tejido cardíaco aislado del modelo de IM en fase aguda.



Fuente	SS	df	MS	Chi-sq	Prob>Chi-sq
Grupos	1,43E+6	3	475344,4	68,31	9,81E-15
Error	8,99E+6	496	18126,2		
Total	1,04E+6	499			



Fuente	SS	df	MS	Chi-sq	Prob>Chi-sq
Grupos	1,43E+6	3	477100,4	68,57	8,66E-15
Error	8,99E+6	496	18115,6		
Total	1,04E+7	499			

Figura R5 a. Diagramas de cajas y tablas Kruskal-Wallis para el modelo de IM en fase aguda. Diagramas de cajas y test Kruskal-Wallis para (a) la intensidad de brillo relativa de T₁ y (b) el tiempo de relajación T₂. En ambos casos se observan diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tejidos a estudio. IM= Infarto de miocardio; T₁W= Intensidad de brillo T₁; Chi-sq= Chi cuadrado; df= Grados de libertad; MS= cuadrados medios; SS= Suma de cuadrados.

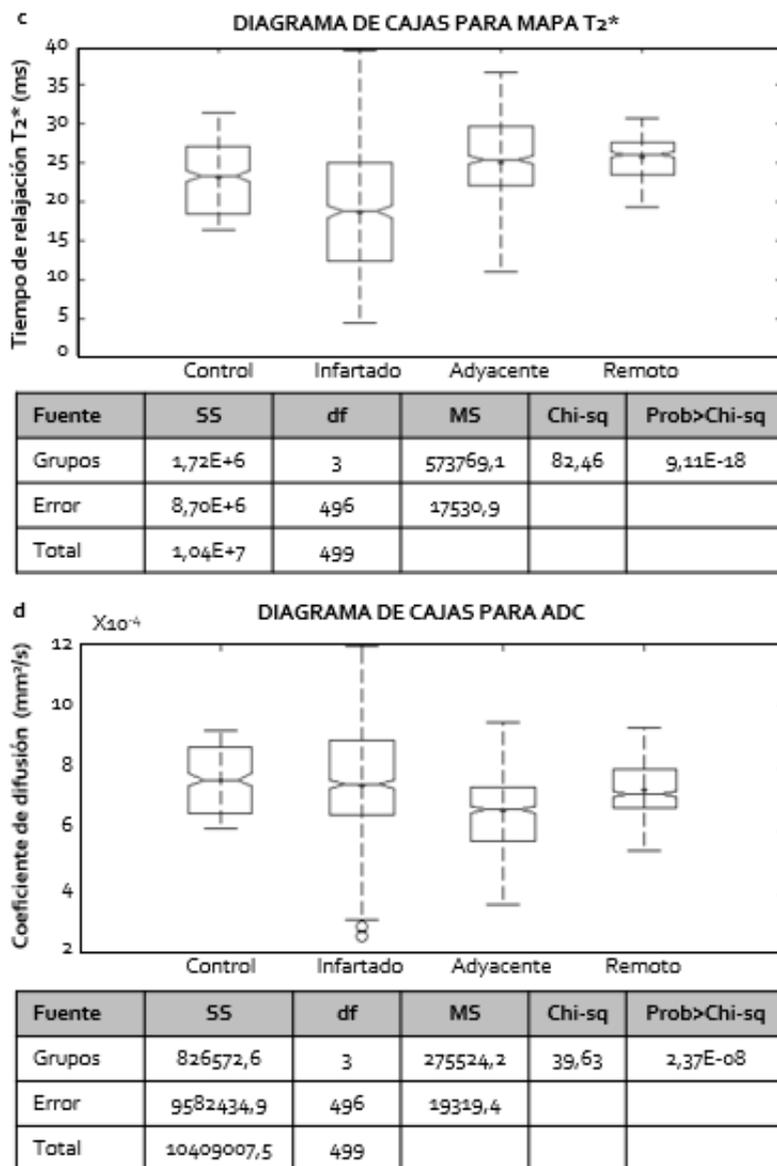


Figura R5 b. Diagramas de cajas y tablas Kruskal-Wallis para el modelo de IM en fase aguda. Diagramas de cajas y test Kruskal-Wallis para (c) el tiempo de relajación T₂* y (d) el ADC. En ambos casos se observan diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tejidos a estudio. IM= Infarto de miocardio; ADC= Coeficiente de difusión aparente; Chi-sq= Chi cuadrado; df= Grados de libertad; SS= Suma de cuadrados.

El tejido remoto presenta las intensidades de brillo de T1 más bajas seguidas del tejido infartado. El tejido adyacente y el control presentan intensidades de brillo T1 similares, pero los valores están mucho más compactos en este último. En cuanto a los tiempos de relajación T2 y T2*, los tejidos adyacente y remoto tienen valores similares, mientras que el infarto, pese a su gran variabilidad, presenta los valores más bajos. El control mantiene tiempos de relajación intermedios. Por lo que al ADC respecta, el tejido infartado y el control tienen los valores más elevados, seguidos del tejido remoto. El tejido adyacente es el que tiene los valores de ADC más bajos. Nótese la amplitud de los bigotes en los cuatros experimentos de las zonas infartada y adyacente.

Con el fin de averiguar si las diferencias lo eran con respecto al tejido control, utilizamos la prueba T de Dunnett (Tabla R3).

Tabla R3. Resultados para la prueba T de Dunnett (bilateral) para el modelo de IM en fase aguda.

Variable dependiente	Tejido (i)	Tejido (j)	Diferencia de medias (i-j)	Error estándar	Sig.	95 % Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Intensidad relativa de brillo T ₁	Infartado	Control	-1014488	286344	0,001*	-1680862	-348115
	Adyacente	Control	-146972	298666	0,913	-842020	548075
	Remoto	Control	-2017852	319650	0,000*	-2761733	-1273971
Tiempo de relajación T ₂	Infartado	Control	-0,4394	0,7833	0,879	-2,26216	1,3835
	Adyacente	Control	4,2406	0,8170	0,000*	2,33940	6,1419
	Remoto	Control	4,1393	0,8744	0,000*	2,10449	6,1741
Tiempo de relajación T ₂ *	Infartado	Control	-4,4051	0,8204	0,000*	-6,31415	-2,4960
	Adyacente	Control	1,8931	0,8557	0,066	-0,09819	3,8843
	Remoto	Control	2,5810	0,9158	0,013*	-0,44987	4,7122
ADC	Infartado	Control	-0,0000	0,0000	0,579	-0,00006	0,0000
	Adyacente	Control	-0,0001	0,0000	0,000*	-0,00014	-0,0000
	Remoto	Control	-0,0000	0,0000	0,230	-0,00008	0,0000

IM= Infarto de miocardio; ADC = Coeficiente de difusión aparente.

Significancia estadística (Sig.) de cada variable medida para cada estado del tejido en el infarto de miocardio agudo frente al tejido control.

(*) La diferencia es significativa en el nivel 0,05.

En el modelo de IM en fase aguda, observamos que todos los tejidos pueden diferenciarse del tejido control mediante un par de variables magnéticas. El tejido infartado presenta diferencias estadísticamente significativas frente al tejido control en los valores de brillo de T1 y los tiempos de relajación T2*, al igual que el tejido remoto, que además también lo hace con los valores de tiempo de relajación T2. Por su parte, el tejido adyacente se diferencia del control mediante los tiempos de relajación T2 y los valores de ADC.

Tras comprobar que las varianzas entre tejidos son distintas, aplicamos una prueba de Games-Howell para averiguar qué regiones presentaban diferencias entre sí. La variable ADC es específica del tejido adyacente, ya que las diferencias son únicamente con esta área. Por el contrario, los tiempos de relajación T2 y T2* son buenos diferenciando entre las regiones infartada y remota, y las intensidades de brillo de T1 lo es, además, con la adyacente.

5.1.2.2 MODELO DE IM EN FASE CRÓNICA

La prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov con corrección de Lilliefors rechaza H0 en todas las variables, por lo tanto, el conjunto de datos del modelo de IM en fase crónica tampoco sigue una distribución normal, así que utilizamos test no paramétricos. La prueba de Kruskal-Wallis arrojó diferencias estadísticamente significativas para todas las variables.

En la figura R6 a y R6 b se presentan los diagramas de cajas y la tabla de resultados para la prueba Kruskal-Wallis de los diferentes experimentos de RMN realizados sobre las distintas áreas del tejido cardíaco aislado del modelo de IM en fase crónica.

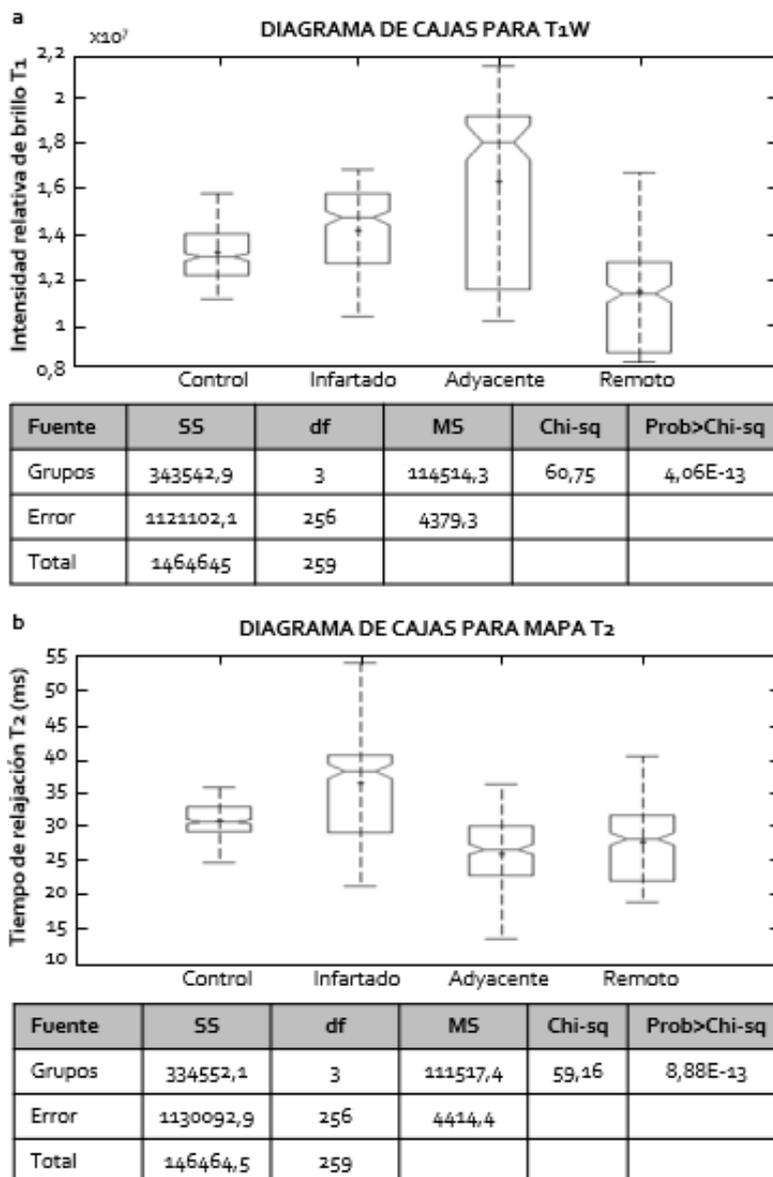


Figura R6 a. Diagramas de cajas y tablas Kruskal-Wallis para el modelo de IM en fase crónica. Diagramas de cajas y test Kruskal-Wallis para (a) la intensidad de brillo relativa de T₁ y (b) el tiempo de relajación T₂. En ambos casos se observan diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tejidos a estudio. IM= Infarto de miocardio; T₁W= Intensidad de brillo T₁; Chi-sq= Chi cuadrado; df= Grados de libertad; MS= Cuadrados medios; SS= Suma de cuadrados.

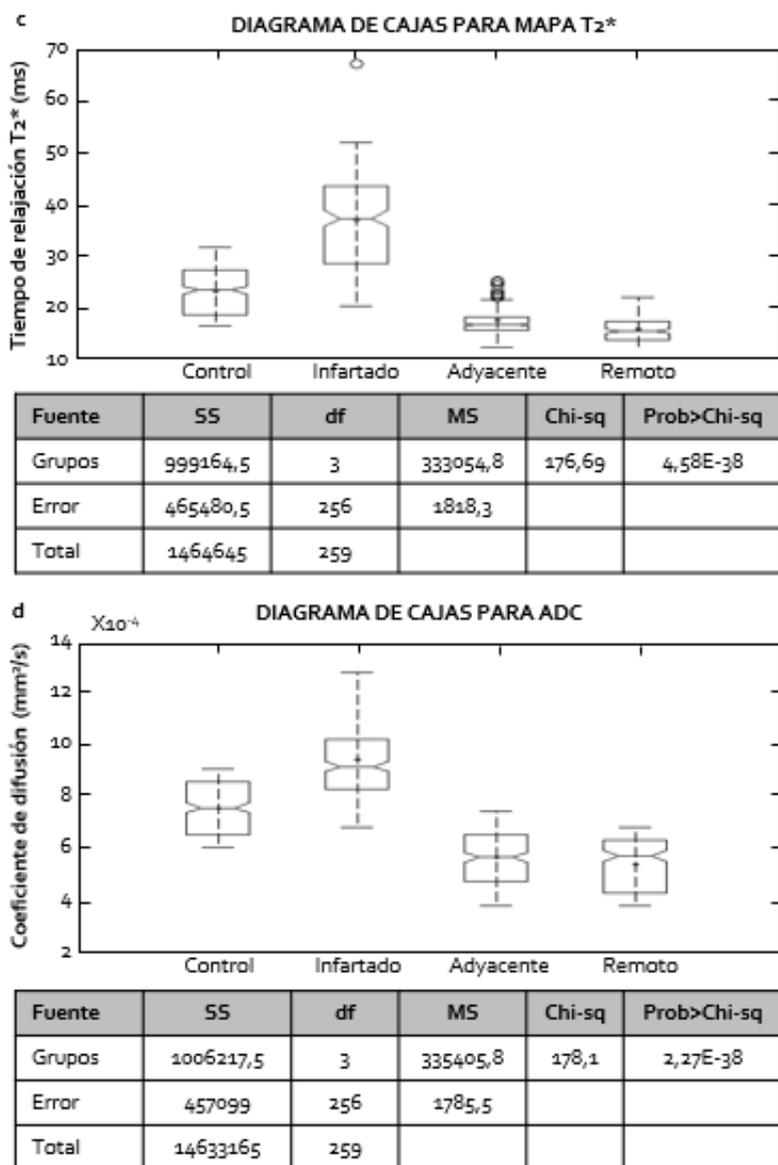


Figura R6 b. Diagramas de cajas y tablas Kruskal-Wallis para el modelo de IM en fase crónica. Diagramas de cajas y test Kruskal-Wallis para (c) el tiempo de relajación T₂* y (d) el coeficiente de difusión aparente. En ambos casos se observan diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tejidos a estudio. ADC= Coeficiente de difusión aparente; Chi-sq= Chi cuadrado; df= Grados de libertad; IM= Infarto de miocardio; MS= Cuadrados medios; SS= Suma de cuadrados.

Los tejidos adyacente y remoto presentan valores similares de tiempo de relajación T2 y T2*, y de ADC, que además son los más bajos. Esto sigue siendo válido en el caso del tejido remoto también para la intensidad de brillo de T1, pero no para el tejido adyacente, que alcanza en este caso los valores más elevados de manera notoria. En cuanto al tejido infartado, es el que mayores tiempos de relajación T2 y T2*, y ADC tiene con diferencia. Además, la variabilidad de todos los tejidos disminuye considerablemente, excepto para la intensidad de brillo de T1.

La prueba T de Dunnett que compara los diferentes tejidos frente al control para el modelo de IM en fase crónica lo podemos ver en la tabla R4.

Tabla R4. Resultados para la prueba T de Dunnett (bilateral) para el modelo de IM en fase crónica.

Variable dependiente	Tejido (i)	Tejido (j)	Diferencia de medias (i-j)	Error estándar	Sig.	95 % Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Intensidad relativa de brillo T1	Infartado	Control	1016727	427501	0,050*	1498	2031955
	Adyacente	Control	3218496	427501	0,000*	2203268	4233725
	Remoto	Control	-1764777	427501	0,000*	-2780005	-749549
Tiempo de relajación T2	Infartado	Control	5,5070	1,02916	0,000*	3,0630	7,9510
	Adyacente	Control	-4,7966	1,02916	0,000*	-7,2406	-2,3525
	Remoto	Control	-3,1125	1,02916	0,008*	-5,5565	-0,6684
Tiempo de relajación T2*	Infartado	Control	13,7095	0,95580	0,000*	11,4397	15,9794
	Adyacente	Control	-5,7040	0,95580	0,000*	-7,9738	-3,4342
	Remoto	Control	-7,3718	0,95580	0,000*	-9,6417	-5,1020
ADC	Infartado	Control	0,0002	0,00002	0,000*	0,0001	0,0002
	Adyacente	Control	-0,0002	0,00002	0,000*	-0,0002	-0,0001
	Remoto	Control	-0,0002	0,00002	0,000*	-0,0003	-0,0002

IM = Infarto de miocardio; ADC = Coeficiente de difusión aparente.

Significancia estadística (Sig.) de cada variable medida para cada estado del tejido en el infarto de miocardio agudo frente al tejido control.

(*) La diferencia es significativa en el nivel 0,05.

En este modelo observamos que el tejido control básicamente presenta diferencias estadísticamente significativas frente a cualquier grado de daño tisular con cualquier secuencia de las empleadas.

Al igual que el modelo de IM en fase aguda, las varianzas no son iguales, así que efectuamos también una comparación entre tejidos en este modelo mediante la prueba de Games-Howell. Esta prueba mostró que existen diferencias para todos los pares con cualquiera de las variables, excepto entre los tejidos remoto y adyacente para el tiempo de relajación T2 y el ADC.

5.2 ANÁLISIS MULTIVARIANTES PARA DISCRIMINAR EL DAÑO MIOCÁRDICO EN FASE AGUDA Y EN FASE CRÓNICA TRAS UN INFARTO

El análisis estadístico evidenció diferencias significativas entre los distintos tejidos con las variables empleadas. Partiendo de estos resultados, decidimos generar modelos multivariantes que caracterizaran cada grado de lesión tisular en el tejido cardíaco infartado de manera magnética.

5.2.1 MODELOS PARAMÉTRICOS MULTIVARIABLES

Para facilitar el entendimiento del desarrollo de los modelos multivariantes, se expondrán de manera secuencial en el tiempo. Es decir, en este apartado empezaré hablando del modelo paramétrico desarrollado para la fase crónica post-IM y a continuación para el de la fase aguda.

5.2.1.1 MODELO INICIAL PARA LA FASE CRÓNICA POST-IM

La escala de brillo es una medida relativa propia de cada imagen, por lo que se optó por tomar estos valores directamente a partir de las imágenes potenciadas en T1, e intentar distintas estrategias de normalización para poder incluir la

relajación longitudinal en los modelos. Con lo cual, comentaré la evolución que tuvo esta componente en particular conforme se avanzó hacia nuestro siguiente objetivo, los mapas multiparamétricos.

Empezamos trabajando con el modelo de IM en fase crónica. Primero se realizaron distintos PCA para averiguar qué componentes de las variables eran las que mejor clasificaban las distintas regiones estudiadas (figura R7).

Como se ha mencionado en la introducción, anteriormente se consideraba que el daño producido por el infarto no llegaba hasta el área remota, por lo que este tejido no se veía alterado. Basándonos en estos estudios, utilizamos la media intramuestral de las ROIs de cada animal, para normalizar los valores de intensidad de brillo T₁, de modo que la muestra de referencia perteneciese al mismo corte de corazón que los fragmentos a los que normalizaba. Las muestras control las normalizamos con la media de intensidad de brillo T₁ de cada animal.

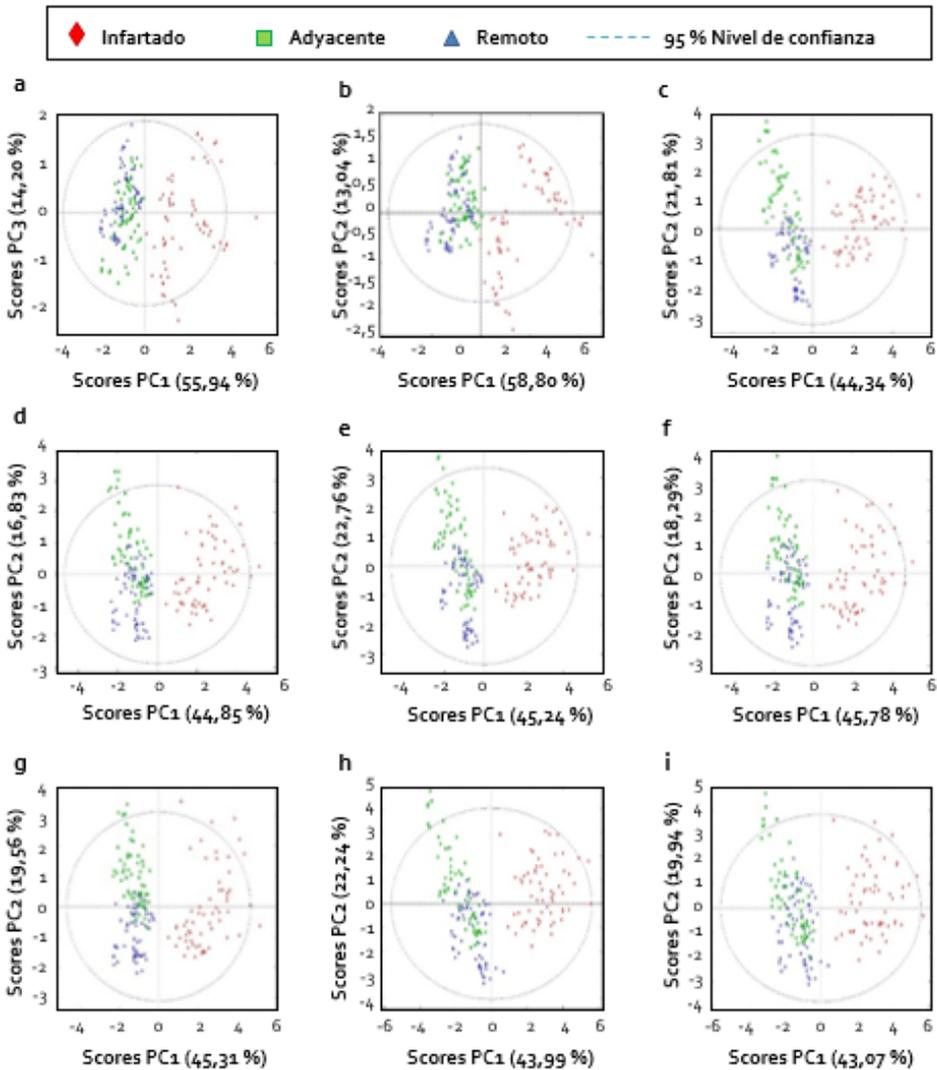


Figura R7. PCA evaluados en el modelo de IM en fase crónica. Diagrama de puntuaciones PCA probados para seleccionar las variables que mejor clasificaban las regiones (infarto= rojo; adyacente= verde; remoto= azul). (a) Brillo relativo de T1 sin normalizar, tiempo de relajación T2 y T2*, y ADC; (b) Brillo relativo de T1 normalizado a su remoto, tiempo de relajación T2 y T2*, y ADC; (c) Brillo relativo de T1 sin normalizar, tiempo de relajación T2 y T2*, ADC, rangos de T1, T2, T2* y ADC; (d) Brillo relativo de T1 normalizado a su remoto, tiempo de relajación T2 y T2*, ADC, rangos de T1, T2, T2* y ADC; (e) Brillo relativo de T1 sin normalizar, tiempo de relajación T2 y T2*, ADC, y las desviaciones estándar de T1, T2,

T2* y ADC; (f) Brillo relativo de T1 normalizado al remoto, tiempo de relajación T2 y T2*, ADC, y las desviaciones estándar de T1, T2, T2* y ADC; (g) Brillo relativo de T1 y su desviación estándar normalizados al remoto, tiempo de relajación T2 y T2*, ADC, y las desviaciones estándar de T1, T2, T2* y ADC; (h) Brillo relativo de T1 sin normalizar, tiempo de relajación T2 y T2*, ADC, las desviaciones estándar de T1, T2, T2* y ADC, y los rangos de T1, T2, T2* y ADC; (i) Brillo relativo de T1 normalizado a su remoto, tiempo de relajación T2 y T2*, ADC, las desviaciones estándar de T1, T2, T2* y ADC, y los rangos de T1, T2, T2* y ADC. IM= Infarto de miocardio; PCA= Análisis de componentes principales; PC = Componente principal; ADC= Coeficiente de difusión aparente.

Tras este análisis, consideramos que la heterogeneidad del tejido (estimada como la desviación estándar) era un parámetro importante, por lo que se definió cada región estudiada con las 4 magnitudes magnéticas y la desviación estándar de cada una de ellas, con la intensidad de brillo relativa de T1 normalizada al tejido remoto (figura R8).

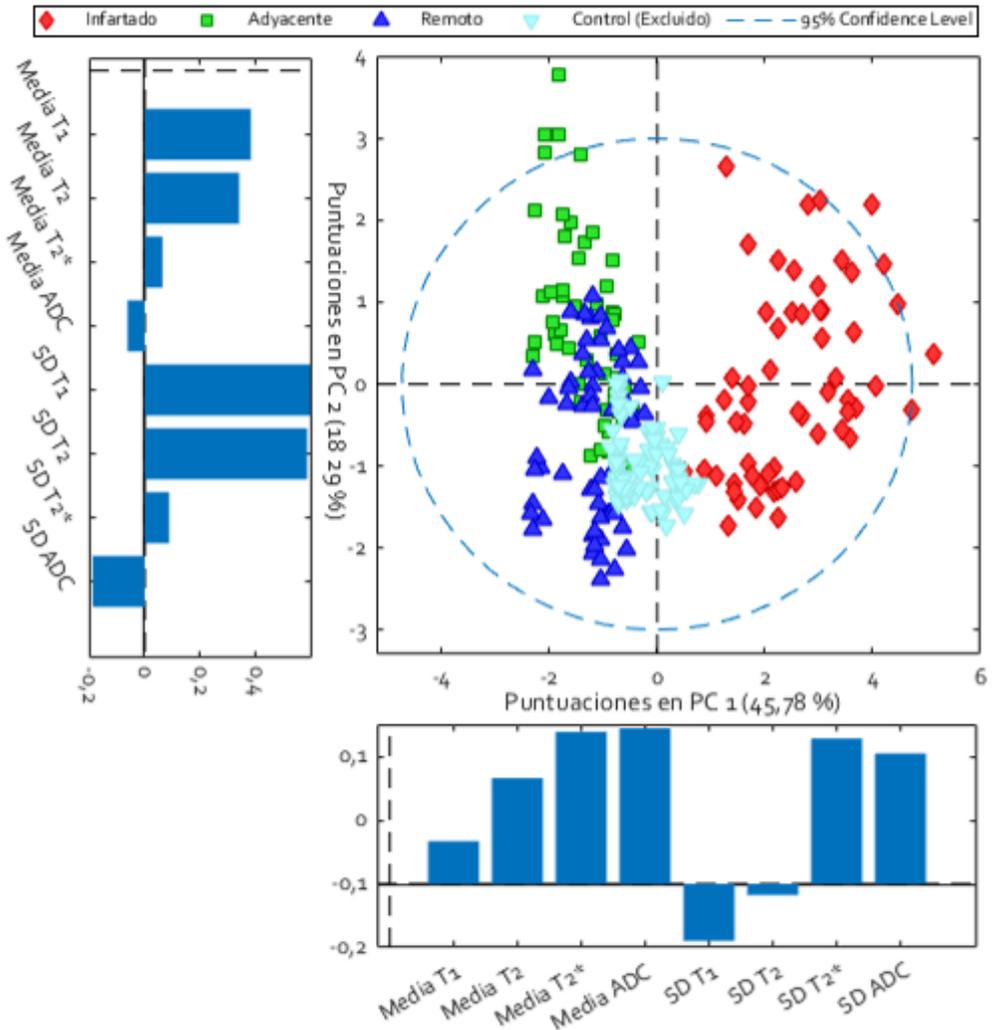


Figura R8. PCA del modelo de IM en fase crónica. Diagrama de puntuaciones PCA para observar la distribución de los diferentes tipos tisulares cardíacos en función de las cuatro magnitudes magnéticas (intensidad de brillo relativa T1, tiempo de relajación T2 y T2*, y ADC). Debajo de cada componente se muestra el vector de cargas correspondiente. El grupo control (azul claro) está proyectado. IM= Infarto de miocardio; PCA= Análisis de componentes principales; PC= Componente principal; SD= desviación estándar; ADC= Coeficiente de difusión aparente.

La primera componente principal (PC) del PCA, con una variabilidad explicada del 45,78 %, es la que muestra mayor tendencia a la separación entre la zona infartada y el resto. Las variables con mayor peso en esta PC1 son las medias de los tiempos de relajación T2* y ADC y sus desviaciones estándar. Por otra parte, la segunda componente principal, explica el 18,29 % de la variabilidad. Las desviaciones de la intensidad de brillo relativa T1 normalizada al remoto y el tiempo de relajación T2 son las variables de mayor peso en esta PC2, que, aunque no se aprecia una separación completa entre el tejido remoto y el adyacente, sí existe una tendencia clara.

Con el fin de conseguir maximizar la separación entre los tres tipos de regiones presentes en el corazón tras un infarto, se empleó una técnica discriminativa, el PLS-DA.

El primer modelo lo hicimos con la misma matriz de datos que utilizamos para construir el PCA. El nuevo modelo consiguió mejorar la separación entre las tres áreas del corazón con IM, y discriminar perfectamente las muestras infartadas frente a las regiones adyacente y remota (figura R9). La variable latente principal (LV1= 45,75 %) tiene como variables de mayor contribución para la clasificación del tejido infartado a los tiempos de relajación T2*, ADC y sus respectivas desviaciones estándar. En cambio, es la segunda variable latente (LV2= 16,58 %) la que contribuye en mayor medida a la separación de los tejidos remoto y adyacente. La variable con mayor peso en la LV2 es la intensidad de brillo relativo T1 normalizado al remoto y su desviación estándar.

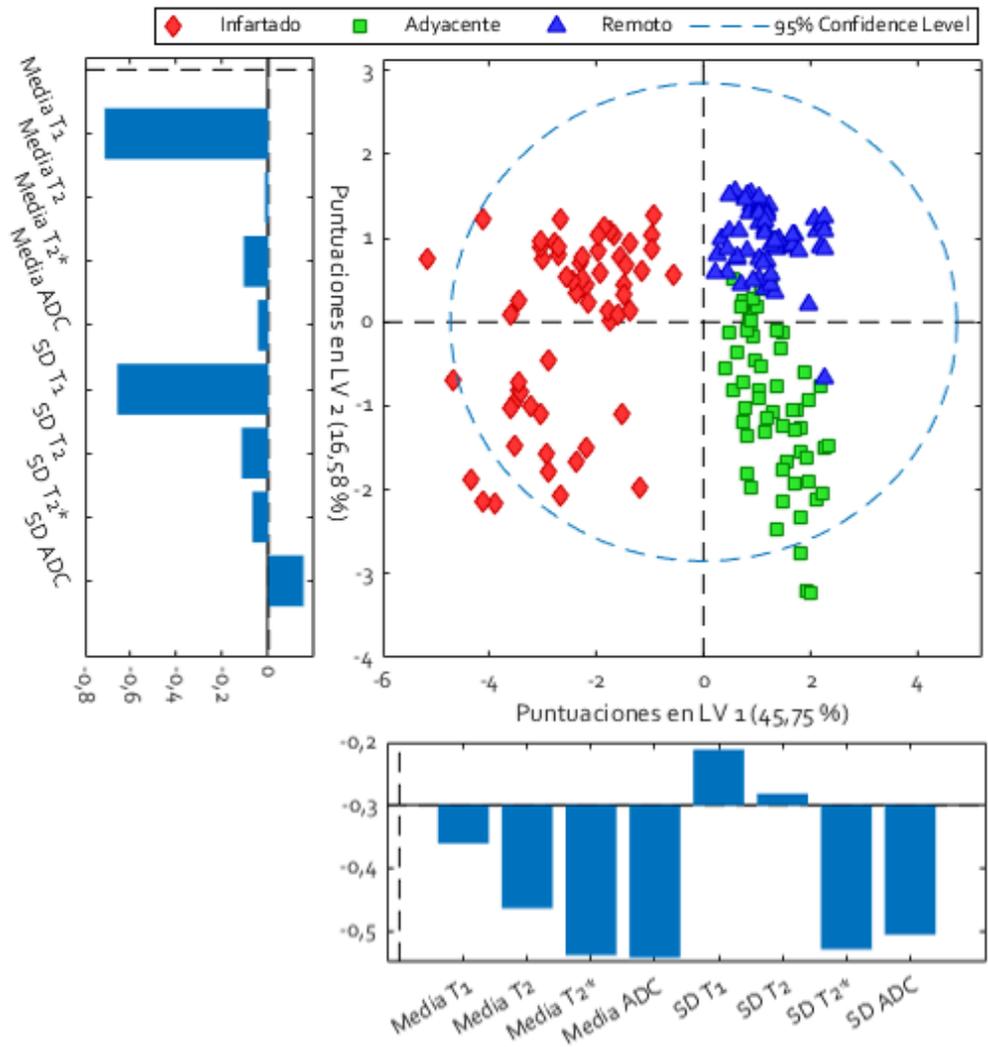


Figura R9. PLS-DA inicial del modelo de IM en fase crónica. Diagrama de puntuaciones PLS-DA para la clasificación de los tres grados de daño tisular. Debajo de cada LV se encuentra el vector de cargas correspondiente. Las variables magnéticas de mayor peso para separar tejido infartado de los otros dos son los tiempos de relajación T₂* y ADC, y sus respectivas desviaciones. El tejido remoto y el adyacente se separan principalmente con los valores de intensidad de brillo de T₁ normalizado al remoto y su desviación estándar. IM= Infarto de miocardio; PLS-DA= Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales; LV= Variable latente; SD= desviación estándar; ADC= Coeficiente de difusión aparente.

Calculamos para todos los modelos PLS-DA la correspondiente curva ROC de validación. Para el tejido infartado, el AUC es 1, lo que se interpreta como un modelo excelente, es decir, discrimina perfectamente la cicatriz de colágeno que se ha formado en las zonas infartadas del resto de tejido. En el tejido adyacente y en el remoto, la situación es muy similar; sus AUC se encuentran muy próximas a uno (región adyacente $Y_2 = 0,9710$; región remota $Y_3 = 0,9947$). Por tanto, es un buen modelo discriminante (figura R10).

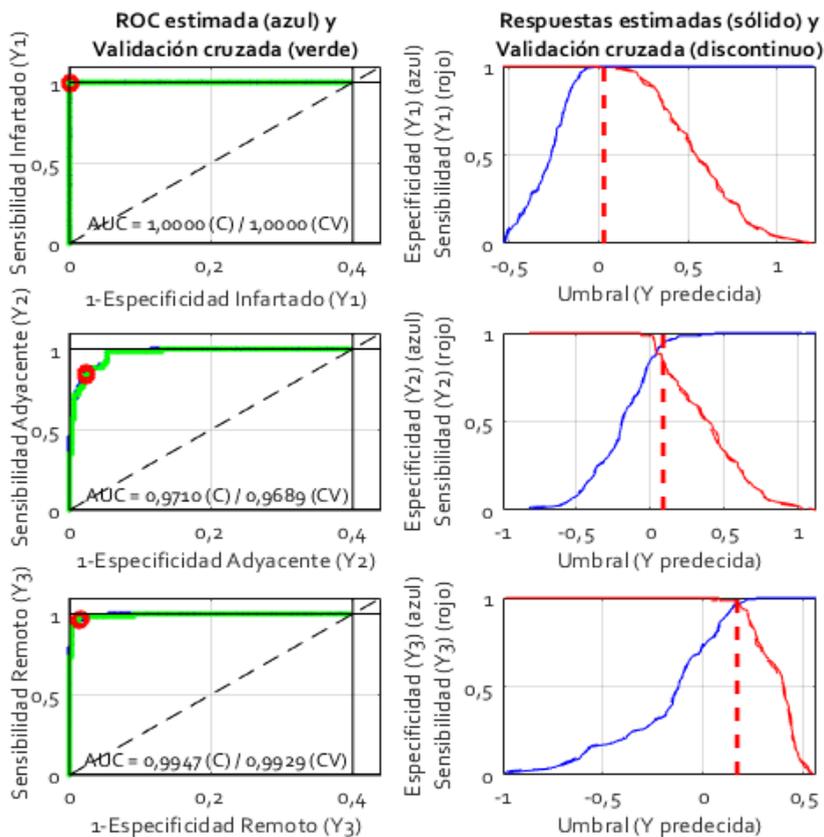


Figura R10. Curvas ROC del PLS-DA inicial del modelo de IM en fase crónica. Curvas ROC y umbral de predicción para la discriminación de los tres tipos de tejido: infartado (Y_1), adyacente (Y_2) y remoto (Y_3), mediante el modelo PLS-DA. IM= Infarto de miocardio; PLS-DA= Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales; ROC= Característica operativa del receptor; AUC= Área bajo la curva; C= Clasificación correcta; CV= Validación cruzada.

En este modelo, también se probó a analizar los tejidos por pares. Es decir, cuál era la capacidad de diferenciar entre el tejido infartado y los otros tejidos (adyacente y remoto) por separado, al igual que entre ellos (figura R11).

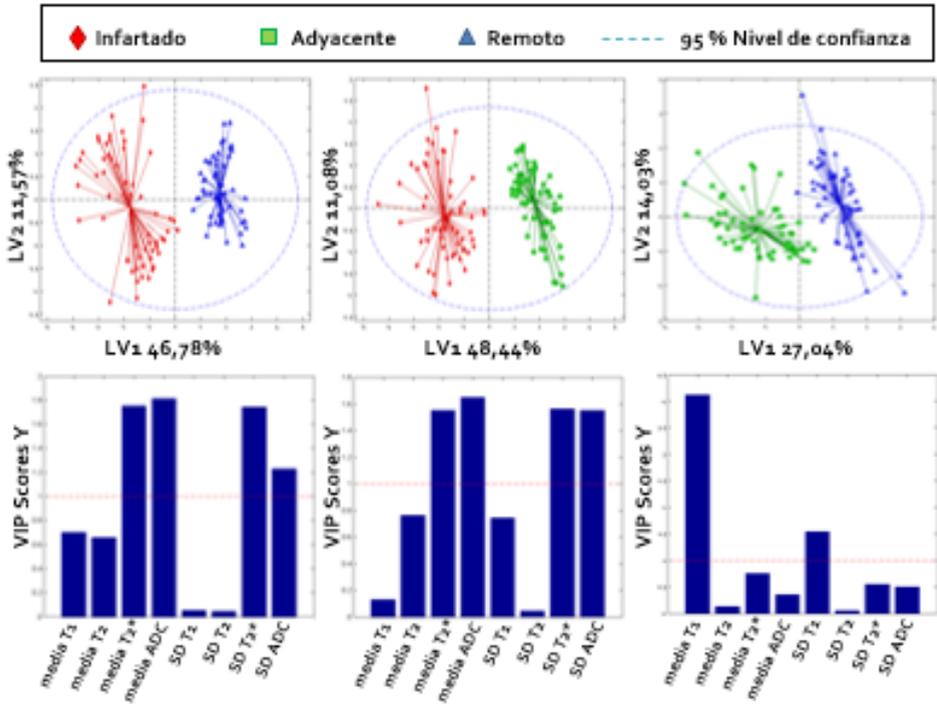


Figura R11. PLS-DA inicial del modelo de IM en fase crónica por pares y sus diagramas VIP scores. Diagramas de puntuaciones de los modelos PLS-DA que discriminan entre las diferentes regiones de tejido por pares, y los diagramas de barras con los VIP scores de cada modelo. La línea horizontal punteada roja muestra el 0 en la gráfica. El tejido infartado se representa en rojo, el tejido adyacente en verde y el tejido remoto en azul. Este primer PLS-DA separa totalmente las diferentes áreas del corazón en la fase crónica tras un IM. Los VIP scores muestran la relevancia de los tiempos de relajación de T2* y el ADC para identificar el tejido infartado, mientras que la intensidad de brillo relativa de T1 separa adyacente y remoto. IM= Infarto de miocardio; PLS-DA= Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales; LV= Variable latente; SD= desviación estándar; ADC= Coeficiente de difusión aparente; VIP= importancia de la variable en la proyección.

Al construir los modelos por pares, la diferencia entre tejidos se agranda y la separación resulta más evidente. Las tendencias siguen semejantes al modelo principal desarrollado para la fase crónica tras un IM: para diferenciar el tejido infartado del resto contribuyen principalmente los valores de los mapas de T2* y ADC y sus correspondientes desviaciones estándar. Por el contrario, la variable que más ayuda a la separación entre remoto y adyacente sigue siendo la intensidad de brillo relativa T1.

5.2.1.2 MODELO INICIAL PARA LA FASE AGUDA POST-IM

Seguimos el mismo proceso con la población de la fase aguda post-IM. Primero realizamos un PCA (figura R12) para ver si en esta ocasión las muestras se agrupaban en función del área del miocardio.

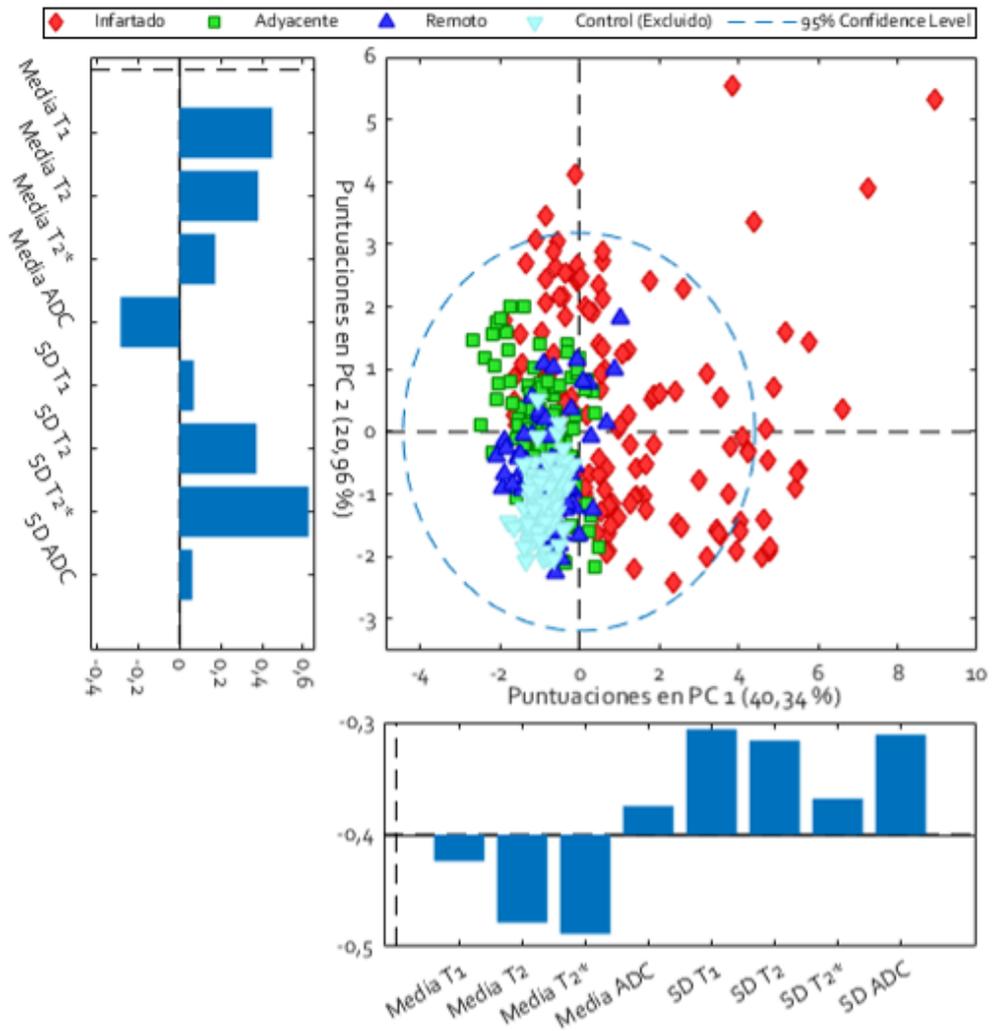


Figura R12. PCA del modelo de IM en fase aguda. Diagrama de puntuaciones PCA para observar la distribución de los diferentes tipos tisulares cardíacos en función de las cuatro magnitudes magnéticas (intensidad de brillo relativa T1, tiempo de relajación T2 y T2*, y ADC). Debajo de cada componente se muestra el vector de cargas correspondiente. El grupo control (azul claro) está proyectado. IM= Infarto de miocardio; PCA= Análisis de componentes principales; PC= Componente principal; SD= desviación estándar; ADC= Coeficiente de difusión aparente.

El modelo PCA para la fase aguda tras un IM fue menos concluyente que el de la fase crónica. Sin embargo, podemos observar una separación creciente de los casos, desde el grupo control (en este caso proyectado) hasta el grupo infartado, como ocurre en la fisiopatología de esta enfermedad.

A continuación, construimos un PLS-DA (figura R13), al igual que en el modelo de IM en fase crónica, para tratar de mejorar esta clasificación entre los tres tipos de tejido del corazón isquémico.

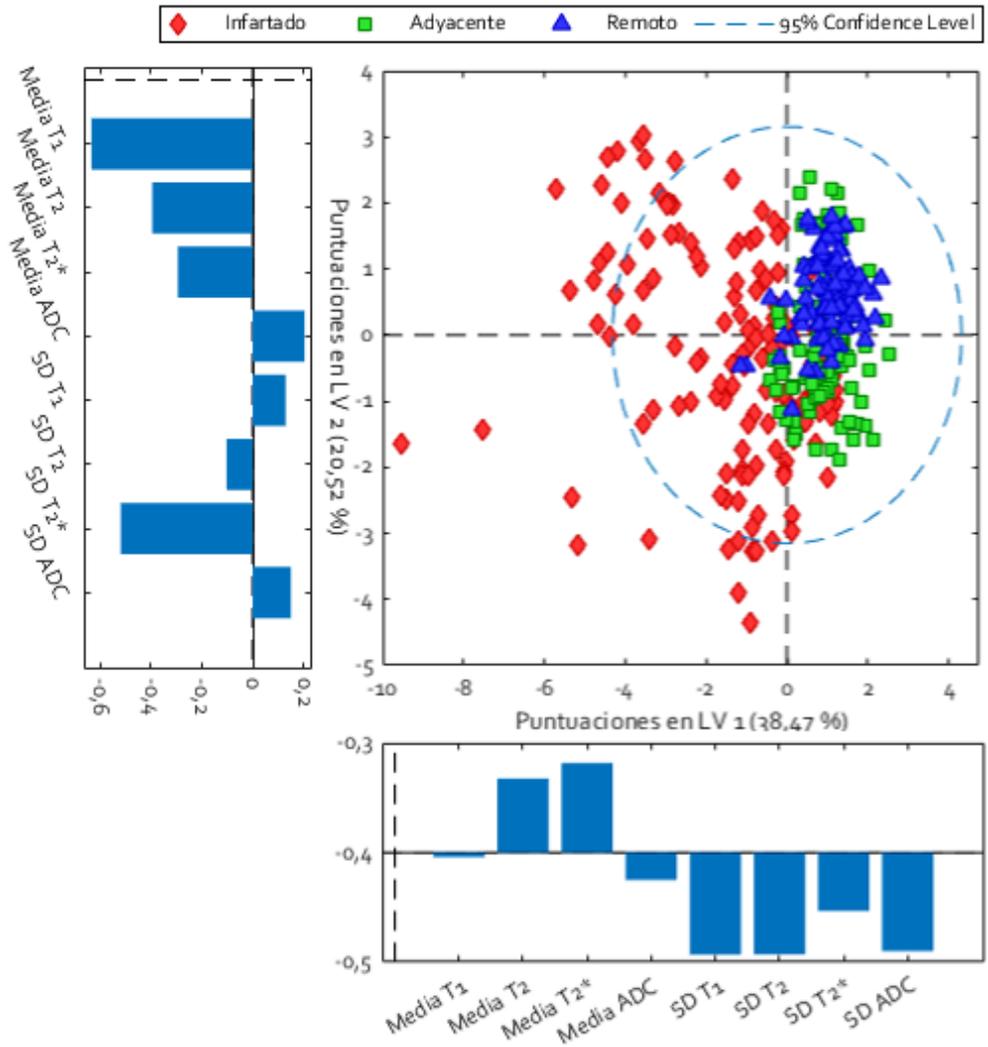


Figura R13. PLS-DA inicial del modelo de IM en fase aguda. Diagrama de puntuaciones PLS-DA para la clasificación de los tres grados de daño tisular. Debajo de cada LV se encuentra el vector de cargas correspondiente. Las variables magnéticas de mayor peso para separar tejido infartado de los otros dos siguen siendo tiempo de relajación T₂* y ADC, y sus respectivas desviaciones. El tejido remoto y el adyacente se separan principalmente en función de valor de la intensidad de brillo T₁ y su desviación estándar. Existe una gran dispersión del tejido infartado frente al remoto y el adyacente. IM= Infarto de miocardio; PLS-DA= Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales; LV= Variable latente; SD= desviación estándar; ADC= Coeficiente de difusión aparente.

El peso de las variables magnéticas es similar en el PCA y en el PLS-DA, donde los valores de tiempo de relajación T2 y T2* y las desviaciones estándar de T1, de T2 y de ADC aportan la contribución principal. En ambos, el tejido infartado presenta una gran dispersión frente al tejido remoto y adyacente, debido a la presencia de edema, infiltrado inflamatorio y necrosis de cardiomiocitos. Por el contrario, los tejidos adyacente y remoto están muy solapados, debido a que varían principalmente en el grado de edema.

Sin embargo, los valores AUC de las curvas ROC (figura R14) de este modelo PLS-DA de la fase aguda post-IM presentan valores aceptables. El AUC para el tejido infartado y para el remoto es de 0,94 y 0,86 respectivamente, mientras que para el tejido adyacente es de 0,73. El umbral de predicción, tanto para el tejido infartado como para el remoto, está próximo a 1. El tejido infartado es más específico y el tejido remoto más sensible. Por otra parte, el umbral para el tejido adyacente es más aleatorio.

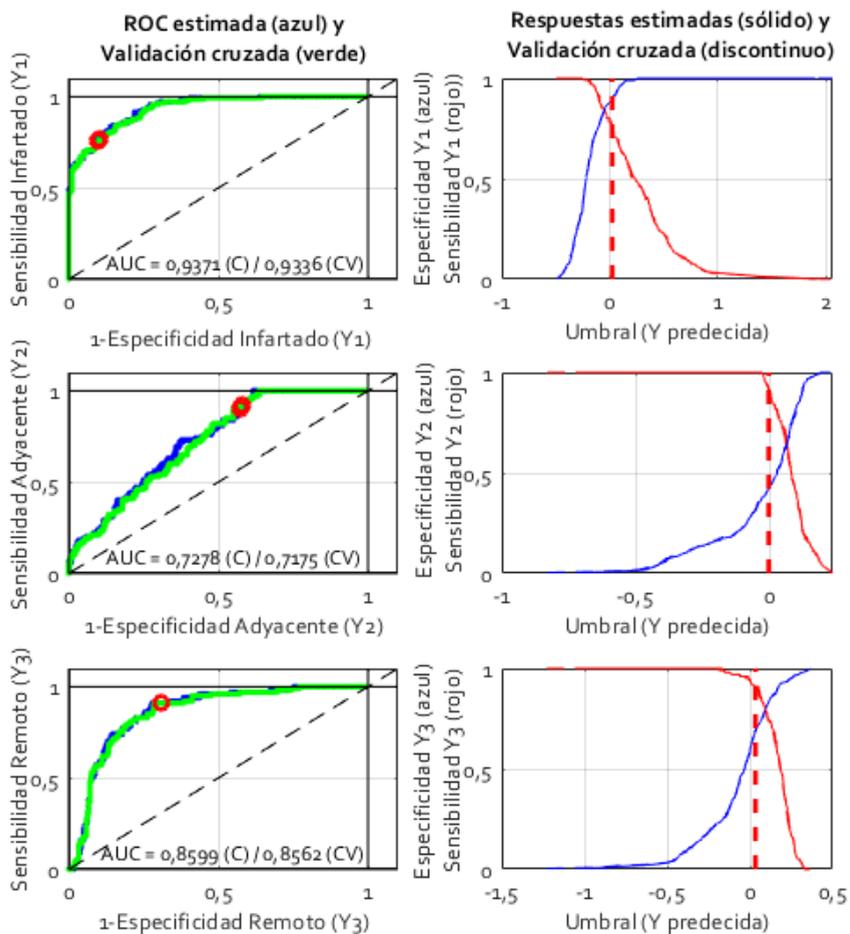


Figura R14. Curvas ROC del PLS-DA inicial del modelo de IM en fase aguda. Curvas ROC y umbral de predicción para la discriminación de los tres tipos de tejido: infartado (Y₁), adyacente (Y₂) y remoto (Y₃), mediante el modelo PLS-DA. M= Infarto de miocardio; PLS-DA= Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales; ROC= Característica operativa del receptor; AUC= Área bajo la curva; C= Clasificación correcta; CV= Validación cruzada.

Cuando se construyen los modelos PLS-DA por pares, la separación entre grupos mejora notablemente (figura R15).

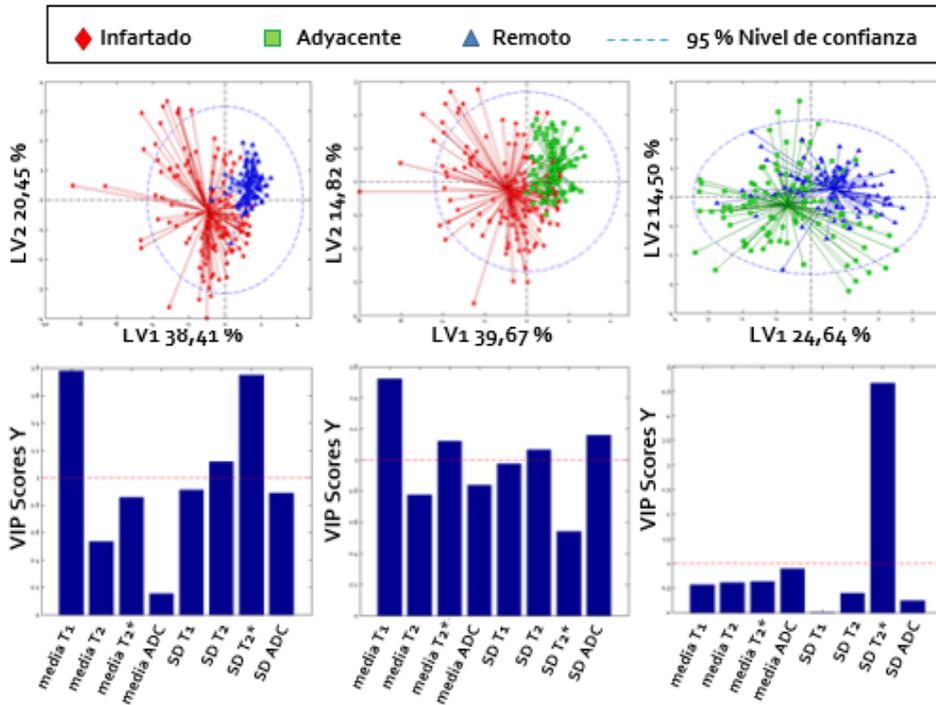


Figura R15. PLS-DA inicial del modelo de IM en fase aguda por pares y sus diagramas VIP scores. Diagramas de puntuaciones de los modelos PLS-DA para la fase aguda post-IM que discriminan entre los diferentes tipos de tejidos por pares y los diagramas de barras con los valores VIP scores para cada modelo. La línea punteada roja muestra el 0 en las gráficas. Los modelos muestran una separación mejorada entre tejidos. Se representa el tejido infartado en rojo, el tejido adyacente en verde y el tejido remoto en azul. Los VIP scores muestran especialmente relevante los valores de intensidad de brillo T1 para identificar el tejido infartado, seguido de los tiempos de relajación T2*. Por otra parte, la SD_T2* destaca notoriamente en la separación de los tejidos adyacente y remoto. IM= Infarto de miocardio; PLS-DA= Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales; LV= Variable latente; SD= desviación estándar; ADC= Coeficiente de difusión aparente; VIP= importancia de la variable en la proyección.

Después de valorar la respuesta clasificatoria, las variables latentes y la sensibilidad y especificidad para cada tejido de cada modelo, decidimos cambiar la estrategia de normalización de T1 y construir modelos discriminantes entre el

área infartada y remota. Además, también se construyeron modelos sin la variable magnética ADC, puesto que esta medida se encuentra aún en fase de desarrollo para equipos clínicos de RMC debido al movimiento del corazón.

A continuación, se presenta una tabla resumen con diferentes opciones que se testaron para la construcción de los nuevos modelos con tal de homogenizar todas las medidas (tabla R5). Muchos de estos análisis PLS-DA se hicieron tanto para distinguir entre los tres tejidos, como sólo entre infartado y remoto. Sin embargo, ninguno conseguía clasificar de manera tan efectiva como la opción por la que nos decantamos finalmente.

Tabla R5. Tabla resumen con diferentes combinaciones de variables magnéticas empleadas en la construcción de modelos discriminativos entre los tejidos a estudio.

Modelos con ratios	T1/T2, T1/T2*, T2/T2*
	T1/T2, T1/T2*, T2/T2*, SD_T1/SD_T2, SD_T1/SD_T2*, SD_T2/SD_T2*
	T1/SD_T1, T2/SD_T2, T2*/SD_T2*
Modelos mixtos	T1/T2, T1/T2*, T2/T2*, SD_T1, SD_T2, SD_T2*
Modelos con SD	SD_T1, SD_T2, SD_T2*, SD_ADC
Modelos con intensidad relativa de brillo	T1, T2, T2*, ADC, SD_T1, SD_T2, SD_T2*, SD_ADC
	T1, T2, T2*, SD_T1, SD_T2, SD_T2*
	T1 normalizado a la diferencia entre el valor máximo y mínimo de cada imagen empleada.
Modelos con las diferentes normalizaciones que ofrece PLS_toolbox	Pareto MSC (media) MSC (mediana) PQN SNV (0, 1, 2) Normalizado al área Normalizado a la longitud Normalizado al máximo.

ADC= Coeficiente de difusión aparente; SD= desviación estándar; MSC= Corrección de dispersión multiplicativa; PQN= normalización del cociente probabilístico; SNV= Variable normal estándar.

A modo de resumen, se pretende mostrar en esta tabla la mayoría de los modelos que construimos con el fin de homogenizar las variables magnéticas. Los más exitosos se probaron tanto en la fase aguda como en la fase crónica después de un IM.

5.2.1.3 MODELOS FINALES PARA LA FASE AGUDA Y CRÓNICA POST-IM

Finalmente, se decidió eliminar el ADC, pese a su relevancia en el modelo crónico, para adaptarnos a los criterios clínicos, y normalizar la intensidad de brillo relativa de T1 con la ratio entre el valor promedio y la desviación estándar de cada ROI. Las otras variables se mantuvieron conforme estaban.

Además, debido a la complejidad asociada al modelo de IM en fase aguda para delimitar el tejido adyacente, decidimos extraer éste del estudio y centrarnos en diferenciar los estados tisulares extremos.

De este modo, los últimos modelos (figura R16 y R18) tenían 5 variables (ratio entre la media de brillo de T1 y su desviación estándar, medias de las relajaciones de T2 y T2*, y sus desviaciones estándar) y clasificaban únicamente entre infartado y remoto.

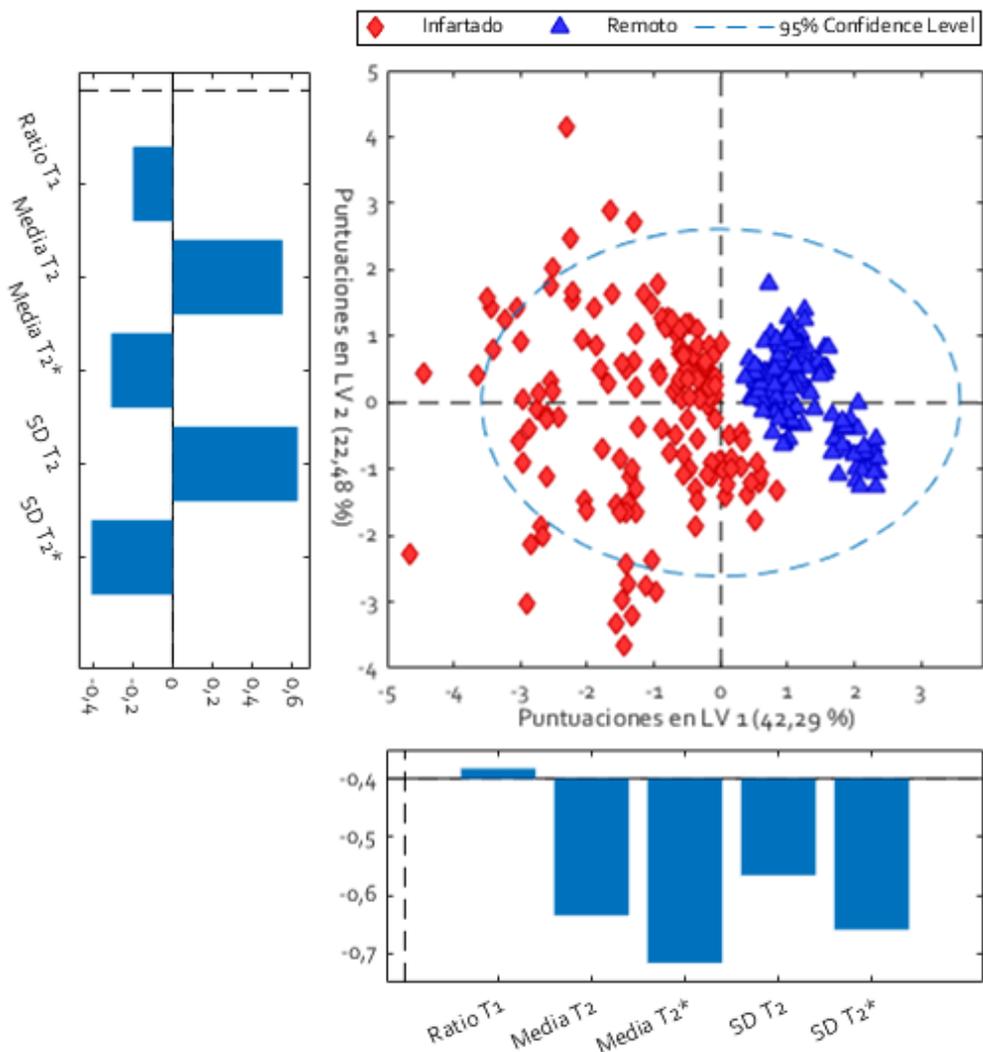


Figura R16. PLS-DA final del modelo de IM en fase crónica. Las variables con mayor peso en la distinción entre tejido infartado y remoto son el tiempo de relajación de T2* y su desviación estándar. IM= Infarto de miocardio; PLS-DA= Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales; LV= Variable latente; SD= desviación estándar.

En este último modelo PLS-DA para el modelo de IM en fase crónica, la LV1 explica el 42,29% de la variabilidad total entre los tejidos infartado y remoto. Las

variables magnéticas de mayor relevancia son las asociadas con la relajación transversal (T_2 y T_2^*).

Los valores AUC para las diferentes curvas ROC (figura R17) indican que el modelo construido tiene un alto valor para separar los dos tipos de tejido.

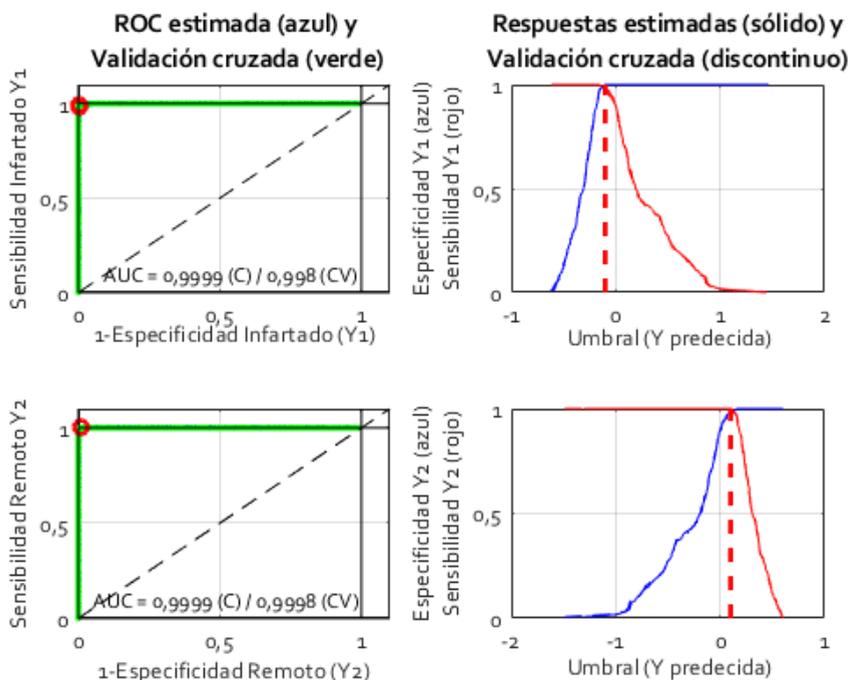


Figura R17. Curvas ROC del PLS-DA final del modelo de IM en fase crónica. Área bajo la curva para cada tejido: Infartado (Y_1) y remoto (Y_2). ROC= Característica operativa del receptor; PLS-DA= Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales; IM= Infarto de miocardio; AUC= Área bajo la curva; C= Clasificación correcta; CV= Validación cruzada.

En cuanto al último modelo PLS-DA generado para la fase aguda post-IM (figura R18), la LV_1 explica hasta un 52,33 % del total de la variabilidad asociada al sistema, y el peso de las 5 variables magnéticas es similar a la hora de determinar la pertenencia de un dato a un tejido. La LV_2 explica un 22,54 %, y su componente más relevante es la $SD_T_2^*$.

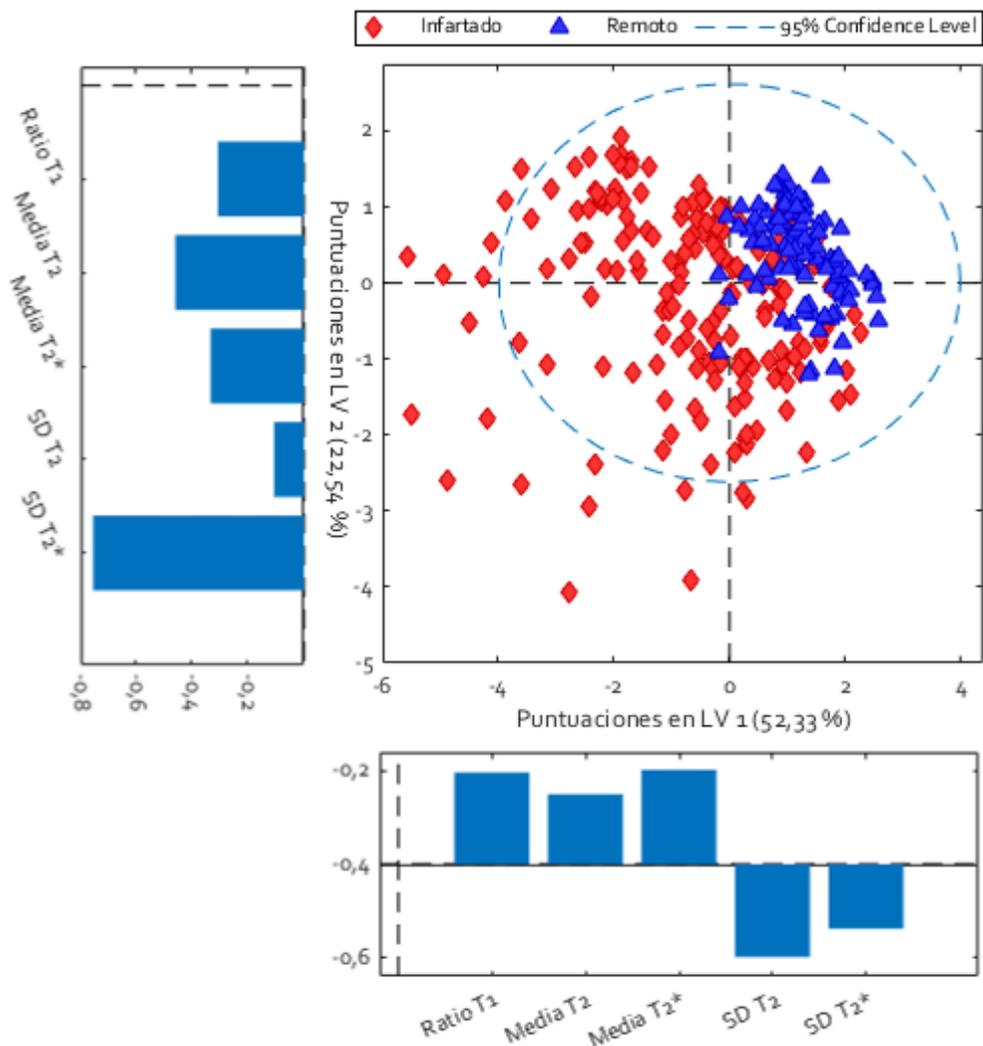


Figura R18. PLS-DA final del modelo de IM en fase aguda. Todas las variables son necesarias para explicar algo más del 50% de los datos del modelo para discriminar entre tejido infartado (rojo) y remoto (azul). PLS-DA= Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales; IM= Infarto de miocardio; LV= Variable latente; SD= Desviación estándar.

El modelo PLS-DA final para la fase aguda post-IM presenta valores muy altos de sensibilidad y especificidad para la discriminación de ambos tejidos. El AUC tanto para el tejido infartado como para el remoto es de 0,93 sobre 1. La respuesta

estimada en la validación cruzada en el tejido infartado se produce próxima al 0, mientras que el umbral de predicción del tejido remoto la sobrepasa levemente (figura R19).

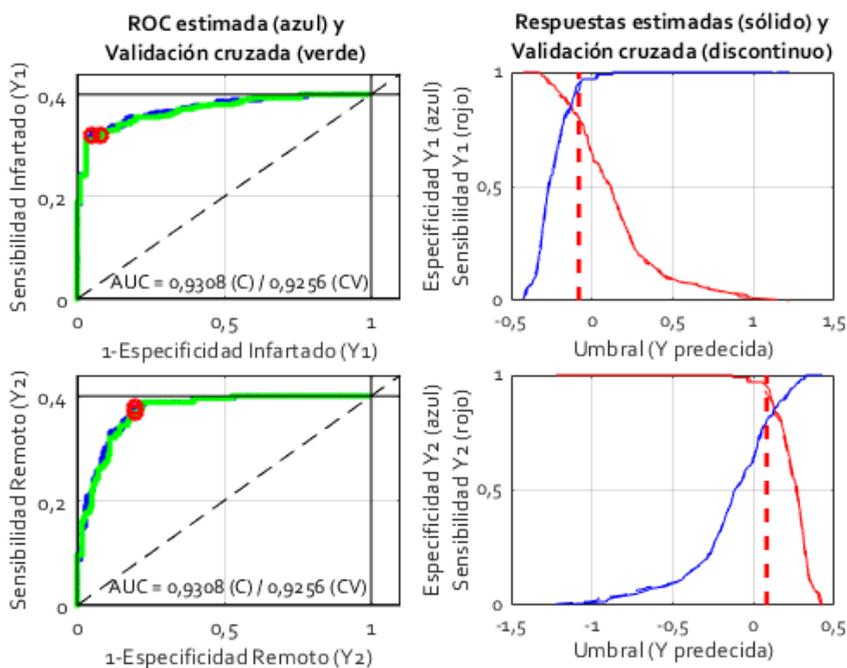


Figura R19. Curvas ROC del PLS-DA final del modelo de IM en fase aguda. Área bajo la curva para cada tejido: Infartado (Y1) y remoto (Y2). ROC= Característica operativa del receptor; PLS-DA= Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales; IM= Infarto de miocardio; AUC= Área bajo la curva; C= Clasificación correcta; CV= Validación cruzada.

A semejanza de lo observado para el modelo final de IM en fase crónica, la LV1 es la que contribuye en mayor medida a la separación de las muestras infartadas frente a tejido remoto. La contribución de las diferentes variables magnéticas a la LV1 es muy similar. Por el contrario, la desviación estándar de T2* es la variable que tiene mayor peso en la construcción de la LV2.

5.2.2 MAPAS PARAMÉTRICOS

Empleando como base los modelos discriminatorios multivariantes obtenidos previamente, se pretendió facilitar su entendimiento de una manera visual y práctica con la construcción de mapas paramétricos.

Estos mapas también han sufrido una evolución que ha ido unida a los cambios producidos en los modelos. Por ejemplo, a partir del momento en que prescindimos de la ADC, las matrices pasaron a construirse con 5 planos de profundidad. Además, a parte del proceso descrito en la metodología, que fue el que finalmente se utilizó, se probó una gran variedad de ajustes hasta dar con la fórmula que ilustra las predicciones del modelo de manera fidedigna.

En este apartado volveremos a seguir el orden establecido en el resto de la tesis (primero el modelo de IM en fase aguda y luego el de fase crónica). La evolución de los mapas multivariantes se muestra de manera resumida en las figuras R20 para el modelo en fase aguda y en la figura R21 para el modelo en fase crónica.

5.2.2.1 MODELO DE IM EN FASE AGUDA

Los mapas paramétricos para el modelo de IM en fase aguda presentan una clara mejora cuando construimos nuestro modelo PLS-DA en base a la discriminación entre los dos tipos de tejido más extremos (remoto e infartado). Los anteriores modelos no discriminaban con precisión. Sin embargo, como se veía anteriormente, el último modelo de 5 variables (ratio intensidad de brillo $T1/SD_T1$, tiempo de relajación $T2$, tiempo de relajación $T2^*$, SD_T2 y SD_T2^*) diferencia bastante bien la distribución del tejido infartado (rojo) y tejido remoto (azul) y hace una buena interpretación de los valores discriminatorios. Los píxeles de las muestras del tejido de la región remota son interpretados en azul, puesto que el daño tisular de esta zona es casi imperceptible. En cuanto al tejido infartado, vemos que hay una mezcla cromática. El tejido de la zona infartada sí

se interpreta de rojo, pero el tejido adyacente a esta región tiene una variedad de píxeles azules y rojos. Si observamos los mapas anteriores, observamos que las zonas que interpreta como remotas son en realidad zonas adyacentes, pero como eliminamos esta variable de la ecuación, el tejido más próximo identificado por el modelo sería el remoto. Sin embargo, el tejido que ha sido seriamente dañado es interpretado como infartado, es decir, que todas las regiones que han sufrido necrosis o que tienen gran abundancia de infiltración, se colorean mayoritariamente en rojo en cualquiera de los modelos para el IM en fase aguda.

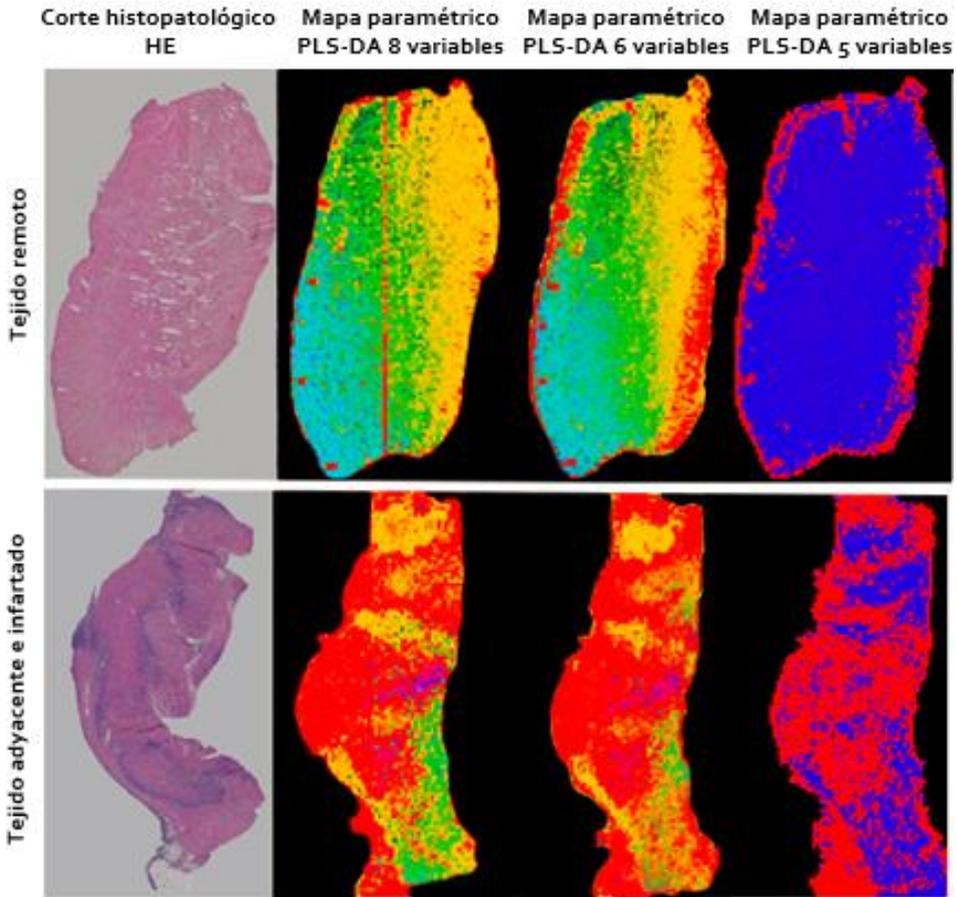


Figura R2o. Evolución de los mapas paramétricos del modelo de IM en fase aguda. En la fila superior se observan algunos de los mapas paramétricos del tejido remoto (azul) comparados con la HE del mismo corte, mientras que en la fila inferior están los propios para los tejidos adyacente (verde) e infartado (rojo). Los tonos intermedios corresponden a píxeles de tejido con valores de probabilidad de pertenencia intermedia a varios grupos. IM= Infarto de miocardio; HE= Hematoxilina-eosina; PLS-DA= Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales.

5.2.2.2 MODELO DE IM EN FASE CRÓNICA

En el caso del modelo de IM en fase crónica, ya se veía anteriormente que es mucho más específico que el de fase aguda. El primer mapa se construyó con las cuatro variables (T_1 , T_2 , T_2^* , y ADC) y teniendo en cuenta al tejido adyacente. Éste daba una representación visual fidedigna de lo que podíamos ver al microscopio óptico. Pero por las razones anteriormente expuestas de traslacionalidad clínica, se decidió ir en paralelo con el modelo de IM en fase aguda y eliminar la identificación del tejido adyacente.

También se intentó generar un modelo con valores de brillo de las imágenes ponderadas tanto en T_1 como en T_2 y T_2^* , para estudiar cuán importante era la diferencia introducida por este parámetro sin normalizar (figura R21- columna 3). El modelo arrojaba buenos resultados, pero a la hora de clasificar muestras externas no se mostraba robusto.

Por último, se puede ver los mapas paramétricos para el modelo crónico de 5 variables (ratio intensidad de brillo T_1/SD_T_1 , tiempo de relajación T_2 , tiempo de relajación T_2^* , SD_T_2 y $SD_T_2^*$) que distinguía entre tejido infartado y remoto. Tanto su visualización como la clasificación de nuevas muestras no incluidas para la construcción inicial del modelo de IM en fase crónica, es buena, y delimita muy bien las zonas de infarto. El hecho de que, con el tiempo, la actividad de cada región cardíaca se haya modulado según el daño sufrido, hace que los distintos tipos de tejido tengan características más estables y se hayan distanciado, confiriendo al modelo mayor capacidad predictiva.

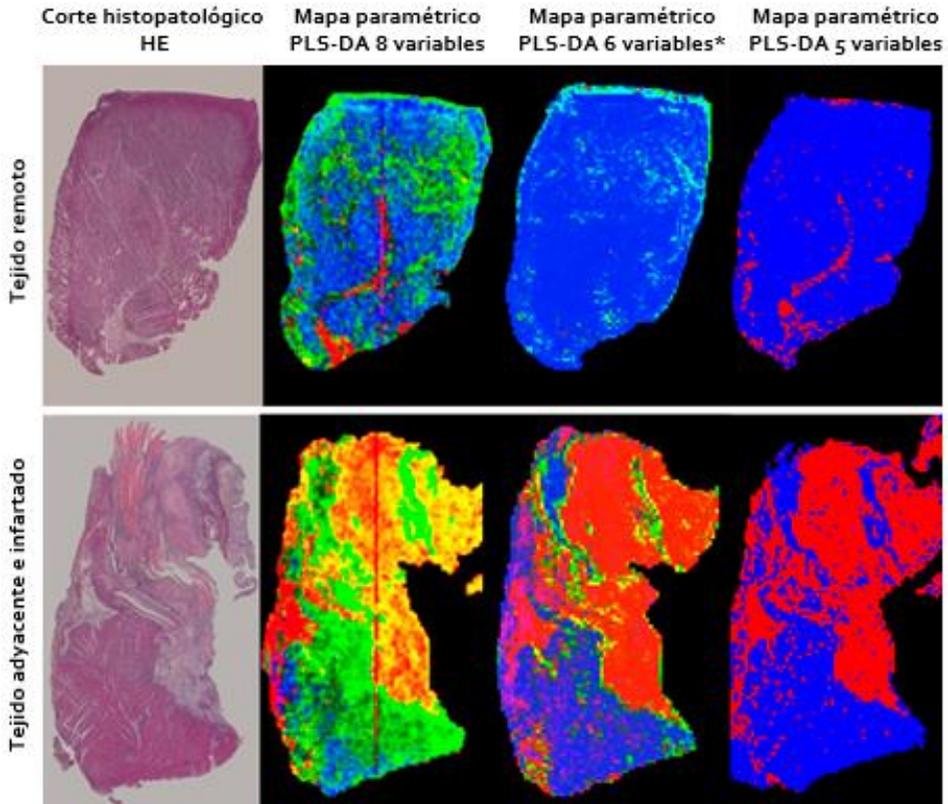


Figura R21. Evolución de los mapas paramétricos del modelo de IM en fase crónica. En la fila superior podemos ver algunos de los mapas paramétricos del tejido remoto (azul) comparados con la HE del mismo corte, mientras que en la fila inferior están los propios para los tejidos adyacente (verde) e infartado (rojo). Las tonalidades intermedias corresponden a píxeles que se encuentran a medio camino entre dos tipos de tejido. (*) Este PLS-DA de 6 variables se construyó con la intensidad de brillo de todas las variables magnéticas. IM= Infarto de miocardio; HE= Hematoxilina-eosina; PLS-DA= Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales.

6 DISCUSIÓN

6.1 DESARROLLO DE METODOLOGÍA DE IMAGEN DE ALTO CAMPO E HISTOPATOLOGÍA CORRELATIVA PARA PLATAFORMAS DE VALIDACIÓN DE MARCADORES DE MRM EN IMAGEN CARDÍACA

La premisa de partida para este objetivo es que la medición de distintas características magnéticas de una misma muestra de corazón porcino con MRM y su posterior combinación en un modelo multivariante, permite establecer un perfil magnético del daño tisular por reperfusión que se produce tras la fase aguda y crónica tras un IM.

A nivel macroscópico, la identificación de cada una de las áreas queda bien delimitada mediante las tinciones de TS y TZZ, tanto en la fase aguda como en la crónica después de un IM. Este protocolo se encuentra optimizado desde hace tiempo en el grupo de investigación y diferentes publicaciones utilizando este modelo se han realizado previamente (63-66).

Cabe señalar que, aunque se haga la distinción de tejido infartado, adyacente y remoto, todos son parte de un mismo órgano que ha sufrido un infarto, y que en realidad estos términos hacen referencia al impacto de éste sobre las células cardíacas que lo conforman. El daño tisular provocado por la isquemia se propaga en oleada (67) desde el territorio de irrigación de la ADA, en este caso, hacia el resto del corazón, de modo que va perdiendo fuerza conforme nos alejamos del foco de lesión, hasta llegar al otro extremo del miocardio, donde apenas se perciben los efectos.

A nivel microscópico, la falta de irrigación sanguínea en la zona de infarto desemboca en un proceso complejo que engloba mecanismos tanto celulares como moleculares. Los cardiomiocitos directamente afectados mueren por disfunción energética. Además, se propagan señales de alerta al resto del miocardio como respuesta. La falta de oxígeno promueve un cambio energético a rutas anaeróbicas, que en poco tiempo no pueden abastecer la demanda de energía y terminan con la hinchazón y destrucción de las mitocondrias, cariólisis, y finalmente, pérdida estructural por desintegración del citoplasma celular en el foco de infarto (68).

El entorno, ahora acidificado por el desequilibrio iónico, y la liberación de moléculas proinflamatorias, facilita la extravasación de líquido a la matriz extracelular desde los vasos sanguíneos (edema tanto intra como extracelular), y con ello la llegada de células leucocitarias. La infiltración de leucocitos es un proceso que se observa de manera abundante en la zona de infarto, y en menor grado en la zona adyacente a éste. Estas células liberan enzimas lisolíticos que degradarán las células muertas y activarán las rutas de apoptosis en células disfuncionales, preparando así el terreno para la siguiente fase (67).

En cuanto a la fase crónica tras un IM, la respuesta inflamatoria ha desaparecido dando lugar a procesos antiinflamatorios (69). El edema se ha reabsorbido y los neutrófilos son relevados por macrófagos antiinflamatorios y linfocitos T reguladores, que despejan el espacio afectado de restos celulares en la fase de remodelado (68).

Los cardiomiocitos que han podido restaurar su sistema energético seguirán formando parte del tejido funcional, y se acoplarán nuevamente al impulso eléctrico cardíaco, junto a los cardiomiocitos de la zona remota. Por el contrario, los disfuncionales son reemplazados, al igual que toda la zona necrótica del área

infartada, por tejido conjuntivo, formado por fibras de colágeno, principalmente de tipo I y III (70, 71) gracias a la función, sobre todo, de los fibroblastos.

Todos estos procesos que podemos observar mediante los cortes histológicos son también detectables en las imágenes obtenidas con el espectrómetro de campo ultra alto. Una de las ventajas de la utilización de estos campos magnéticos ultra altos es su mayor resolución y sensibilidad respecto a los equipos que se usan en la clínica, debido a la mejora intrínseca de la SNR (72). Las SNR obtenidas a partir de nuestras imágenes indican que son de muy buena calidad.

El uso de un escáner de 14,1 T con una resolución espacial superior a la RM convencional nos permite visualizar pequeños fragmentos del miocardio con alto detalle microestructural. La histopatología correlativa que se representa en las figuras R3 y R4 pone de relevancia la utilidad de la MRM. La cuidada disposición de los cortes histopatológicos permite cortar las muestras en la misma posición en la que se adquieren las imágenes de MRM, de modo que resulta sencillo correlacionar mediante las siluetas de cada corte de histopatología con su homónimo de MRM. Una vez orientadas, la identificación de las mismas estructuras en ambas imágenes, tales como vasos sanguíneos, direccionalidad de las fibras musculares, identificación de bandas de tejido conectivo, incluso el grado de lesión del propio tejido que deja al descubierto la tinción de HE, nos permite hacer una acertada elección de las ROIs características de cada región estudiada en el corazón infartado para definir el perfil magnético.

Queda patente el éxito de nuestra metodología para la obtención de cortes histopatológicos bien correlacionados con las imágenes de MRM. Este hecho es importante en cualquier validación de nuevos biomarcadores de imagen. Y

nuestra manera de proceder podría abrir la posibilidad de encontrar nuevos biomarcadores de imagen en cualquier otro campo.

El contraste endógeno ofrecido por las distintas secuencias de pulso es bastante alto. Las intensidades de brillo obtenidas en cada una de las regiones del corazón isquémico estudiadas en las imágenes potenciadas en T1, T2 y T2* y las imágenes moduladas por difusión, permiten discernir no sólo el tejido infartado del remoto, sino también los distintos procesos fisiopatológicos observados al microscopio óptico con las tinciones de HE, tanto en la fase aguda como crónica post-IM.

El tejido control o sano es isointenso en su extensión, y muy homogéneo en las imágenes adquiridas para todas las secuencias de pulso utilizadas en MRM. El análisis descriptivo del tejido control sitúa al 50% de los datos de intensidad de brillo T1 y de tiempo de relajación T2 en un rango intercuartílico bastante estrecho. Este rango es algo mayor para el tiempo de relajación T2* y para el ADC. Sin embargo, los límites superior e inferior de los cuatro experimentos no distan en gran medida. Se puede decir que la dispersión de los datos en las regiones de tejido sano es baja. Su perfil magnético está bastante acotado a valores intermedios: intensidad de brillo de T1= $1,3E7 \pm 1,26E6$; tiempo de relajación T2= $30,24 \pm 2,44$ ms; tiempo de relajación T2*= $23,64 \pm 4,87$; ADC= $8E-4 \pm 1,2E-4$.

Como hemos visto anteriormente, la fase aguda (alrededor de una semana) tras un IM se caracteriza por una gran actividad metabólica que da lugar principalmente a tres procesos: edema, infiltrado leucocitario y necrosis. El edema que aparece durante la fase aguda del infarto se muestra hiperintenso en las imágenes de MRM, sobre todo en las potenciadas en T1 y difusión. Estas últimas miden el movimiento browniano de los protones en el contexto de la

difusión de las moléculas de agua. La mayoría del agua que difunde de modo significativo en los tejidos es agua extracelular. Las moléculas de agua se difunden peor en tejidos con alta densidad celular, poco espacio extracelular, y elevada relación núcleo/citoplasma (73). Así, observamos que las imágenes potenciadas en difusión se vuelven hiperintensas en aquellas zonas donde los protones tienen más libertad de movimiento (edema), y son hipointensas en las zonas necrosadas y de gran acúmulo celular (infiltrados leucocitarios). Por su parte, los valores de tiempo de relajación transversal T₂ más elevados se asocian a mayor contenido de agua (74). En este contexto, observamos que la región adyacente presenta valores de tiempo de relajación T₂ (36,01 ± 5 ms) y T₂* (26,77 ± 4,92 ms) superiores a otras regiones y tejidos. Las fluctuaciones de estos valores en el tejido adyacente se deben, probablemente, a la incipiente presencia de infiltrados leucocitarios (hipointensos). El tejido remoto se comporta de manera similar al control, aunque sus valores son algo más elevados (T₂= 34,98 ± 3,56 ms; T₂*= 25,66 ± 2,58 ms), seguramente por el ligero edema. Además, presenta algunos valores atípicos, que asumimos por la prevalencia natural de tejido conectivo en el músculo cardíaco. En cuanto al tejido infartado, aunque sus valores medios de tiempo de relajación T₂ (30,57 ± 8,33 ms) y ADC (7,64E-4 ± 1,33E-4) son similares a los controles, la desviación estándar es claramente mayor. Hay que tener en cuenta que se trata de una región muy heterogénea donde confluyen edema, infiltración, y por supuesto, necrosis, y que cada uno de estos componentes presenta un perfil magnético bastante diferente.

Tras un mes del IM (fase crónica), está teniendo lugar la remodelación del tejido cardíaco mediante la formación de una cicatriz, principalmente de colágeno, y depósitos de elastina/tropoelastina (75). La figura R4 ilustra que la cicatriz de colágeno del tejido infartado presenta un aspecto hiperintenso con vetas más o menos oscuras en todas las imágenes potenciadas en T₁, T₂ o T₂*. Esta

intensidad de brillo se corresponde con el colágeno depositado en esta región, tal y como se observa con la tinción de *picrosirius red* bajo la luz polarizada del microscopio óptico. Además, parece ser que las vetas oscuras se corresponden a los depósitos de elastina/tropoelastina que le confieren cierta elasticidad al tejido reparado para evitar posibles rupturas por fragilidad, como informan Protti y colaboradores (75). Esta heterogeneidad en los valores de la intensidad de brillo de T1, de los tiempos de relajación T2 ($36,34 \pm 9,14$ ms) y T2* ($36,79 \pm 9,45$ ms), y de ADC ($9,59E-4 \pm 1,49E-4$) se debe justamente a esta disposición desorganizada de las fibras de colágeno y elastina (76), las cuales, al presentar propiedades magnéticas muy diferentes favorecen las elevadas desviaciones estándar de los diagramas de cajas para el tejido infartado. En cuanto a las regiones de tejido adyacente y remoto, excepto para los valores de intensidad de brillo T1 que son propios de cada imagen, el resto de las secuencias ve disminuido sus valores bruscamente hacia valores próximos al control, lo que indica la restauración del tejido. Sobre todo, el tiempo de relajación en T2*, el cual no sólo está por debajo de los valores control en ambas regiones, sino que además ahora se encuentran muy acotadas (T2* remoto= $15,71 \pm 2,61$ ms; T2* adyacente= $17,38 \pm 2,95$ ms). El mismo patrón sigue el ADC (remoto= $5,44E-4 \pm 1,03E-4$); adyacente= $5,7E-4 \pm 1,1E-4$), pese a que el comportamiento en las imágenes potenciadas en difusión es el mismo que en la fase aguda post-IM. Este dato es un buen ejemplo de porqué es importante poder extraer los datos cuantitativos de las imágenes, y no quedarnos sólo con lo visual, pues poseen información relevante, que puede ser el punto clave para un diagnóstico diferencial.

El estudio del tejido remoto del corazón isquémico lleva tiempo presentando controversias, tanto en la fase aguda como en la crónica tras un IM. Clásicamente se pensaba que esta parte del miocardio infartado no presentaba ningún grado

de afección estructural. Sin embargo, están apareciendo estudios que afirman lo contrario (77), pero también otros que siguen arraigados a esta idea. Nuestro estudio demuestra que sí existen diferencias tanto cualitativa como cuantitativa, respecto al tejido sano. Con los escáneres de menor potencia (1,5 y 3T) y las tinciones clásicas histopatológicas estas diferencias no se observaban, y se daba por hecho que el daño no llegaba al otro extremo del corazón (63). Sin embargo, con la resolución del equipo de 14,1 T, no sólo se manifiesta en los datos esta diferencia, sino que a nivel visual podemos ver como el tejido remoto de músculo cardíaco aislado en fase aguda y crónica del proceso de reparación tras un IM reperfundido, presenta diferente intensidad de señal respecto al control, haciendo más patentes las vetas de tejido conectivo que lo entrecruzan.

Las pruebas de contraste de hipótesis post hoc determinan que para la fase agudo post-IM los tiempos de relajación T₂ y T₂* son los más interesantes a la hora de discriminar entre tejido remoto e infartado. En cambio, la región adyacente se puede distinguir de los otros tejidos fundamentalmente con el ADC. La variable intensidad de brillo de T₁ es óptima, junto a los tiempos de relajación transversales T₂ y T₂*, para diferenciar un corazón sano de uno que ha sufrido un evento isquémico.

Para la fase crónica tras un IM, estas pruebas determinan que cualquiera de las variables puede discriminar entre tejido remoto e infartado, al igual que entre un corazón sano y uno fibrótico. En cambio, el tejido adyacente sólo puede ser diferenciado del remoto mediante la intensidad de brillo de T₁ y el ADC.

Aunque cada secuencia MRM individual permite observar con definición algunos elementos microestructurales, solo la combinación de todas ellas puede proporcionar patrones característicos específicos.

6.2 ANÁLISIS MULTIVARIANTES PARA DISCRIMINAR EL DAÑO MIOCÁRDICO EN FASE AGUDA Y EN FASE CRÓNICA TRAS UN INFARTO DE MIOCARDIO

El protocolo rutinario de RMC (78) dispone de múltiples secuencias destinadas a un único fin. Por ejemplo, las imágenes potenciadas en T2 se emplean para detectar edema y hemorragia (79), las imágenes con RTG para detectar infarto y obstrucción microvascular (11) y las secuencias CINE para el estudio de la función sistólica de ambos ventrículos (23). La utilización en la clínica de secuencias CINE en combinación con el RTG son las secuencias oro para la caracterización del daño estructural y funcional en el corazón tras un IM (12).

Además, los estudios de RMC también son útiles para estudiar el remodelado ventricular en las fases avanzadas tras un IM (80). Aunque su fiabilidad es muy alta, la utilización de estos medios de contraste exógenos tiene ciertas limitaciones, ya que prolongan los tiempos de estudio y no son recomendables para ciertos pacientes como por ejemplo los que tienen insuficiencia renal. Por otra parte, secuencias que no utilizan estos agentes de contraste exógeno tienen problemas en la delimitación de la zona infartada (81) o están aún en fases preclínicas como el mapeo de T1 nativo (29, 77) y la difusión (82).

Partiendo de las evidencias estadísticamente significativas obtenidas con las variables estudiadas, en esta Tesis Doctoral se ha extraído la información relevante de cada una de ellas combinándolas en modelos multivariantes, sin necesidad de usar agentes de contrastes, para caracterizar el grado de lesión tisular en el tejido cardíaco infartado mediante su perfil magnético. Esta propuesta que combina variables magnéticas con tecnología *machine learning* eliminaría las limitaciones con las que se encuentra la RMC.

Las técnicas de análisis multivariante tratan de encontrar patrones en la estructura de los datos mediante el análisis de muchas variables simultáneamente, dando un entendimiento más profundo de sus correlaciones. Los PCA son estudios que nos ayudan en una primera aproximación a descomponer los datos para ver si pueden ser una buena fuente de información (83). Por su parte, el PLS-DA utiliza el algoritmo de los mínimos cuadrados parciales para explicar y predecir la pertenencia de las observaciones a distintas clases utilizando una combinación de las variables explicativas (84). Este tipo de estudio se utiliza ampliamente en las ciencias ómicas (1, 85, 86). Nosotros hemos aplicado este mismo método en el otro flujo de trabajo que nos permite el espectrómetro de RMN y que es objeto de esta tesis, la MRM.

Los diferentes modelos PCA propuestos (figura R7) revelan que no solo los valores de las variables estudiadas son importantes para caracterizar los distintos tejidos de un corazón infartado, sino que también la variabilidad intra e interregional, expresada como desviaciones estándar, contribuyen de manera decisiva a la discriminación entre regiones. Así, más allá de los cambios que se producen en el tejido, el alto grado de heterogeneidad presente en la región miocárdica infartada, sobre todo en la fase aguda tras un IM, altera sus propiedades funcionales y también se debe tener en cuenta para su detección. De hecho, tanto en la fase aguda como en la fase crónica tras un IM las desviaciones estándar rivalizan en importancia con los propios valores de relajación y de ADC.

Los diagramas de puntuaciones del PCA generados para el modelo de la fase aguda y de la fase crónica revelan la evolución del miocardio tras la revascularización coronaria. En ambos modelos el grupo control o sano se ha proyectado sobre el resto de los tejidos en el diagrama. Sin embargo, se trata de un grupo compacto. En el diagrama de puntuaciones del PCA, el tejido de mayor

proximidad al tejido sano es el remoto, tanto tras la fase aguda como en la fase crónica tras un IM. En este mismo diagrama de puntuaciones, los vóxeles del tejido adyacente se separan de modo gradual de este tejido remoto, de manera cada vez más marcada conforme avanza el evento. Por su parte, la región infartada, sigue alejándose en el diagrama de puntuaciones del resto de vóxeles en el modelo de la fase aguda, pero sin desmarcarse completamente como lo hace en la fase crónica.

El análisis PLS-DA pretende encontrar perfiles discriminantes que permitan clasificar vóxeles en un análisis futuro. Los primeros PLS-DA tienen buenos resultados en la discriminación de remoto, adyacente e infarto para el modelo en fase crónica, con una AUC muy próxima a 1 para todos los tejidos, y un umbral de predicción muy bueno. En cambio, la discriminación por PLS-DA para el modelo en fase aguda es más débil y las AUC son relevantes de manera gradual, seguramente por la cantidad de procesos que acontecen durante los primeros días después de la revascularización. El umbral de predicción de los tejidos infartado y remoto son buenos, pero para el tejido adyacente el umbral óptimo de detección no está bien definido.

Al construir los análisis discriminantes por pares, los modelos PLS-DA en la fase crónica siguen dando muy buenos resultados. Esto podría tener gran utilidad en un algoritmo diagnóstico de tipo árbol de decisiones. En estos modelos, las LV separan todos los tejidos entre ellos: el tejido infartado del remoto se separa fuertemente gracias a las variables de tiempo de relajación $T2^*$ y ADC y sus correspondientes desviaciones estándar. Lo mismo ocurre entre el tejido infartado y el adyacente. Curiosamente, la variable de mayor peso (y casi única) para diferenciar el tejido adyacente del remoto es la intensidad de brillo de $T1$. Por el contrario, los modelos PLS-DA para la fase aguda tras un IM no son tan sólidos. El tejido infartado se diferencia del remoto con la intensidad de brillo de

T1 y la desviación estándar de T2*. Sin embargo, el mismo tejido infartado se diferencia del tejido adyacente además de con la intensidad de brillo de T1, mediante la desviación estándar de ADC y el tiempo de relajación T2*. Nuevamente, discriminar entre tejido adyacente y remoto es cuestión de una única variable, la desviación estándar de T2*.

Estos resultados indican que las intensidades de brillo de T1, el tiempo de relajación T2*, el ADC y las desviaciones estándar de T2* y de ADC juegan un papel importante en la caracterización tisular que acontece durante la fase aguda y crónica tras un IM reperfundido.

La elaboración de los modelos multivariantes para IM se hizo pensando siempre en una posible traslación a la clínica. Por ello, en una fase posterior del estudio, de carácter más traslacional, se descartó el uso de secuencias de difusión y se intentó hacer una normalización más práctica de T1. Actualmente, ya hay algunos ensayos de difusión en humanos que están teniendo buenos resultados en el ámbito del IM (82, 87-89). Por otra parte, el desarrollo de los mapas T1 está en auge, y ya se han implementado a la clínica (90, 91), por lo que en un futuro podrían mejorarse aún más los modelos. Sin embargo, en la actualidad un modelo basado en intensidad de brillo de T1 y que no requiera la adquisición de imágenes ADC parece más próximo a una aplicación clínica.

Tras los resultados obtenidos con los modelos anteriores, se optó por calcular la ratio entre la media de los valores de intensidad de brillo T1 de una ROI y su desviación estándar como modo de normalización intrínseca. Esta normalización permite tener un valor real de T1 al utilizar datos del propio tejido y seguir incluyendo la información que nos proporcionan tanto los valores de brillo T1 como su desviación estándar. Además, también se puede trasladar este

resultado al vóxel, que es la unidad volumétrica mínima que conforma las imágenes de RM.

Los modelos PLS-DA definitivos en esta fase traslacional se construyeron con 5 variables: la ratio T1 mencionada arriba, los tiempos de relajación T2 y T2*, y las desviaciones estándar de éstas. Los modelos con estas variables discriminan el tejido afectado del que no lo está, dejando a un lado la delimitación de adyacente. El modelo para la fase crónica post-IM tiene una AUC de 0,99 tanto para tejido infartado como remoto y un umbral predictivo de 1. Es decir, el modelo discrimina de modo exhaustivo la región ocupada por la cicatriz de colágeno. Las variables que más contribuyen a esta separación son el tiempo de relajación T2* y su desviación estándar, seguidas de cerca del tiempo de relajación T2 y su desviación estándar. Dada la ausencia de irrigación del área fibrótica, es de esperar que las variables procedentes de T2* sean un buen indicador, puesto que éste es sensible a las moléculas que contienen hierro (92-94), como la hemoglobina, rica en la región remota, donde el tejido ya ha restaurado su funcionamiento normal.

En cuanto al modelo para la fase aguda presenta un umbral de predicción bastante bueno, por encima de 0,8, pero no es tan preciso en la delimitación de la región infartada (AUC= 0,93 tanto para remoto como para infartado). La LV1, que explica el 52,33 % de esta separación, hace uso básicamente de las características de todas las variables, mientras que la LV2 (22,54 %) le da mayor relevancia a la desviación estándar de T2*. Pese a que la separación es menos eficiente que la del modelo de la fase crónica, sigue siendo buena. Y además demuestra la necesidad de extraer de cada variable magnética su información más valiosa, puesto que, en las fases iniciales del infarto, el tejido se encuentra muy activo. De hecho, los puntos de la región infartada presentan una expansión creciente, mientras que los de la región remota se encuentran más agrupados.

El uso de los modelos multivariantes PLS-DA para analizar simultáneamente imágenes MRM multiseuencia y extraer la información más valiosa de cada una de ellas ha sido decisivo para diferenciar con precisión las diferentes áreas (remota, adyacente e infartada) tras una semana (fase aguda) y un mes (fase crónica) de la reperfusión coronaria.

Para hacer más directa aún la posible aplicación de estos modelos en rutina clínica decidimos calcular mapas probabilísticos basados en los modelos PLS-DA. Al combinar todas las secuencias utilizadas en una matriz tridimensional y pasarla por el modelo PLS-DA, obtenemos una única imagen RGB con la probabilidad píxel a píxel de pertenecer al tejido infartado o remoto (figuras R20 y R21). Este mapa clasificador reúne toda la información valiosa extraíble de cada una de las secuencias empleadas en RMC de rutina y la proyecta en una única probabilidad, de modo que resulta fácil de interpretar y muy esclarecedora. La combinación de los datos matemáticos derivados de los modelos PLS-DA para proporcionar una vista probabilística sencilla representa una herramienta que facilita el análisis a los operadores de RMC y mejora el flujo de trabajo.

Otros estudios han utilizado enfoques multivariantes (95-100), pero el nuestro es el único que utiliza la RMN, sin contraste exógeno, y con validación histopatológica al detalle con MRM.

En la RMC de rutina, el RGT permite una cuantificación fiable del tejido necrótico y fibrótico después de un infarto. Pero, como ya se ha mencionado en varias ocasiones, el uso de este contraste es perjudicial en pacientes con función renal deficiente, y prolonga los estudios. Recientemente, se han hecho esfuerzos por obtener secuencias que no requieran de contraste, como las imágenes T1p (101, 102), y los mapas T1 nativo (103-105) y las imágenes potenciadas por difusión (88). En esta Tesis Doctoral, las imágenes probabilísticas se obtienen a partir de

la combinación de la información extraída de las secuencias magnéticas rutinarias sin uso de contraste. Y, además, la gran similitud entre estos mapas probabilísticos y la evaluación histológica de las mismas muestras manifiesta la fiabilidad de este enfoque y abre la puerta a nuevos marcadores de imagen.

El uso de la MRM para detectar el área de infarto en modelos experimentales podría usarse en el futuro como una plataforma para generar un modelo *in vivo* para obtener nuevos biomarcadores cardiovasculares potenciales de RM. La traslación a la clínica es compleja debido a las diferencias inherentes al campo magnético empleado (potencia del campo magnético principal y falta de homogeneidad en éste, cálculo de la ganancia propia para cada muestra, entre otros) y a factores experimentales (efectos por el lavado de la muestra para eliminar el exceso de sangre, manipulación de tejido *ex vivo*, volumen del espécimen) que afectan al comportamiento magnético del tejido, pero los principios físicos en los que se basa la MRM son los mismos que para la RMN convencional.

La metodología aplicada en esta Tesis Doctoral podría formar la base para futuras investigaciones destinadas a investigar nuevos biomarcadores de RMC sin agentes de contraste en enfermedades del miocardio. Además, ahorraría costes al sistema de salud, reduciendo el número de pruebas necesarias para evaluar el daño miocárdico tras un IM y eliminando la utilización innecesaria de sustancias de contraste.

Con este estudio pretendemos mostrar el gran potencial que tiene la MRM, no sólo en la caracterización del miocardio tras un IM que es el principal objetivo de este trabajo, sino que es una herramienta de gran capacidad que se podría aplicar a otras patologías.

7 CONCLUSIONES

- La microimagen por resonancia magnética con histopatología correlativa es una buena plataforma para el desarrollo de nuevos biomarcadores de resonancia magnética cardiovascular mediante el uso de modelos multiparamétricos.
- Tomando como referencia el daño histológico estudiado a nivel microscópico, las imágenes de microimagen por resonancia magnética permiten una adecuada caracterización estructural y morfológica de la composición miocárdica, así como diferenciar entre el tejido infartado y remoto en modelos experimentales de infarto agudo y crónico.
- Los modelos multivariantes desarrollados para los modelos experimentales de infarto de miocardio en fase aguda y crónica a partir de las secuencias de microimagen por resonancia magnética permiten una correcta discriminación entre el tejido infartado y remoto.
- Los mapas paramétricos de imágenes desarrollados a partir de los modelos multivariantes de microimagen por resonancia magnética de infarto de miocardio en fase aguda y crónica se corresponden adecuadamente con los mismos cortes analizados mediante microscopía óptica.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Wang X, Wang D, Wu J, et al. Metabolic Characterization of Myocardial Infarction Using GC-MS-Based Tissue Metabolomics. *International heart journal* 2017;58(3):441-446.
2. Boersma E, Mercado N, Poldermans D, Gardien M, Vos J, Simoons ML. Acute Myocardial Infarction. *The Lancet* 2003;361:847-858.
3. Rajiah P, Desai Y, Kwon D, Flamm SD. MR Imaging of Myocardial Infarction. *RSNA* 2013;33(5):1383-1412.
4. Bolognese L. Changing Patterns of ST Elevation Myocardial Infarction Epidemiology. *The American heart journal* 2010;160(6):S1-S3.
5. Smit, Coetzee, Lochner. The Pathophysiology of Myocardial Ischemia and Perioperative Myocardial Infarction. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 2020;34(9):2501-2512.
6. Beijnk WHC, van der Hoeven, N. W., Konijnenberg LSF, et al. Cardiac MRI to Visualize Myocardial Damage after ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: A Review of Its Histologic Validation. *Radiology* 2021;301(1):4-18.
7. Vogel B, Claessen BE, Arnold SV, et al. ST-segment Elevation Myocardial Infarction. *Nat Rev Dis Primers* 2019;5(1)
8. Niccoli G, Scalone G, Lerman A, Crea F. Coronary Microvascular Obstruction in Acute Myocardial Infarction. *European heart journal* 2016;37(13):1024-1033.

9. Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving Therapies for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of the American College of Cardiology* 2015;65(14):1454-1471.
10. Konijnenberg LSF, Damman P, Duncker DJ, et al. Pathophysiology and Diagnosis of Coronary Microvascular Dysfunction in ST-elevation Myocardial Infarction. *Cardiovasc. Res.* 2020;116(4):787-805.
11. Stillman AE, Oudkerk M, Bluemke DA, et al. Imaging the Myocardial Ischemic Cascade. *Int J Cardiovasc Imaging* 2018;34(8):1249-1263.
12. Dhore-Patil, Aneja. Role of Cardiovascular Magnetic Resonance in Ischemic Cardiomyopathy. *Heart failure clinics* 2021;17(1):41-56.
13. Pohost GM. The History of Cardiovascular Magnetic Resonance. *JACC. Cardiovascular imaging* 2008;1(5):672-678.
14. Mewton N, Liu CY, Croisille P, Bluemke D, Lima J. Assessment of Myocardial Fibrosis With Cardiovascular Magnetic Resonance. *Journal of the American College of Cardiology* 2011;57(8):891-903.
15. Karamitsos TD, Dall'Armellina E, Choudhury RP, Neubauer S. Ischemic Heart Disease: Comprehensive Evaluation by Cardiovascular Magnetic Resonance. *American Heart Journal* 2011;162(1):16-30.
16. Schuster, Makowski, Jansen, et al. Platelets in Cardiovascular Imaging. *Current vascular pharmacology* 2012;10(5):619-625.

17. Neisius U, El-rewaidy H, Kucukseymen S, et al. Texture Signatures of Native Myocardial T1 as Novel Imaging Markers for Identification of Hypertrophic Cardiomyopathy Patients without Scar. *J Magn Reson Imaging* 2020;52(3)
18. Wang G, Lee S, Yang Q, et al. Multicenter Study on the Diagnostic Performance of Native-T1 Cardiac Magnetic Resonance of Chronic Myocardial Infarctions at 3T. *Circulation. Cardiovascular imaging* 2020;13(6):e009894.
19. Aluja F, Heredia F. Cardiac Imaging Planes and Myocardial Segmentation in Magnetic Resonance Imaging. *Rev. Colomb. Radiol.* 2015;26(2):4213-4219.
20. Schulz-Menger J, Bluemke DA, Bremerich J, et al. Standardized Image Interpretation and Post Processing in Cardiovascular Magnetic Resonance: Society for Cardiovascular Magnetic Resonance (SCMR) Board of Trustees Task Force on Standardized Post Processing. *Journal of cardiovascular magnetic resonance* 2013;15(1):35.
21. Zhu Y, Yang D, Zou L, Chen Y, Liu X, Chung Y. T2STIR Preparation for Single-shot Cardiovascular Magnetic Resonance Myocardial Edema Imaging. *Journal of cardiovascular magnetic resonance* 2019;21(1):1-72.
22. Schuster A, Morton G, Chiribiri A, Perera D, Vanoverschelde JL, Nagel E. Imaging in the Management of Ischemic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 2012;59(4):359-370.
23. Guo F, Krahn PRP, Escartin T, Roifman I, Wright G. Cine and Late Gadolinium Enhancement MRI Registration and Automated Myocardial Infarct Heterogeneity Quantification. *Magn Reson Med* 2020;85(5)

24. Khan JN, McCann GP. Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging Assessment of Outcomes in Acute Myocardial Infarction. *World Journal of Cardiology* 2017;9(2):109.
25. Gavara, Rodriguez-Palomares, Valente, et al. Prognostic Value of Strain by Tissue Tracking Cardiac Magnetic Resonance After ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *JACC. Cardiovascular imaging* 2018;11(10):1448-1457.
26. Hassan S, Barrett CJ, Crossman DJ. Imaging Tools for Assessment of Myocardial Fibrosis in Humans: the Need for Greater Detail. *Biophys Rev* 2020;12(4):969-987.
27. Perea Palazón RJ, Ortiz Pérez JT, Prat González S, de Caralt Robira, T. M, Cibeira López MT, Solé Arqués M. Técnicas Paramétricas de Caracterización Tisular del Miocardio Mediante Resonancia Magnética (parte 1): Mapas de T1. *Radiología* 2016;58(3):164-177.
28. Sanz J, LaRocca G, Mirelis JG. Mapeo Miocárdico con Resonancia Magnética Cardíaca: Valor Diagnóstico de las Nuevas Secuencias. *Revista española de cardiología* 2016;69(9):849-861.
29. Liu X, Hou JL, Yang ZG, et al. Native T1 Mapping for Characterization of Acute and Chronic Myocardial Infarction in Swine: Comparison with Contrast-enhanced MRI. *J Magn Reson Imaging* 2017;47(5)
30. Rabi II, Millman S, Kusch P, Zacharias JR. The Molecular Beam Resonance Method for Measuring Nuclear Magnetic Moments. The Magnetic Moments of Li^{63} , Li^{73} and F^{19} . *Physical review* 1939;55(6):526-535.

31. Bloch F, Hansen WW, Packard M. The Nuclear Induction Experiment. *Physical Review* 1946;70(7 and 8):474-485.
32. Knight WD. Nuclear Magnetic Resonance Shift in Metals. *Phys. Rev.* 1949;1259-1260.
33. Hahn EL. Spin Echoes. *Physical review* 1950;80(4):580-594.
34. Shenkar R, Venkatasubramanian PN, Zhao J, Batjer HH, Wyrwicz AM, Awad IA. Advanced Magnetic Resonance Imaging of Cerebral Cavernous Malformations. *Neurosurgery* 2008;63(4):782-789.
35. Robert A. Pooley. Fundamental Physics of MR Imaging¹. *Radiographics* 2005;25(4):1087.
36. Bloch F. Nuclear Induction. *Phys. Rev* 1946;70(7):460-474.
37. Torrev HC. Bloch Equations with Diffusion Terms*. *Phys. Rev* 1956;104(3):563-565.
38. Magin RL, Hall MG, Karaman MM, Vegh V. Fractional Calculus Models of Magnetic Resonance Phenomena: Relaxation and Diffusion. *Critical reviews in biomedical engineering* 2020;48(5):285-326.
39. Capelastegui Alber A, Astigarraga Aguirre E, Salinas Yeregui T, Coronado Santos R. *Mapas Paramétricos Cardíacos*. Jan 1, 2014
40. Young IR, Szeverenyi NM, Du J, Bydder GM. Pulse Sequences as Tissue Property Filters (TP-filters): a Way of Understanding the Signal, Contrast and Weighting of Magnetic Resonance Images. *Quantitative imaging in medicine and surgery* 2020;10(5):1080-1120.

41. Dale BM, Brown MA, Semelka RC. T₂ Relaxation, T₂* Relaxation, and Spin Echoes. 7a ed. New York: John Wiley & Sons, Incorporated, 2015; 21-25.
42. Yousaf, Dervenoulas, Politis. Advances in MRI Methodology. International review of neurobiology 2018;141:31-76.
43. Ehrmann K, Pataky K, Stettler M, et al. NMR Spectroscopy and Perfusion of Mammalian Cells Using Surface Microprobes. Lab on a Chip 2007;7(3):381-383.
44. Olson DL, Peck TL, Webb AG, Magin RL, Sweedler JV. High-Resolution Microcoil ¹H-NMR for Mass-Limited, Nanoliter-Volume Samples. Science (American Association for the Advancement of Science) 1995;270(5244):1967-1970.
45. Gensanne D, Josse G, Lagarde JM, Vincensini D. High Spatial Resolution Quantitative MR Images: an Experimental Study of Dedicated Surface Coils. Physics in medicine & biology 2006;51(11):2843-2855.
46. Donald B. Twieg. The k-Trajectory Formulation of the NMR Imaging Process with Applications in Analysis and Synthesis of Imaging Methods. Medical Physics 1983;10(5):610-621.
47. Ernst RR. Nuclear Magnetic Resonance Fourier Transform Spectroscopy. Bioscience reports 1992;12(3):143-187.
48. Carr HY, Purcell EM. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. Physical review 1954;94(3):630-638.

49. Kim S, Pickup S, Hsu O, Poptani H. Enhanced Delineation of White Matter Structures of the Fixed Mouse Brain Using Gd-DTPA in Microscopic MRI. *NMR in biomedicine* 2009;22(3):303-309.
50. Blackwell ML, Farrar CT, Fischl B, Rosen BR. Target-specific Contrast Agents for Magnetic Resonance Microscopy. *NeuroImage (Orlando, Fla.)* 2009;46(2):382-393.
51. Okada T, Handa S, Ding B, et al. Insertable Inductively Coupled Volumetric Coils for MR Microscopy in a Human 7T MR System. *Magnetic resonance in medicine* 2022;87(3):1613-1620.
52. Coello E, Noeske R, Burns BL, et al. High-resolution Echo-planar Spectroscopic Imaging at Ultra-high Field. *NMR in Biomedicine* 2018;31(11)
53. Barisano G, Seppehrband F, Ma S, et al. Clinical 7 T MRI: Are we there yet? A Review about Magnetic Resonance Imaging at Ultra-high Field. *BJR* 2019;92(1094)
54. Rutland JW, Delman BN, Gill CM, Zhu C, Shrivastava RK, Balchandani P. Emerging Use of Ultra-High-Field 7T MRI in the Study of Intracranial Vascularity: State of the Field and Future Directions. *AJNR Am J Neuroradiol* 2019;41(1)
55. Badea A, Johnson GA. Magnetic Resonance Microscopy. *Analytical cellular pathology (Amsterdam)* 2012;35(4):205-227.
56. Cleary JO, Wiseman FK, Norris FC, et al. Structural Correlates of Active-staining Following Magnetic Resonance Microscopy in the Mouse Brain. *NeuroImage (Orlando, Fla.)* 2011;56(3):974-983.

57. Dell'Acqua F, Bodi I, Slater D, Catani M, Modo M. MR Diffusion Histology and Micro-Tractography Reveal Mesoscale Features of the Human Cerebellum. *Cerebellum* 2013;12(6):923-931.
58. Tabibian JH, Macura SI, O'Hara SP, et al. Micro-computed Tomography and Nuclear Magnetic Resonance Imaging for Noninvasive, Live-mouse Cholangiography. *Laboratory investigation* 2013;93(6):733-743.
59. Martí Bonmatí L, Alberich-Bayarri A, García-Martí G, et al. Biomarcadores de Imagen, Imagen Cuantitativa y Bioingeniería. *Radiología* 2010;54(3):269-278.
60. Winter L, Kellman P, Renz W, et al. Comparison of Three Multichannel Transmit/Receive Radiofrequency Coil Configurations for Anatomic and Functional Cardiac MRI at 7.0T: Implications for Clinical Imaging. *Eur Radiol* 2012;22(10):2211-2220.
61. Dieringer MA, Renz W, Lindel T, et al. Design and Application of a Four-channel Transmit/Receive Surface Coil for Functional Cardiac Imaging at 7T. *Journal of magnetic resonance imaging* 2011;33(3):736-741.
62. Gonzalez-Segura A, Morales JM, Gonzalez-Darder JM, et al. Magnetic Resonance Microscopy at 14 Tesla and Correlative Histopathology of Human Brain Tumor Tissue. *PLoS One* 2011;6(11)
63. Hervas A, Ruiz-Sauri A, Gavara J, et al. A Multidisciplinary Assessment of Remote Myocardial Fibrosis After Reperfused Myocardial Infarction in Swine and Patients. *J of Cardiovasc Trans Res* 2016;9(4):321-333.

64. Hervas A, de Dios E, Forteza MJ, et al. Infusion Intracoronaria de Tioflavina-S para el Estudio de la Obstrucción Microvascular en un Modelo de Infarto de Miocardio.
65. Hervas A, Ruiz-Sauri A, Dios E, et al. Inhomogeneity of Collagen Organization within the Fibrotic Scar after Myocardial Infarction: Results in a Swine Model and in Human Samples. *Journal of Anatomy* 2016;228(1):47-58.
66. Bodi V, Monmeneu JV, Ortiz-Perez JT, et al. Prediction of Reverse Remodeling at Cardiac MR Imaging Soon after First ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction: Results of a Large Prospective Registry. *Radiology* 2016;278(1):54-63.
67. Heusch G, Gersh BJ. The Pathophysiology of Acute Myocardial Infarction and Strategies of Protection beyond Reperfusion: a Continual Challenge. *European heart journal* 2017;38(11):774-784.
68. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2015; 1841-1875.
69. Mouton AJ, Rivera OJ, Lindsey ML. Myocardial Infarction Remodeling that Progresses to Heart Failure: a Signaling Misunderstanding. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2018;315(1):H71-H79.
70. Yokota T, McCourt J, Ma F, et al. Type V Collagen in Scar Tissue Regulates the Size of Scar after Heart Injury. *Cell* 2020;182(3):545-562.e23.
71. Hernández A, Cerrada I, Díez JL, Ferrando M, Sepúlveda P. Estudio Comparativo de los Cambios Funcionales y Estructurales Producidos en un

Modelo Porcino de Infarto de Miocardio Agudo y Crónico. Archivos de cardiología de México 2016;86(1):64-74.

72. Winkler SA, Schmitt F, Landes H, et al. Gradient and Shim Technologies for Ultra High Field MRI. NeuroImage (Orlando, Fla.) 2018;168:59-70.

73. Domínguez-Pinilla N, Martínez de Aragón A, Diéguez Tapias S, et al. Evaluación de la Utilidad del Coeficiente de Difusión Aparente en Resonancia Magnética para la Diferenciación del Grado Tumoral de los Tumores Cerebrales Pediátricos. Neurología (Barcelona, Spain) 2014;31(7):459-465.

74. Midiri M, La Grutta L, Grassetonio E, Toia P, Guglielmi G. Non Invasive Imaging of Myocardial Infarction with Computed Tomography and Magnetic Resonance. Current vascular pharmacology 2015;13(1):64-77.

75. Protti A, Lavin B, Dong X, et al. Assessment of Myocardial Remodeling Using an Elastin/Tropoelastin Specific Agent with High Field Magnetic Resonance Imaging (MRI). Journal of the American Heart Association 2015;4(8):e001851.

76. Goergen CJ, Chen HH, Sakadžić S, Srinivasan VJ, Sosnovik DE. Microstructural Characterization of Myocardial Infarction with Optical Coherence Tomography and Two-photon Microscopy. Physiol Rep 2016;4(18)

77. Biesbroek PS, Amier RP, Teunissen PFA, et al. Changes in Remote Myocardial Tissue after Acute Myocardial Infarction and its Relation to Cardiac Remodeling: A CMR T1 Mapping Study. 2017;12(6)

78. Kramer CM, Barkhausen J, Bucciarelli-Ducci C, Flamm SD, Kim RJ, Nagel E. Standardized Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging (CMR) Protocols: 2020 Update. *Journal of cardiovascular magnetic resonance* 2020;22(1):17.
79. Fernández-Jiménez R, Sánchez-González J, Agüero J, et al. Fast T2 Gradient-spin-echo (T2-GraSE) Mapping for Myocardial Edema Quantification: First in vivo Validation in a Porcine Model of Ischemia/Reperfusion. *J Cardiovasc Magn Reson* 2015;17(1)
80. Shetye AM, Nazir SA, Razvi NA, et al. Comparison of Global Myocardial Strain Assessed by Cardiovascular Magnetic Resonance Tagging and Feature Tracking to Infarct Size at Predicting Remodelling Following STEMI. *BMC Cardiovasc Disord* 2017;17(1)
81. von Knobelsdorff-Brenkenhoff F, Prothmann M, Dieringer MA, et al. Current T(1) and T(2) Mapping Techniques Applied with Simple Thresholds Cannot Discriminate Acute from Chronic Myocardial Infarction on an Individual Patient Basis: a Pilot Study. *BMC Medical Imaging* 2016;16:35.
82. Moulin K, Viallon M, Romero W, et al. MRI of Reperfused Acute Myocardial Infarction Edema: ADC Quantification versus T1 and T2 Mapping. *Radiology* 2020;295(3):542-549.
83. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Pattern Recognition Methods and Applications in Biomedical Magnetic Resonance. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy* 2001;39(1):1-40.
84. Fan J, Upadhye S, Worster A. Understanding Receiver Operating Characteristic (ROC) Curves. *Canadian journal of emergency medicine* 2006;8(1):19-20.

85. Pan JA, Michaëlsson E, Shaw PW, et al. Extracellular Volume by Cardiac Magnetic Resonance is Associated with Biomarkers of Inflammation in Hypertensive Heart Disease. *Journal of hypertension* 2019;37(1):65-72.
86. Khan A, Choi Y, Back JH, Lee S, Jee SH, Park YH. High-resolution Metabolomics Study Revealing L-Homocysteine Sulfinic Acid, Cysteic Acid, and Carnitine as Novel Biomarkers for High Acute Myocardial Infarction Risk. *Metabolism, clinical and experimental* 2020;104:154051.
87. Wu R, An D, Hu J, et al. The Apparent Diffusion Coefficient is Strongly Correlated with Extracellular Volume, a Measure of Myocardial Fibrosis, and Subclinical Cardiomyopathy in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Acta radiologica (1987)* 2018;59(3):287-295.
88. Nguyen C, Lu M, Fan Z, et al. Contrast-free Detection of Myocardial Fibrosis in Hypertrophic Cardiomyopathy Patients with Diffusion-weighted Cardiovascular Magnetic Resonance. *J Cardiovasc Magn Reson* 2015;17(1)
89. Laissy J, Gaxotte V, Ironde-Laissy E, et al. Cardiac Diffusion-weighted MR Imaging in Recent, Subacute, and Chronic Myocardial Infarction: A Pilot Study. *Journal of magnetic resonance imaging* 2013;38(6):1377-1387.
90. Kellman P, Xue H, Chow K, et al. Bright-blood and Dark-blood Phase Sensitive Inversion Recovery Late Gadolinium Enhancement and T1 and T2 Maps in a Single Free-Breathing Scan: an All-in-one Approach. *Journal of cardiovascular magnetic resonance* 2021;23(1):126.
91. Yang, Youssef, Yang. Technical Advances in the Evaluation of Myocardial Injury T1 Map of Post-Myocardial Infarction for Precise Tissue Characterization Editorial. 2022

92. Huang Z, Li C, Yang S, et al. Magnetic Resonance Hypointensive Signal Primarily Originates from Extracellular Iron Particles in the Long-term Tracking of Mesenchymal Stem Cells Transplanted in the Infarcted Myocardium. *International journal of nanomedicine* 2015;10:1679-1690.
93. Kobayashi M, Suhara T, Baba Y, Kawasaki NK, Higa JK, Matsui T. Pathological Roles of Iron in Cardiovascular Disease. *CDT* 2018;19(9):1068.
94. Kidambi A, Biglands JD, Higgins DM, et al. Susceptibility-weighted Cardiovascular Magnetic Resonance in Comparison to T2 and T2 Star Imaging for Detection of Intramyocardial Hemorrhage Following Acute Myocardial Infarction at 3 Tesla. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 2014;16(1):86.
95. Yamamoto T, Minamikawa T, Harada Y, et al. Label-free Evaluation of Myocardial Infarct in Surgically Excised Ventricular Myocardium by Raman Spectroscopy. *Sci Rep* 2018;8(1)
96. Di Noto T, von Spiczak J, Mannil M, et al. Radiomics for Distinguishing Myocardial Infarction from Myocarditis at Late Gadolinium Enhancement at MRI: Comparison with Subjective Visual Analysis. *Radiology. Cardiothoracic imaging* 2019;1(5):e180026.
97. Tabassian M, Alessandrini M, Herbots L, et al. Machine Learning of the Spatio-temporal Characteristics of Echocardiographic Deformation Curves for Infarct Classification. *Int J Cardiovasc Imaging* 2017;33(8):1159-1167.
98. Mangion K, Gao H, Husmeier D, Luo X, Berry C. Advances in Computational Modelling for Personalised Medicine after Myocardial Infarction. *Heart* 2017;104(7)

99. Nishiki-Muranishi N, Harada Y, Minamikawa T, et al. Label-Free Evaluation of Myocardial Infarction and Its Repair by Spontaneous Raman Spectroscopy. *Analytical chemistry (Washington)* 2014;86(14):6903-6910.
100. Yang F, Yang X, Teo SK, et al. Multi-dimensional Proprio-proximus Machine Learning for Assessment of Myocardial Infarction. *Computerized medical imaging and graphics* 2018;70:63-72.
101. Stoffers RH, Madden M, Shahid M, et al. Assessment of Myocardial Injury after Reperfused Infarction by T1 ρ Cardiovascular Magnetic Resonance. *J Cardiovasc Magn Reson* 2017;19(1)
102. Witschey WRT, Zsido GA, Koomalsingh K, et al. In vivo Chronic Myocardial Infarction Characterization by Spin Locked Cardiovascular Magnetic Resonance. *Journal of cardiovascular magnetic resonance* 2012;14(1):37.
103. Carrick D, Haig C, Rauhalampi S, et al. Pathophysiology of LV Remodeling in Survivors of STEMI. *JACC. Cardiovascular imaging* 2015;8(7):779-789.
104. Kali A, Cokic I, Tang RLQ, et al. Determination of Location, Size, and Transmurality of Chronic Myocardial Infarction without Exogenous Contrast Media by Using Cardiac Magnetic Resonance Imaging at 3 T. *Circulation. Cardiovascular imaging* 2014;7(3):471-481.
105. Dall'Armellina E, Choudhury RP. The Role of Cardiovascular Magnetic Resonance in Patients With Acute Coronary Syndromes. *Progress in cardiovascular diseases* 2011;54(3):230-239.

9 ANEXOS

ANEXO 1



AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2016/VSC/PEA/00074

Vista la solicitud realizada en fecha 14/03/16 con nº reg. entrada 10320 por DID^a Pilar Campins Falcó, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario ES462500031003, para realizar el procedimiento:

"Un proyecto multidisciplinar para avanzar en los mecanismos básicos diagnóstico predicción y prevención del daño cardiaco en el infarto agudo de miocardio reperfundido"

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Ganadería y Sanidad y Bienestar Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: 2016/VSC/PEA/00074 tipo 2, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: Universitat de Valencia

Responsable del proyecto: Arantxa Heivas Lorente

Establecimiento: Animalario Facultad de Medicina-Campus Blasco Ibáñez

Necesidad de evaluación retrospectiva:

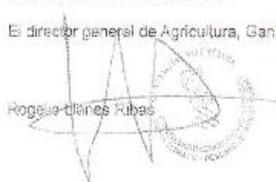
Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 15 de abril de 2016

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Rogelio Clares Rubes



ANEXO 2

SECUENCIAS DE MRI Y DE CORTES HISTOPATOLÓGICOS

1	CONTROLES.....	1
1.1	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 1 CONTROL	1
1.2	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 2 CONTROL.....	4
1.3	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 3 CONTROL;Error! Marcador no definido.	
1.4	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 4 CONTROL	9
2	AGUDOS	;Error! Marcador no definido.
2.1	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 1 AGUDO	12
2.1.1	REMOTO	12
2.1.2	INFARTADO	15
2.2	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 2 AGUDO	21
2.2.1	REMOTO	21
2.2.2	ADYACENTE.....	26
2.2.3	INFARTADO	30
2.3	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 3 AGUDO	34
2.3.1	REMOTO	34
2.3.2	ADYACENTE.....	36
2.3.3	INFARTADO	40
2.4	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 4 AGUDO.....	44
2.4.1	REMOTO	44
2.4.2	ADYACENTE.....	47
2.5	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 5 AGUDO	49
2.5.1	ADYACENTE.....	49
2.5.2	INFARTADO	52
2.6	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 6 AGUDO.....	54

2.6.1	ADYACENTE	54
2.6.2	INFARTADO	56
3	CRÓNICOS.....	58
3.1	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 1 CRÓNICO.....	58
3.1.1	REMOTO	58
3.1.2	ADYACENTE	61
3.2	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 2 CRÓNICO	64
3.2.1	REMOTO	64
3.2.2	ADYACENTE	67
3.2.3	INFARTADO	69
3.3	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 3 CRÓNICO	72
3.3.1	REMOTO	72
3.3.2	ADYACENTE	75
3.3.3	INFARTADO	78
3.4	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 4 CRÓNICO.....	81
3.4.1	REMOTO	81
3.4.2	ADYACENTE	86
3.4.3	INFARTADO	91
3.5	CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 5 CRÓNICO	96
3.5.1	REMOTO	96
3.5.2	ADYACENTE	101
3.5.3	INFARTADO	106

1. CONTROLES

1.1. CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 1 CONTROL

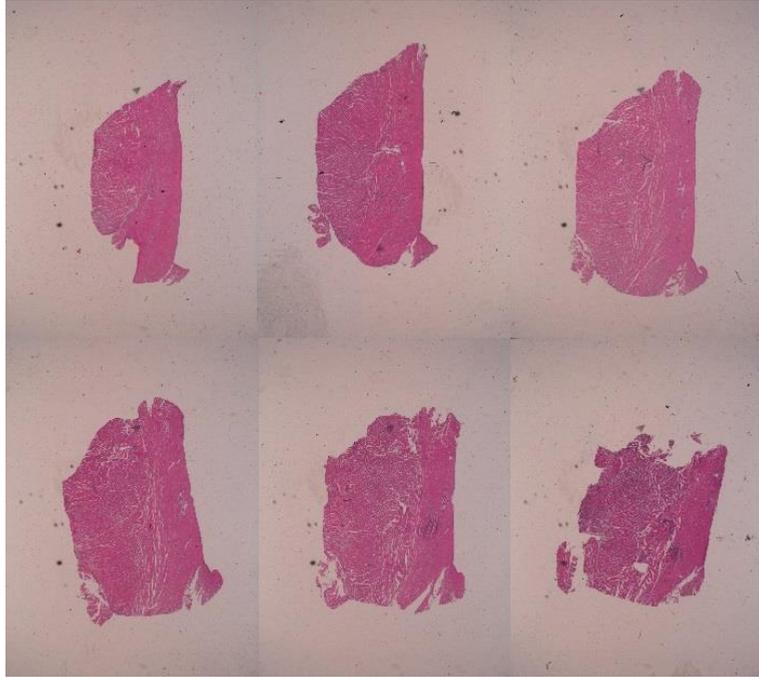


Figura A1. Cortes histopatológicos HE cerdo 1 control.

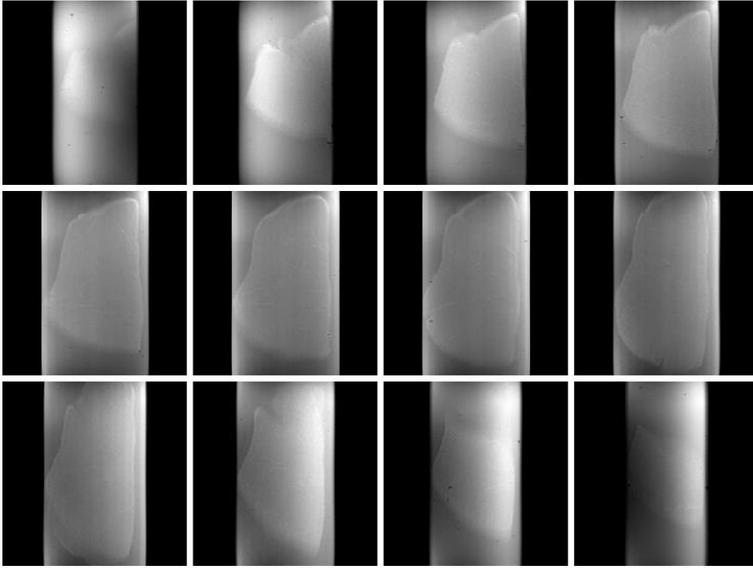


Figura A2. Imágenes ponderadas T1 cerdo 1 control.

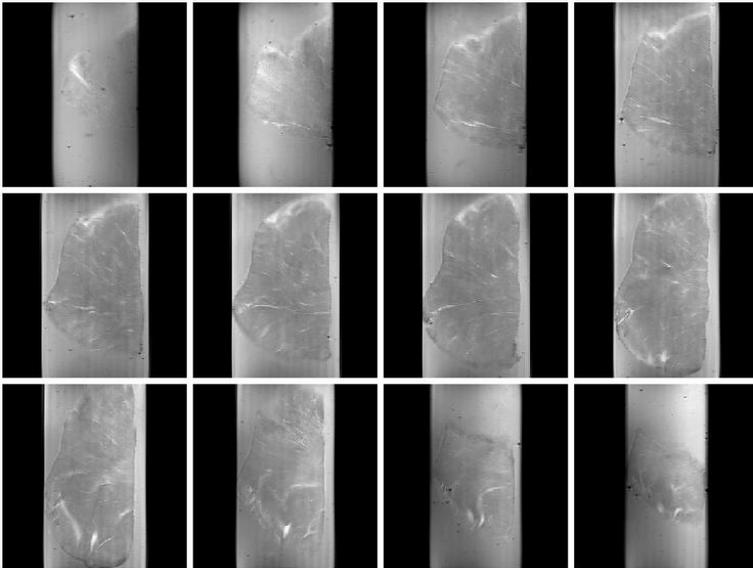


Figura A3. Imágenes ponderadas T2 cerdo 1 control.

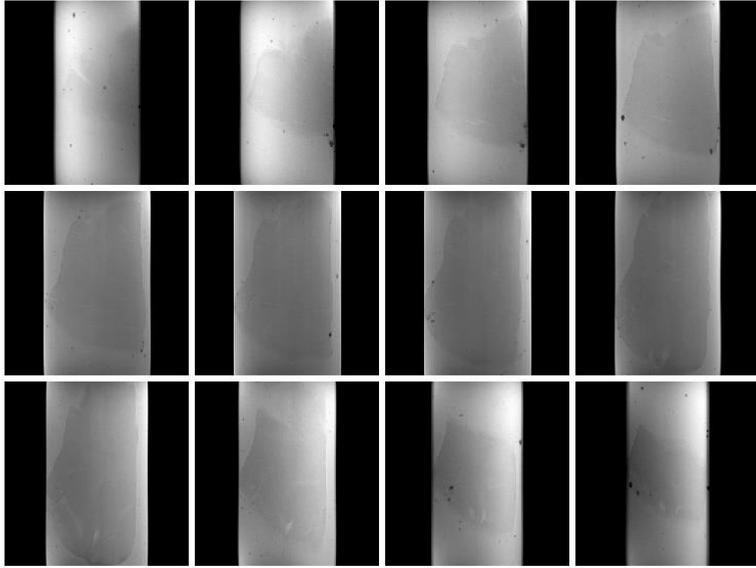


Figura A4. Imágenes ponderadas T2* cerdo 1 control.

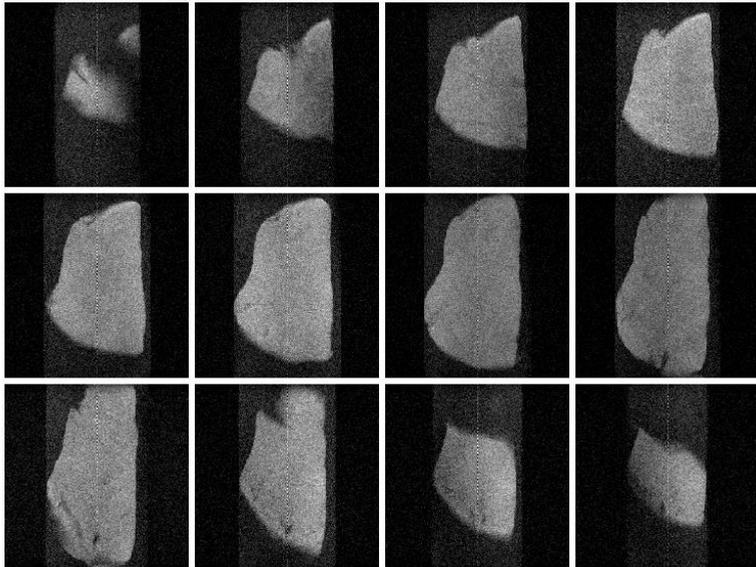


Figura A5. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 1 control.

1.2. CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 2 CONTROL



Figura A6. Cortes histopatológicos HE cerdo 2 control.

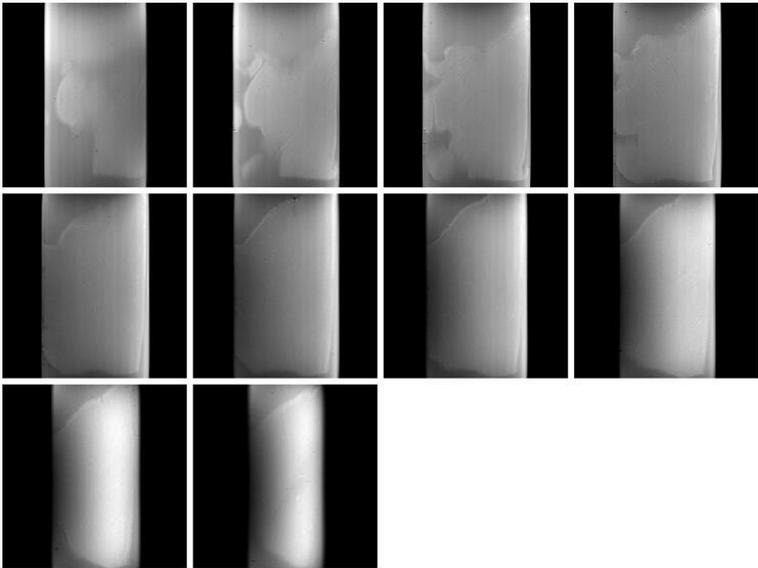


Figura A7. Imágenes ponderadas T1 cerdo 2 control.

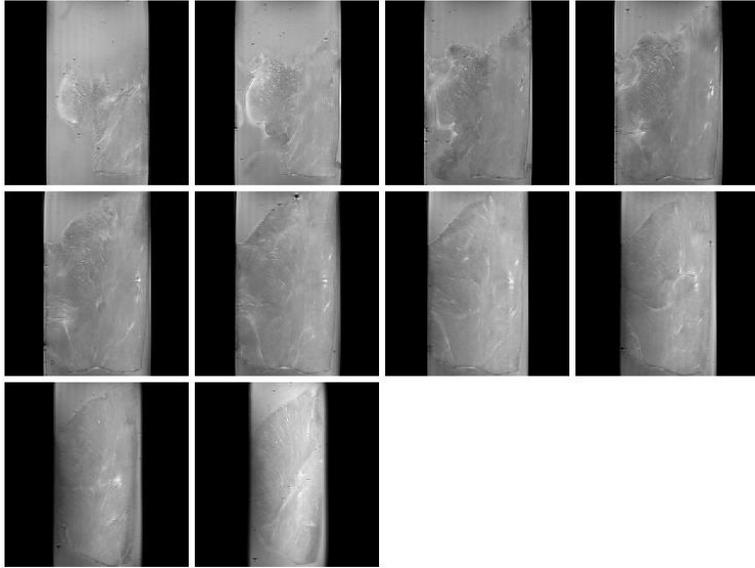


Figura A8. Imágenes ponderadas T2 cerdo 2 control.

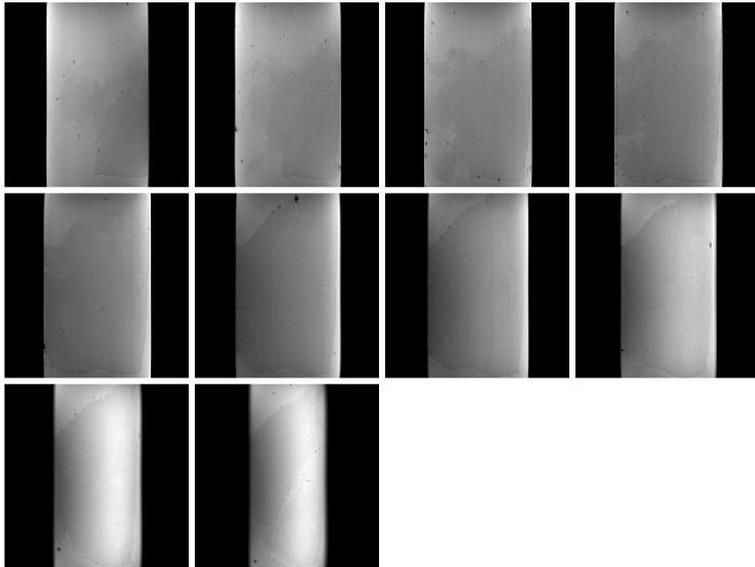


Figura Ag. Imágenes ponderadas T2* cerdo 2 control.

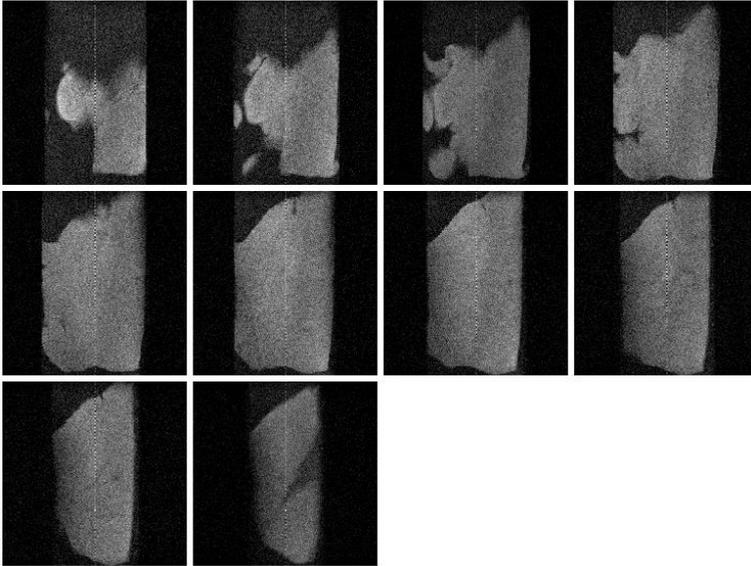


Figura A10. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 2 control.

1.3. CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 3 CONTROL



Figura A11. Cortes histopatológicos HE cerdo 3 control.

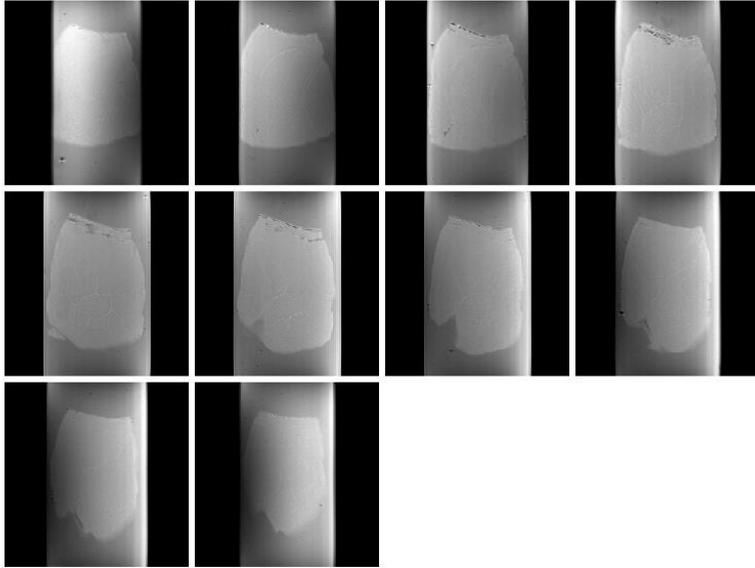


Figura A12. Imágenes ponderadas T1 cerdo 3 control.

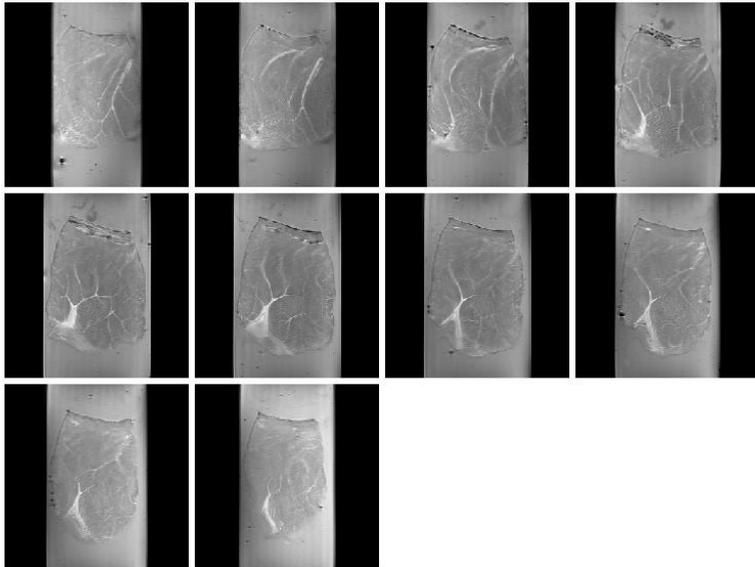


Figura A13. Imágenes ponderadas T2 cerdo 3 control.

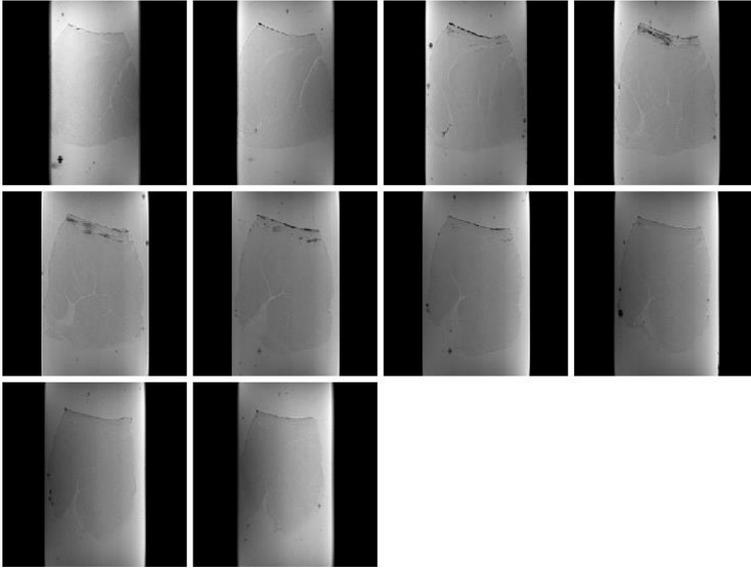


Figura A14. Imágenes ponderadas T2* cerdo 3 control.

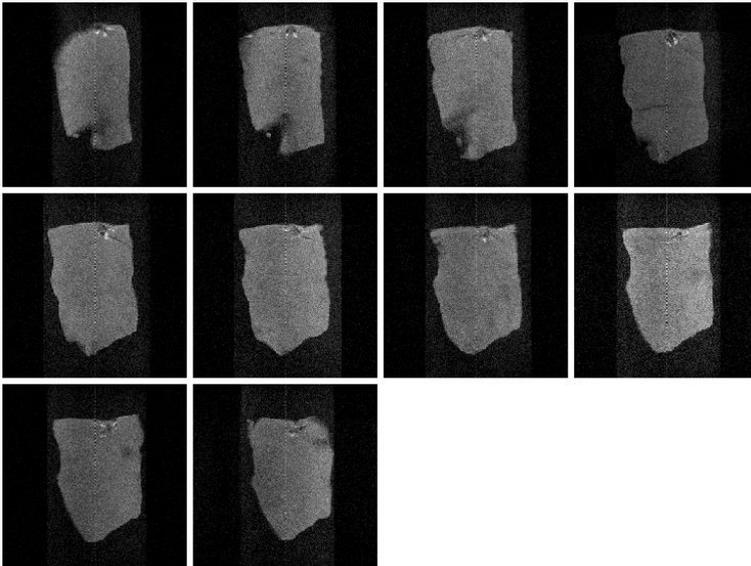


Figura A15. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 3 control.

1.4. CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 4 CONTROL

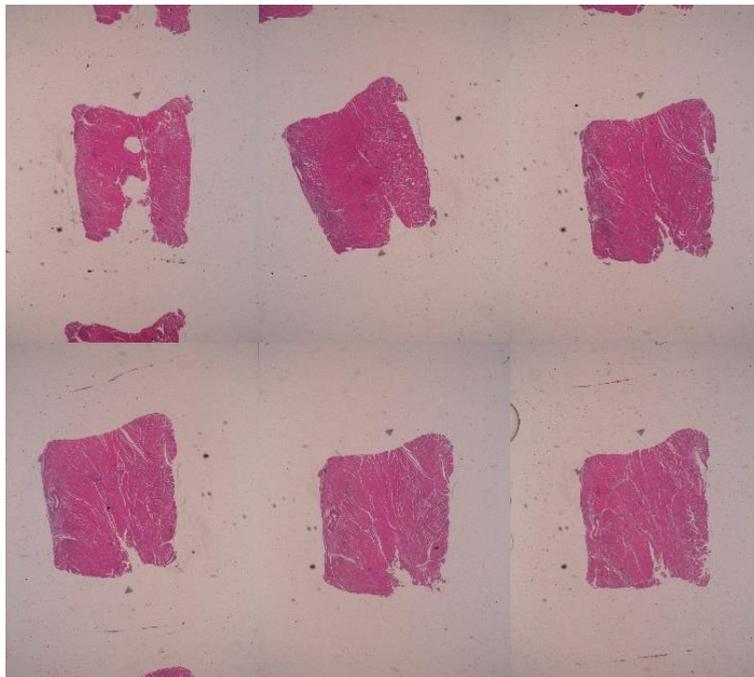


Figura A16. Cortes histopatológicos HE cerdo 4 control.

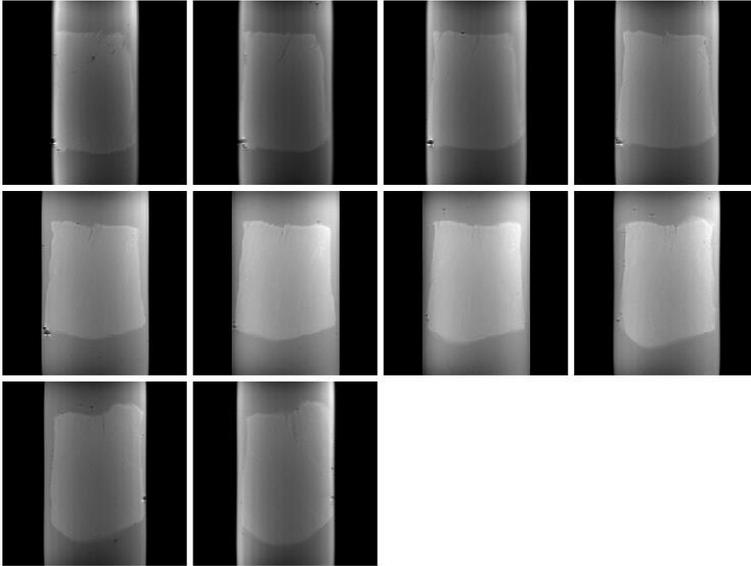


Figura A17. Imágenes ponderadas T1 cerdo 4 control.

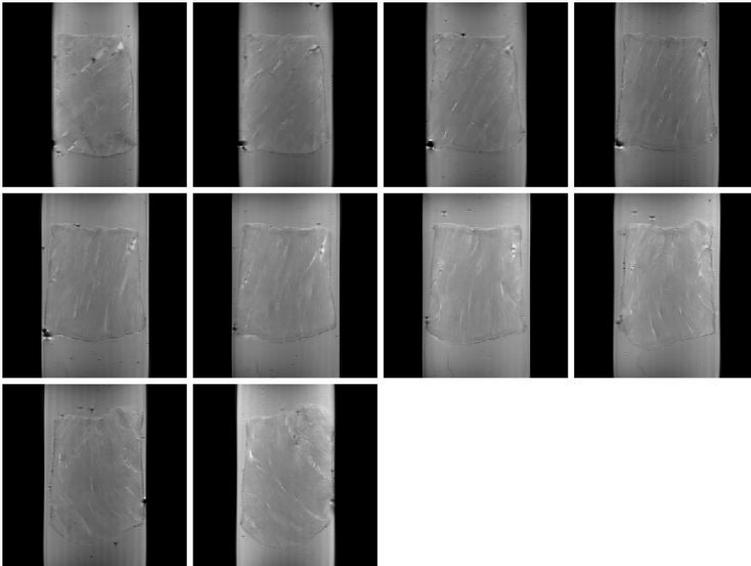


Figura A18. Imágenes ponderadas T2 cerdo 4 control.

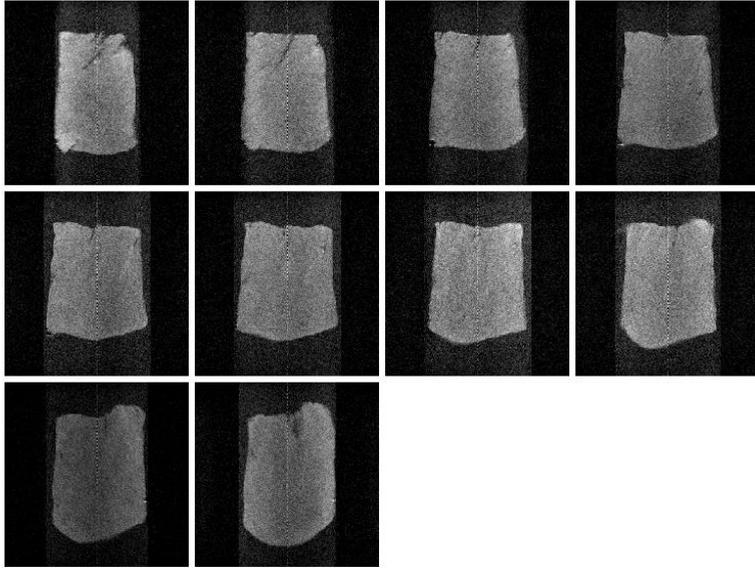


Figura A19. Imágenes ponderadas T2* cerdo 4 control.

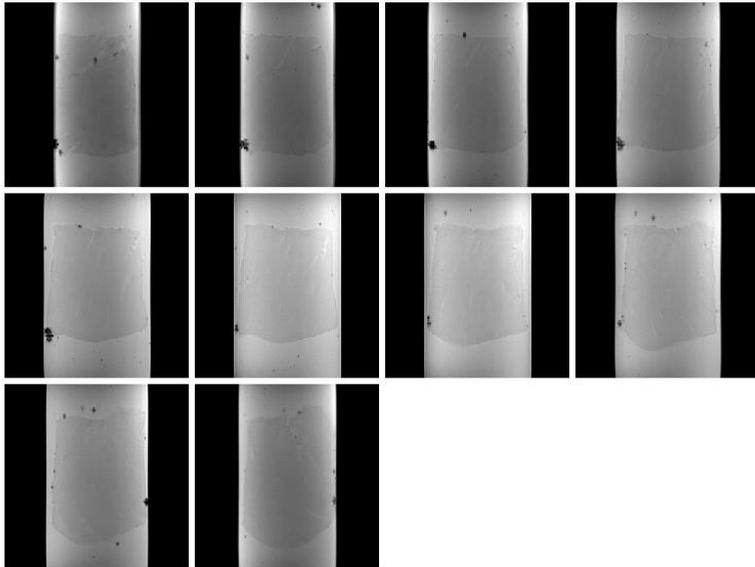


Figura A20. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 4 control.

2. AGUDOS

2.1. CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 1 AGUDO

2.1.1. REMOTO

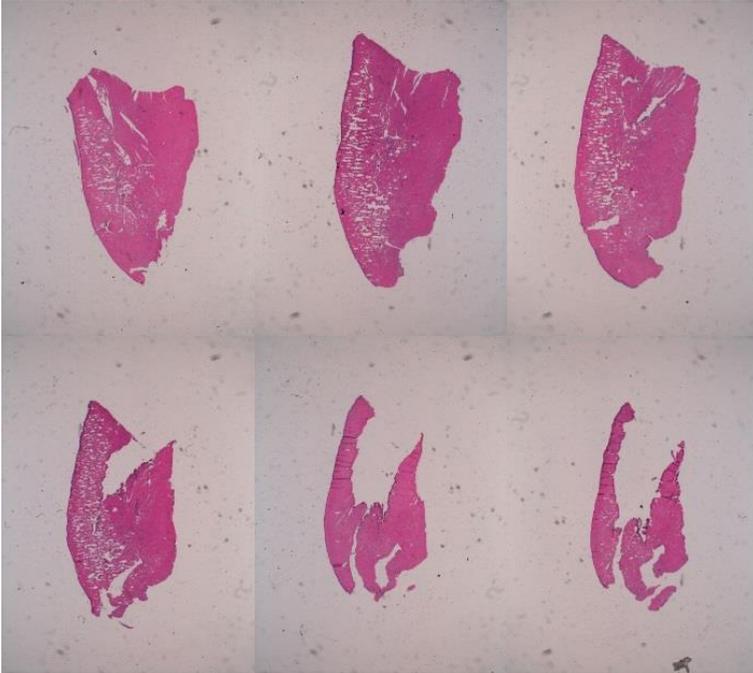


Figura A21. Cortes histopatológicos HE cerdo 1 agudo remoto 1.

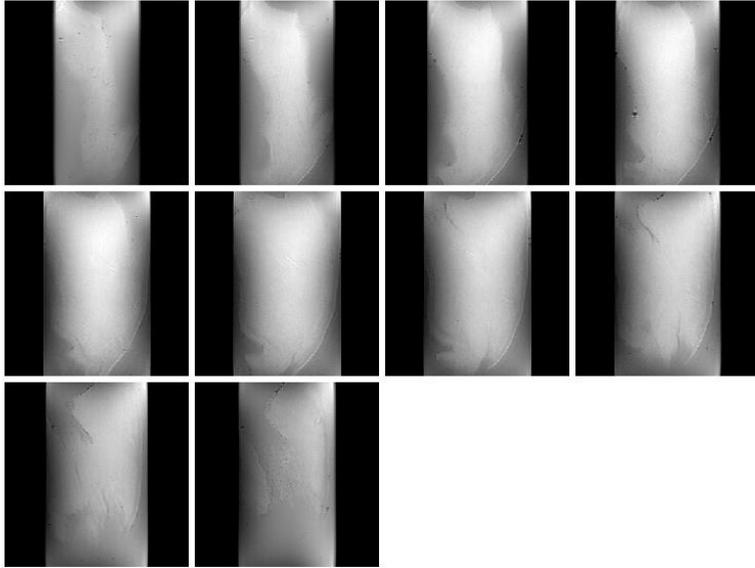


Figura A22. Imágenes ponderadas T1 cerdo 1 agudo remoto 1.

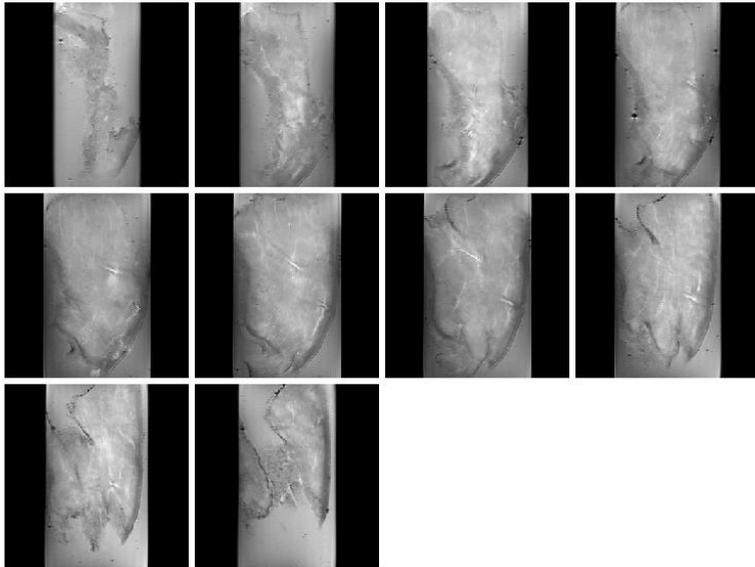


Figura A23. Imágenes ponderadas T2 cerdo 1 agudo remoto 1.

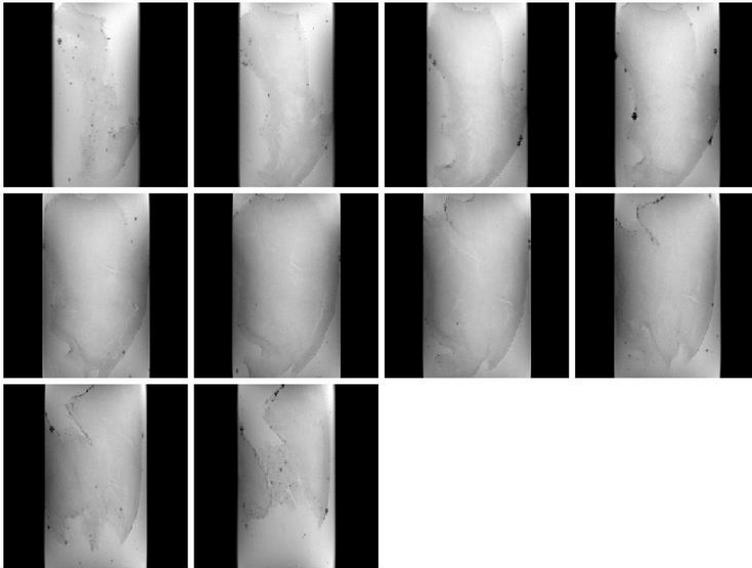


Figura A24. Imágenes ponderadas T2* cerdo 1 agudo remoto 1.

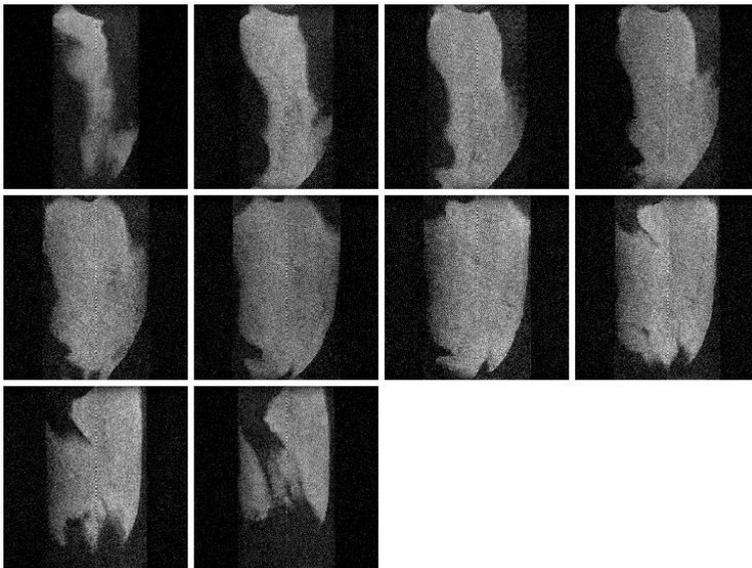


Figura A25. Imágenes difusión cerdo 1 agudo remoto 1.

2.1.2. INFARTADO

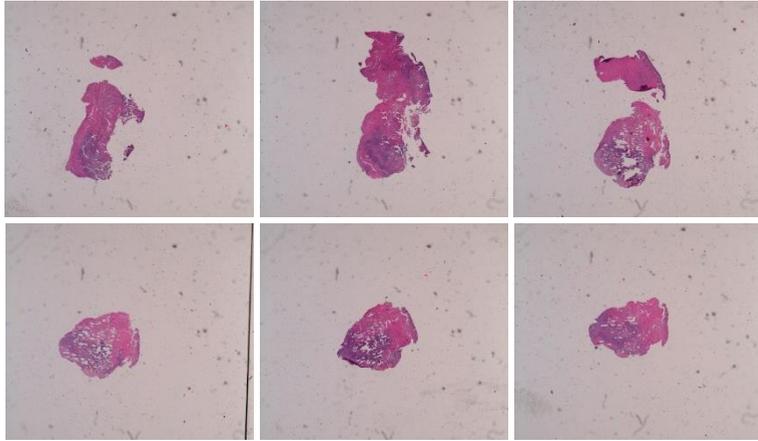


Figura A26. Cortes histopatológicos HE cerdo 1 agudo infartado 1.

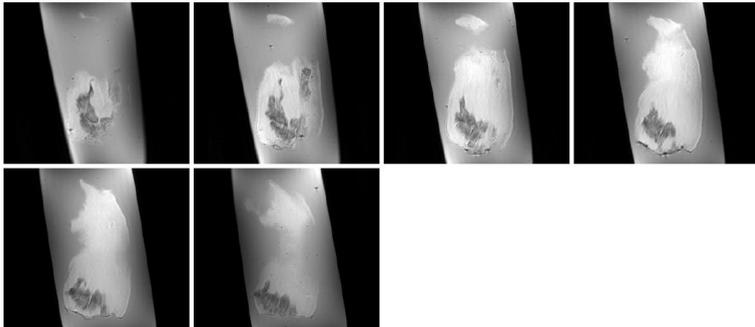


Figura A27. Imágenes ponderadas T1 cerdo 1 agudo infartado 1.

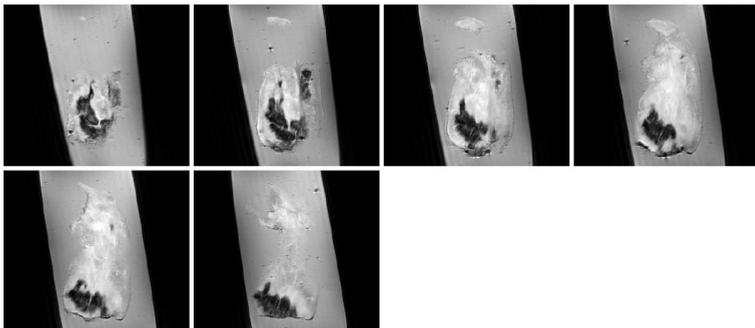


Figura AR 28. Imágenes ponderadas T2 cerdo 1 agudo infartado 1.

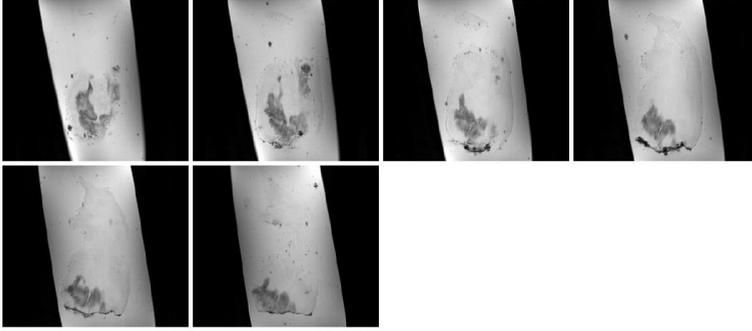


Figura AR 29. Imágenes ponderadas T2* cerdo 1 agudo infartado 1.

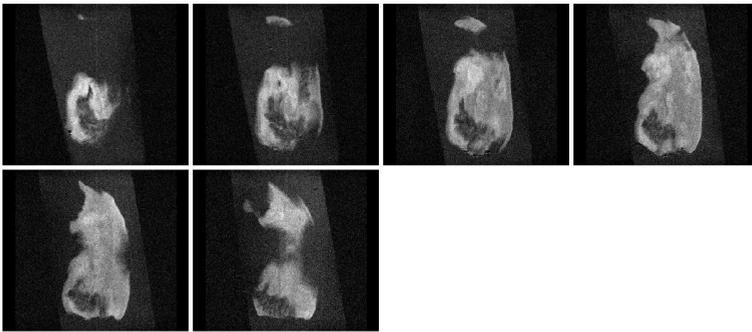


Figura AR 30. Imágenes difusión cerdo 1 agudo infartado 1.

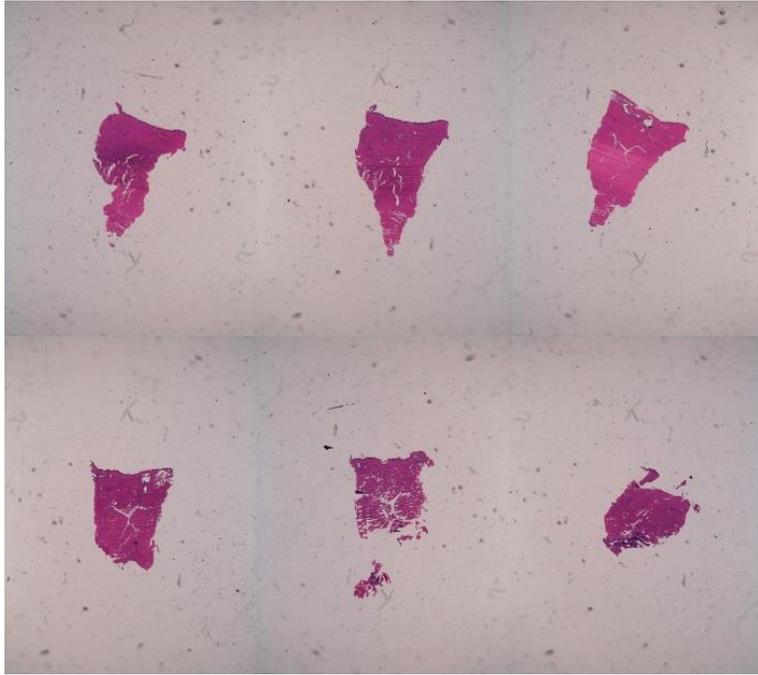


Figura AR 31. Cortes histopatológicos HE cerdo 1 agudo infartado 2.

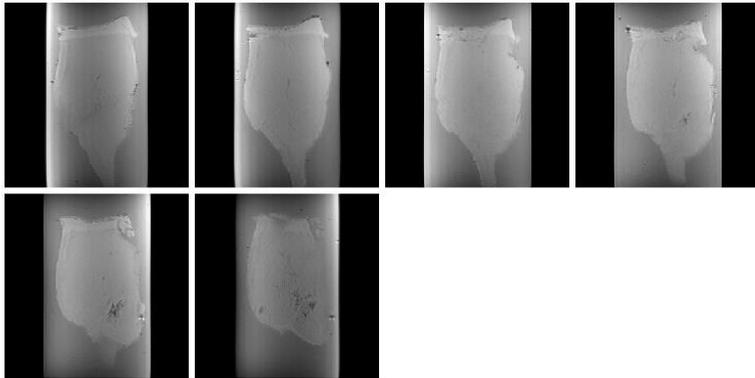


Figura AR 32. Imágenes ponderadas T1 cerdo 1 agudo infartado 2.

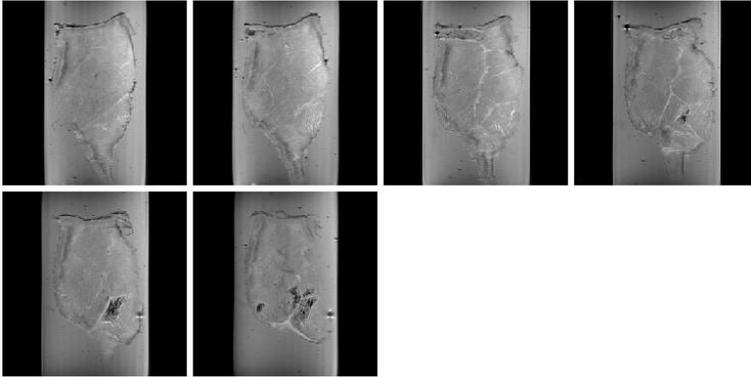


Figura AR 33. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 1 agudo infartado 2.

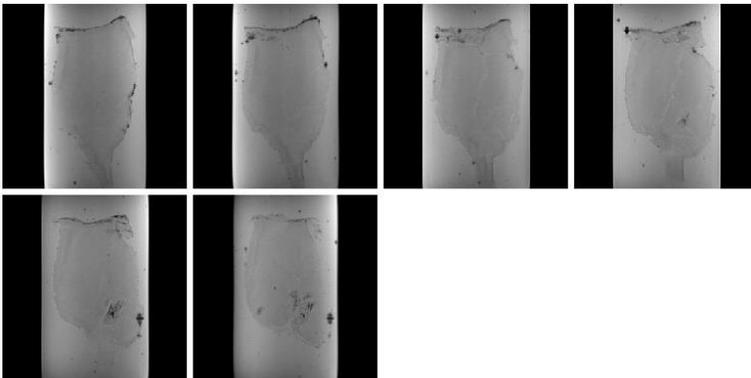


Figura AR 34. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 1 agudo infartado 2.

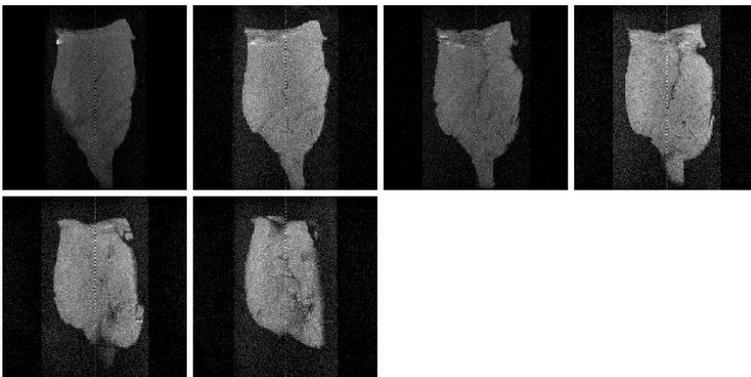


Figura AR 35. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 1 agudo infartado 2.

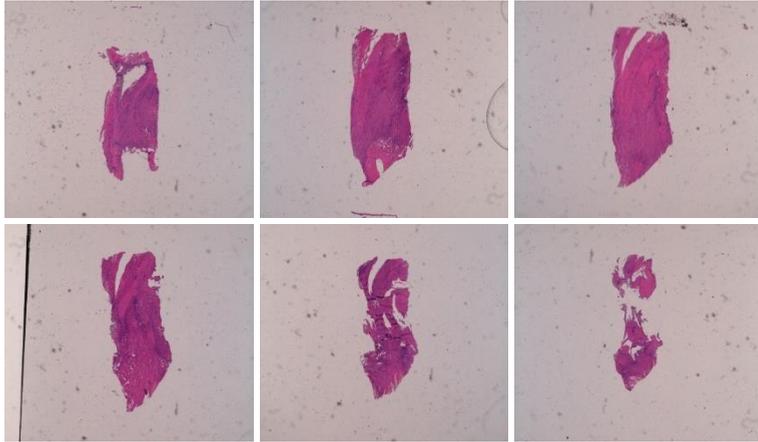


Figura AR 36. Cortes histopatológicos HE cerdo agudo infartado 3.

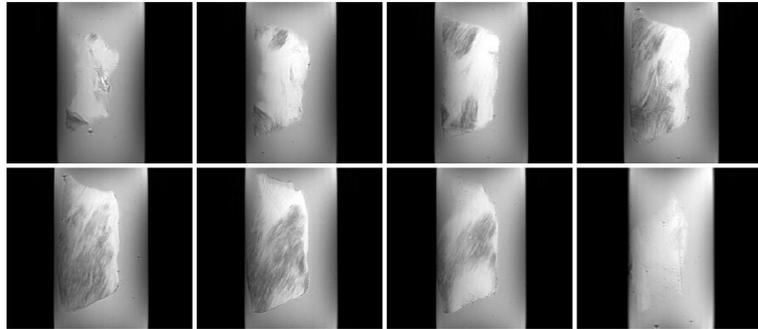


Figura AR 37. Imágenes ponderadas T1 cerdo agudo infartado 3.

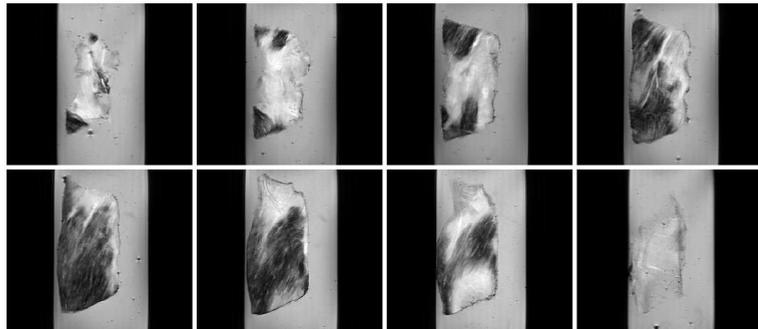


Figura AR 38. Imágenes ponderadas de T2 cerdo agudo infartado 3.

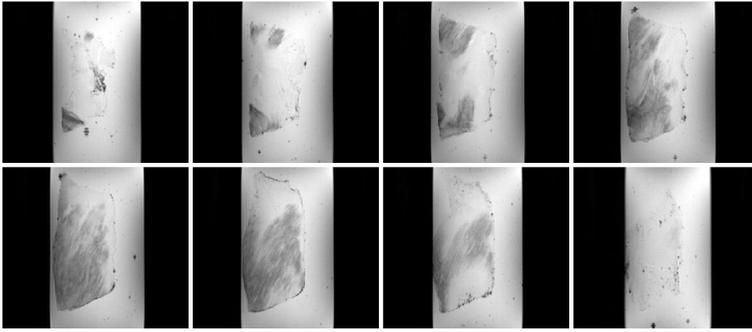


Figura AR 39. Imágenes ponderadas de T2* cerdo agudo infartado 3.

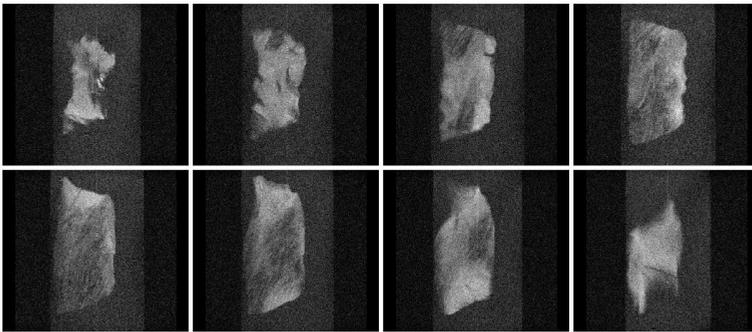


Figura AR 40. Imágenes ponderadas de difusión cerdo agudo infartado 3.

2.2. CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 2 AGUDO

2.2.1. REMOTO

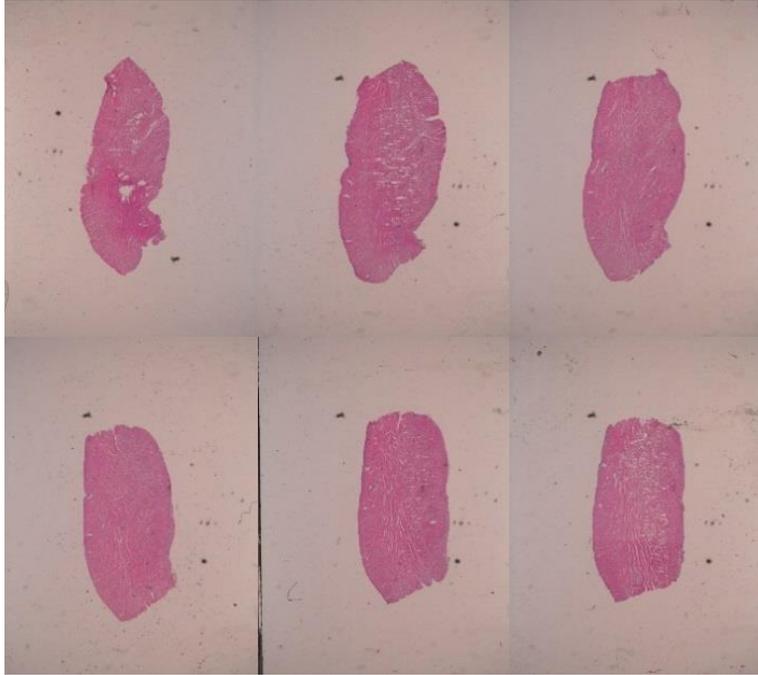


Figura AR 41. Cortes histopatológicos HE cerdo 2 agudo remoto 1.

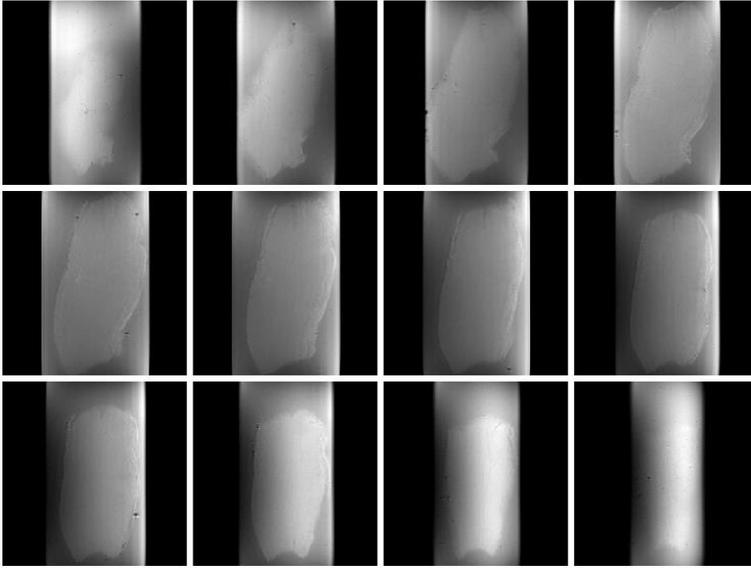


Figura AR 42. Imágenes ponderadas T1 cerdo 2 agudo remoto 1.

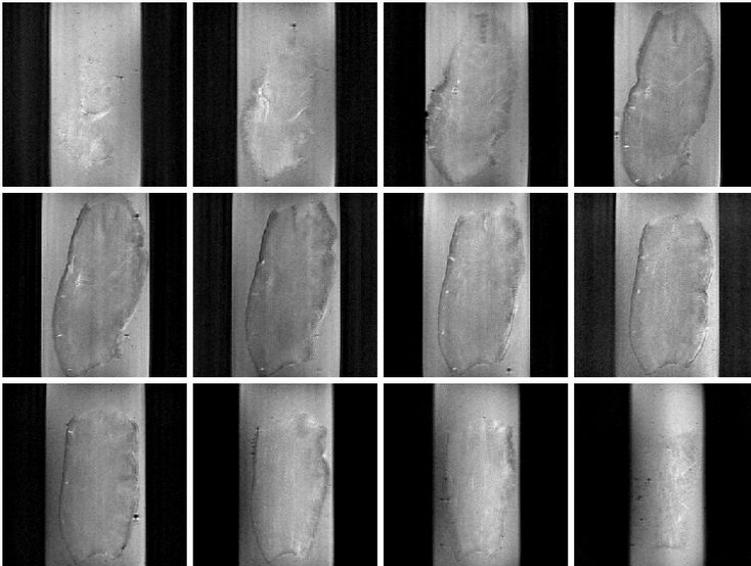


Figura AR 43. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 2 agudo remoto 1.

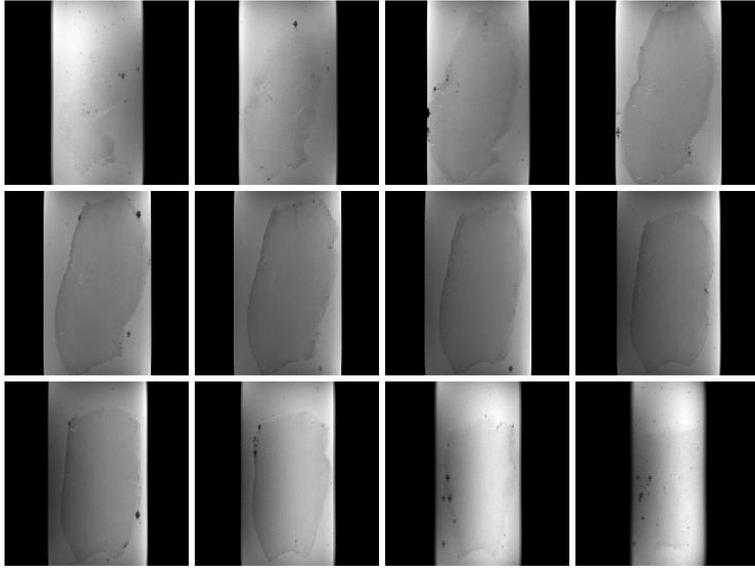


Figura AR 44.. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 2 agudo remoto 1.

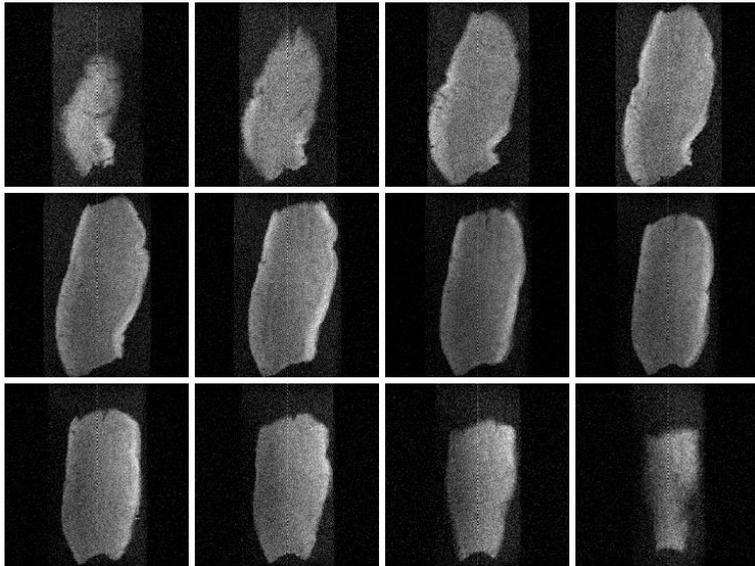


Figura AR 45. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 2 agudo remoto 1.

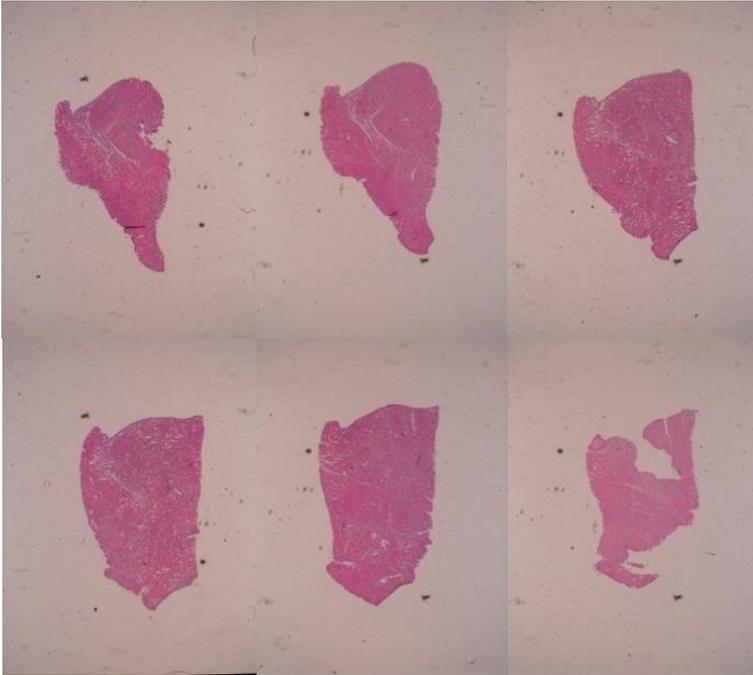


Figura AR 46. Cortes histopatológicos HE cerdo 2 agudo remoto 2.

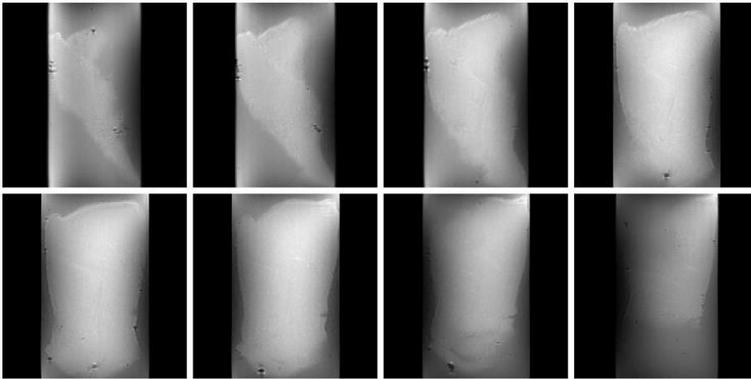


Figura AR 47. Imágenes ponderadas T1 cerdo 2 agudo remoto 2.

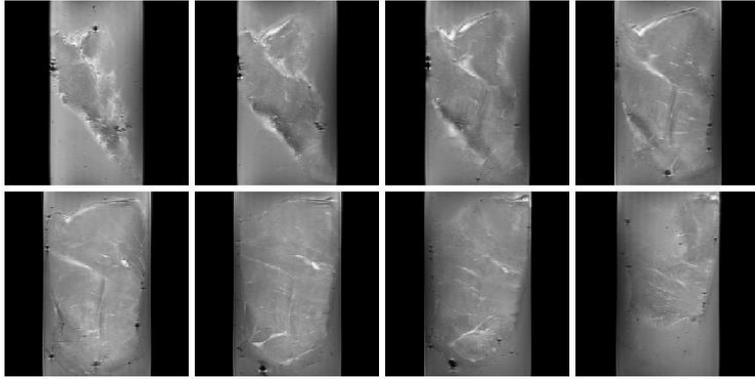


Figura AR 48. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 2 agudo remoto 2.

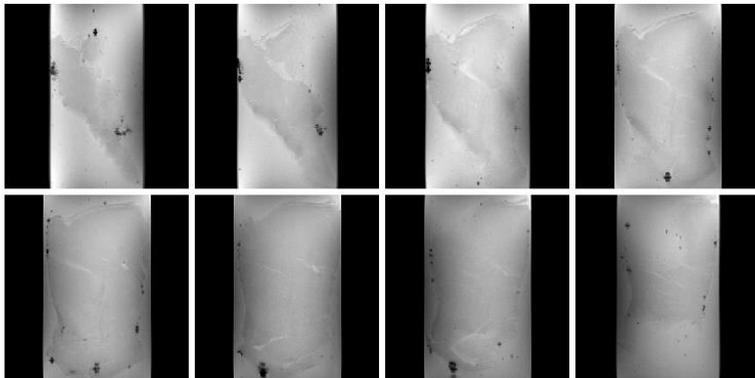


Figura AR 49. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 2 agudo remoto 2.

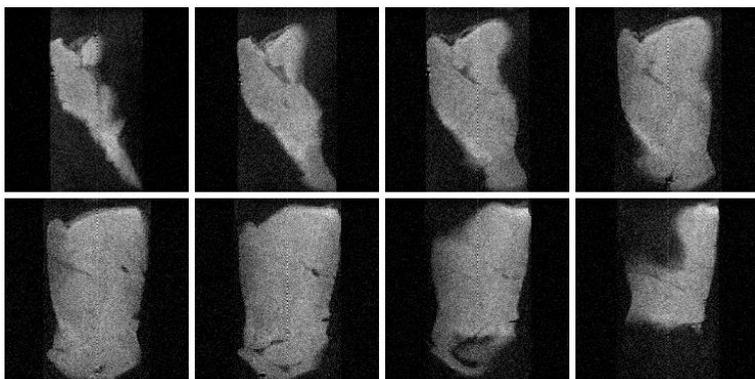


Figura AR 50. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 2 agudo remoto 2.

2.2.2. ADYACENTE

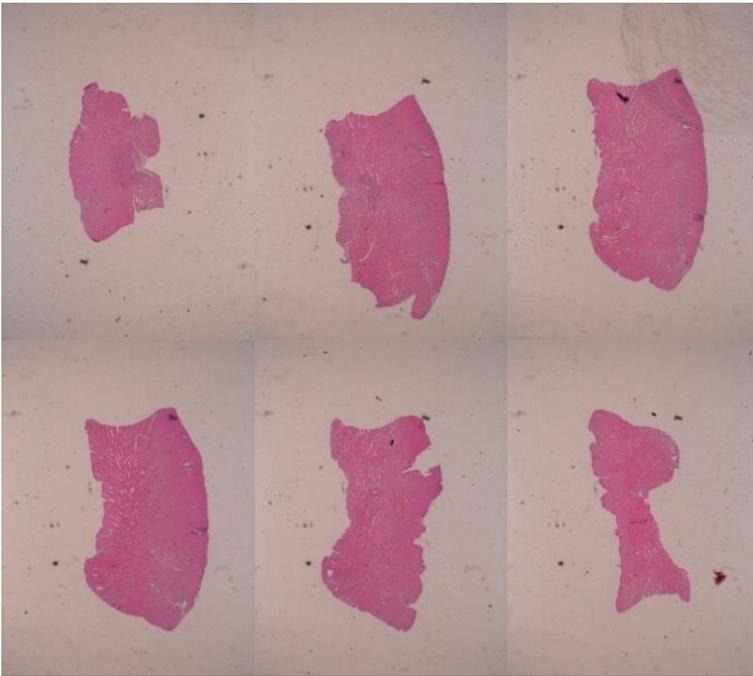


Figura AR 51. Cortes histopatológicos HE cerdo 2 agudo adyacente 1.

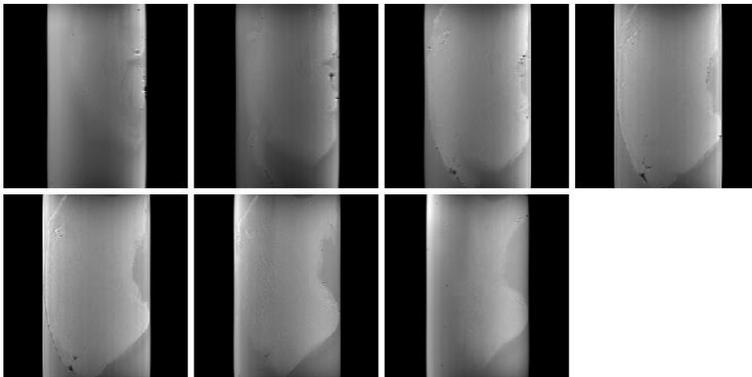


Figura AR 52. Imágenes ponderadas T1 cerdo 2 agudo adyacente 1.

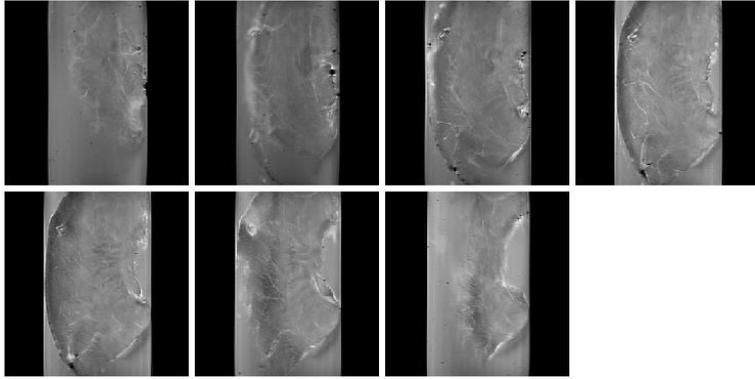


Figura AR 53. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 2 agudo adyacente 1.

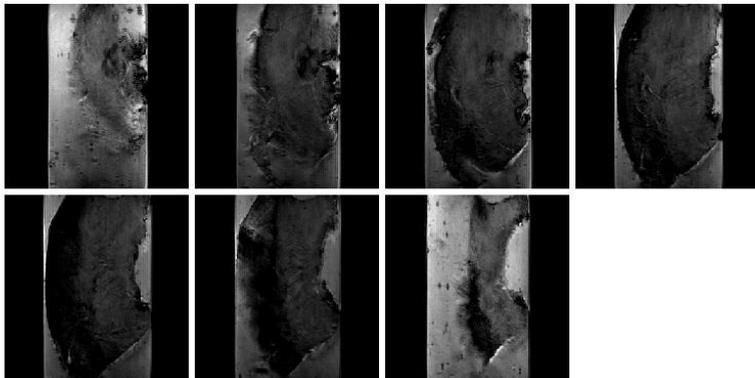


Figura AR 54. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 2 agudo adyacente 1.

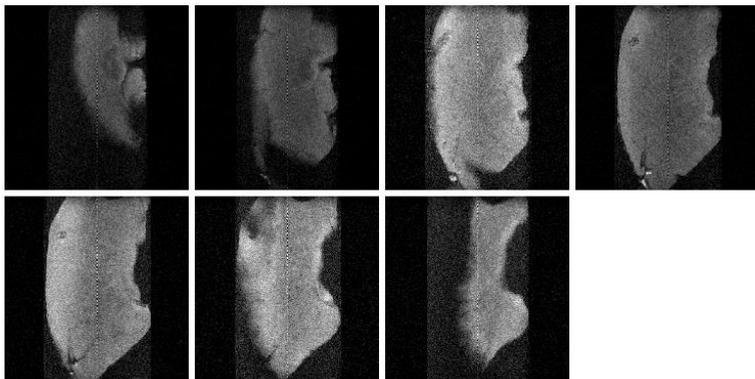


Figura AR 55. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 2 agudo adyacente 1.

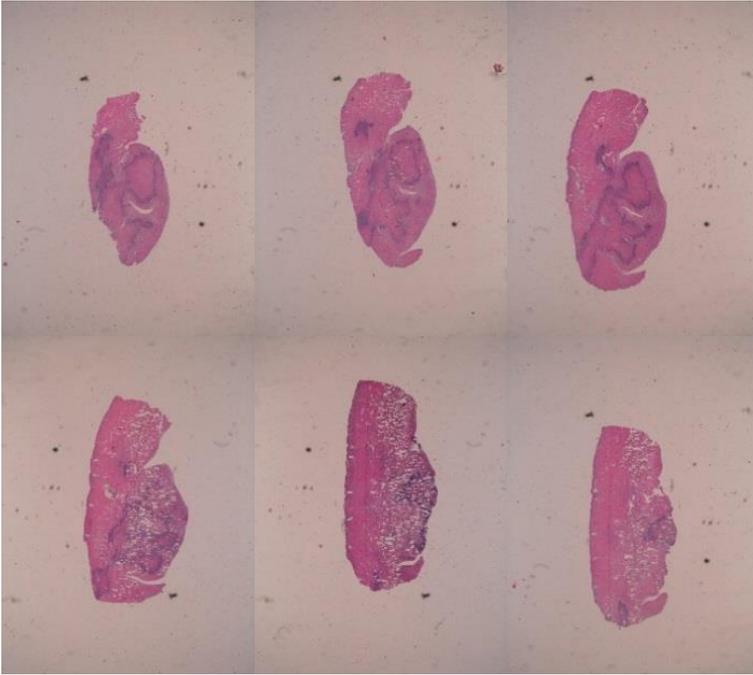


Figura AR 56. Cortes histopatológicos HE cerdo 2 agudo adyacente 2.

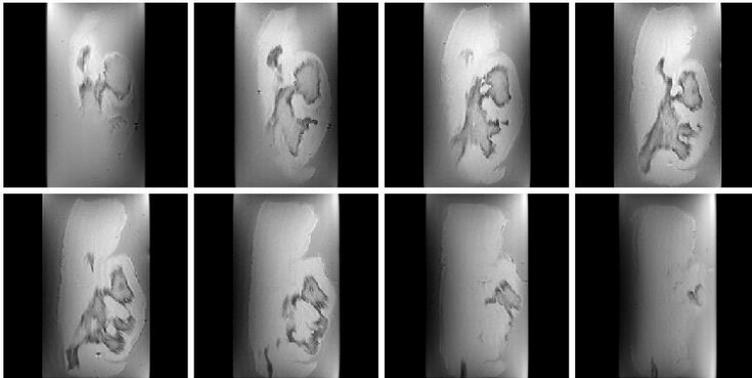


Figura AR 57. Imágenes ponderadas T1 cerdo 2 agudo adyacente 2.

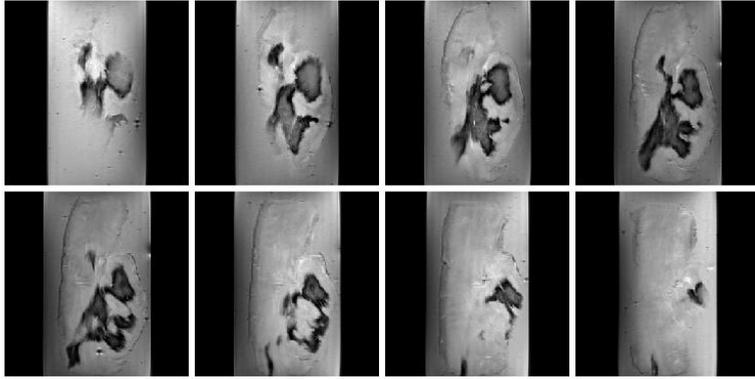


Figura AR 58. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 2 agudo adyacente 2.

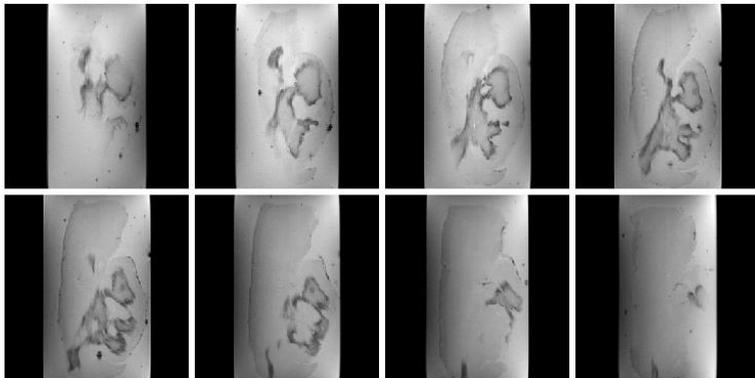


Figura AR 59. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 2 agudo adyacente 2.

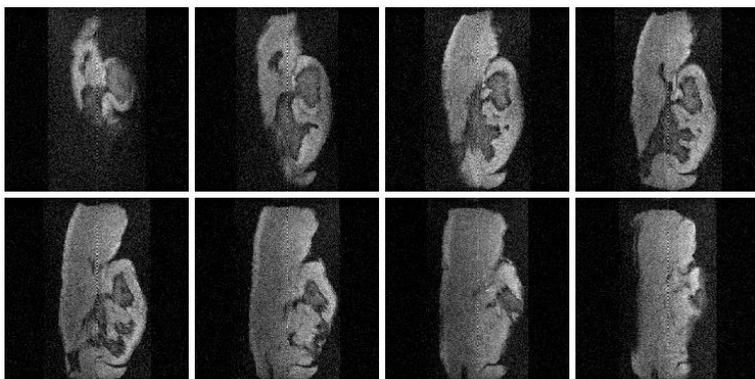


Figura AR 60. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 2 agudo adyacente 2.

2.2.3. INFARTADO

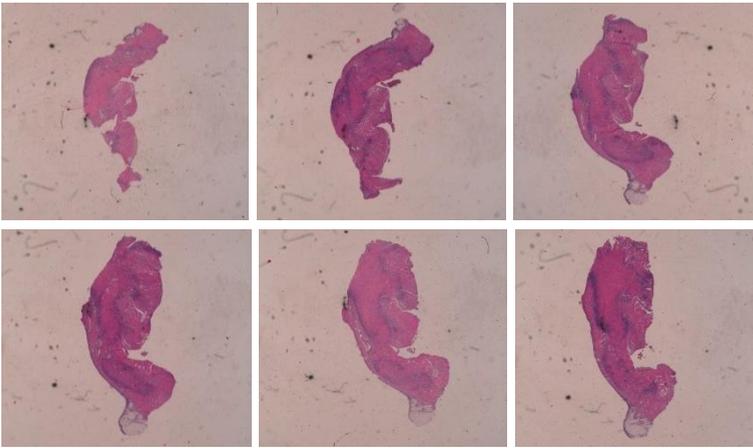


Figura AR 61. Cortes histopatológicos HE cerdo 2 agudo infartado 1.

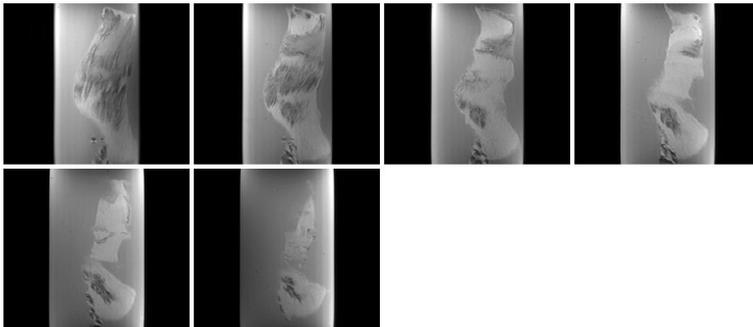


Figura AR 62. Imágenes ponderadas T1 cerdo 2 agudo infartado 1.

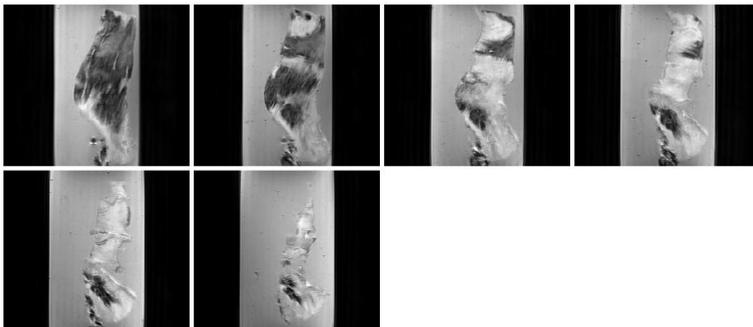


Figura AR 63. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 2 agudo infartado 1.

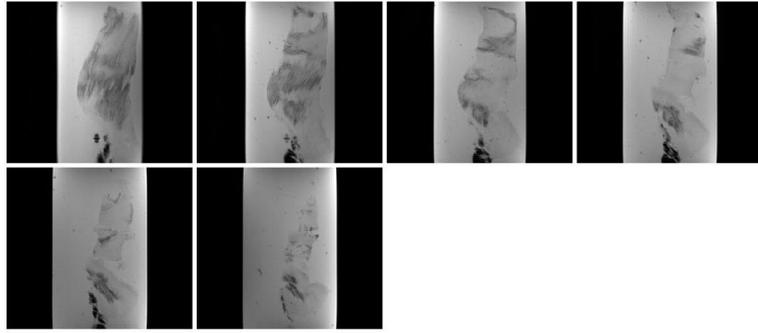


Figura AR 64. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 2 agudo infartado 1.

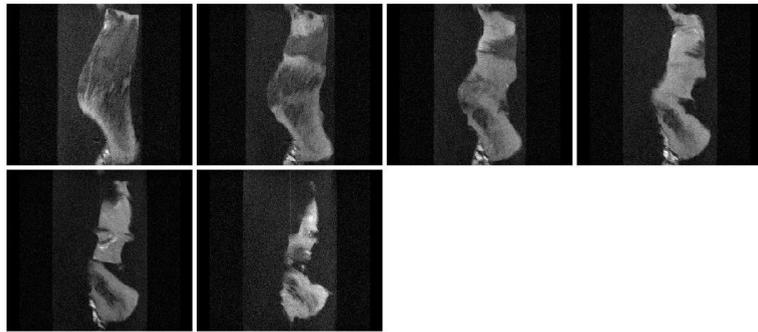


Figura AR 65. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 2 agudo infartado 1.

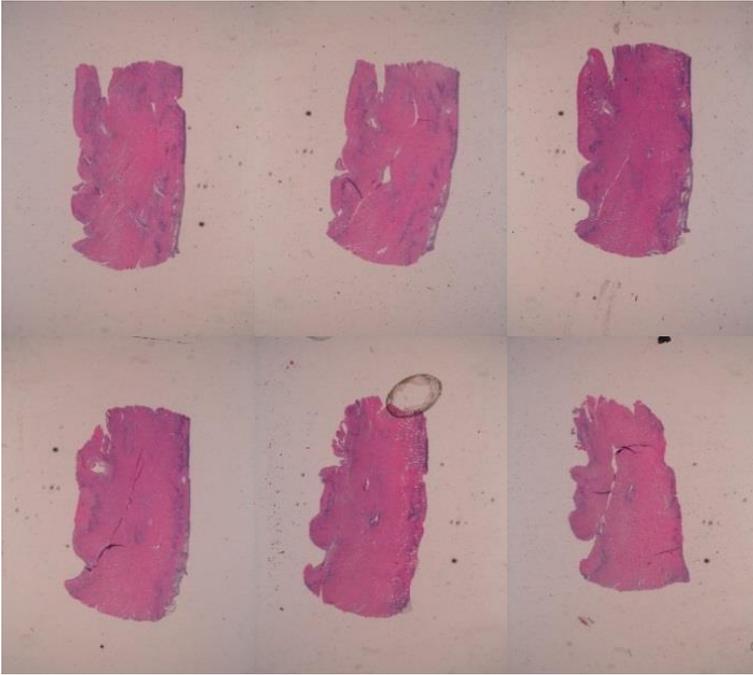


Figura AR 66. Cortes histopatológicos HE cerdo 2 agudo infartado 2.

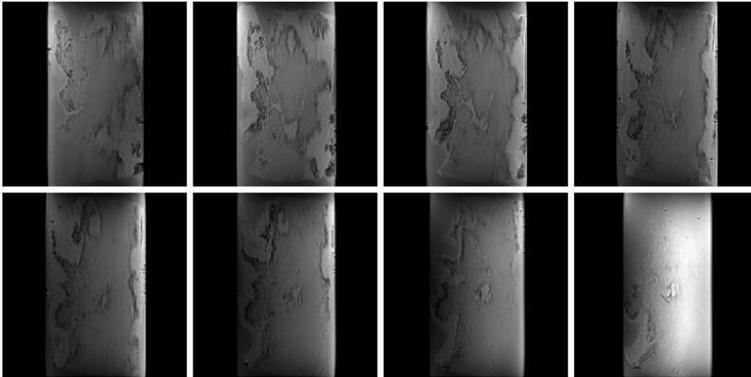


Figura AR 67. Imágenes ponderadas T1 cerdo 2 agudo infartado 2.

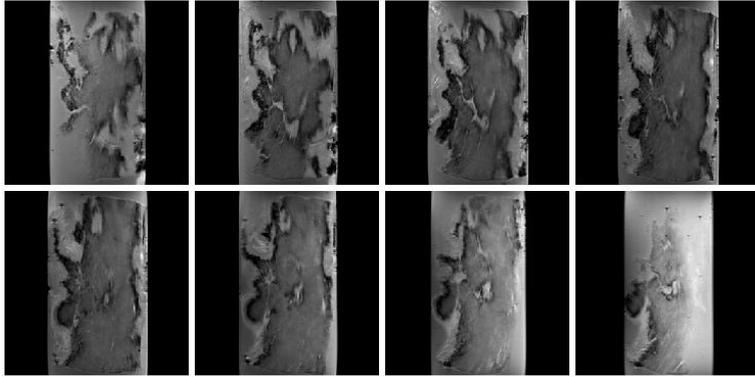


Figura AR 68. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 2 agudo infartado 2.

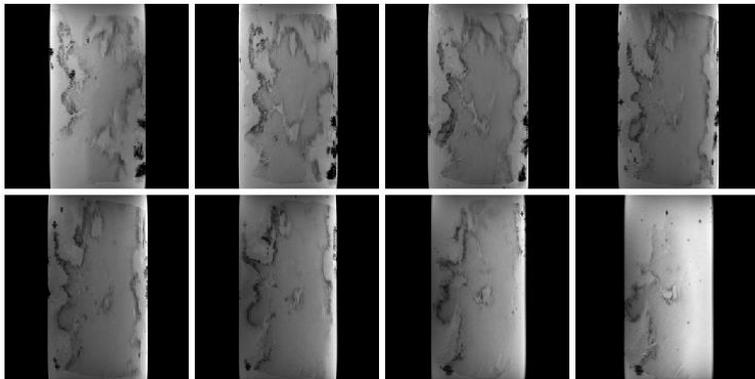


Figura AR 69. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 2 agudo infartado 2.

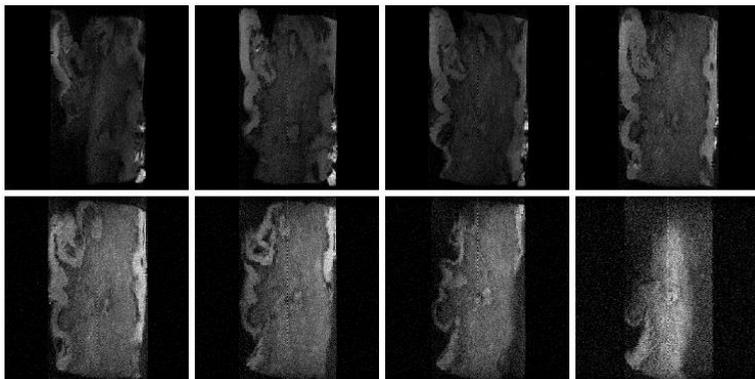


Figura AR 70. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 2 agudo infartado 2.

2.3. CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 3 AGUDO

2.3.1. REMOTO

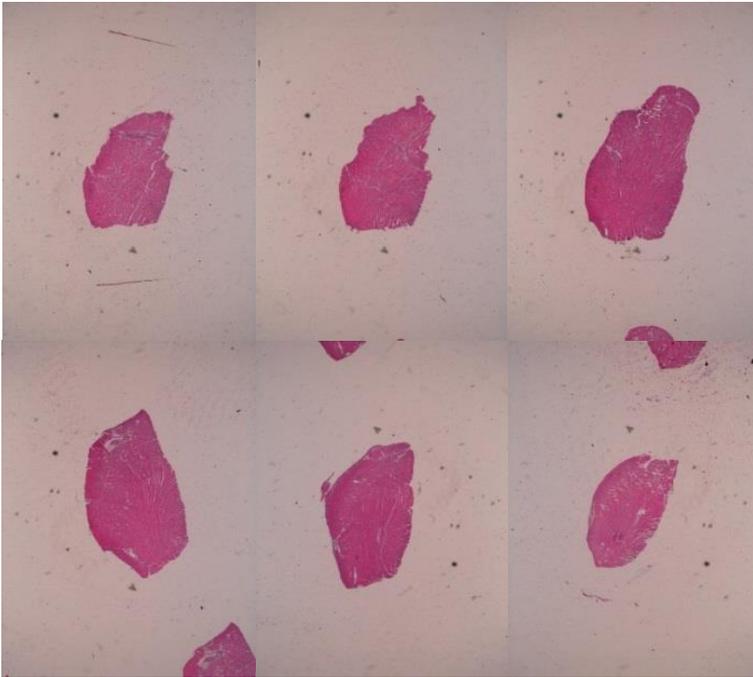


Figura AR 71. Cortes histopatológicos HE cerdo 3 agudo remoto 1.

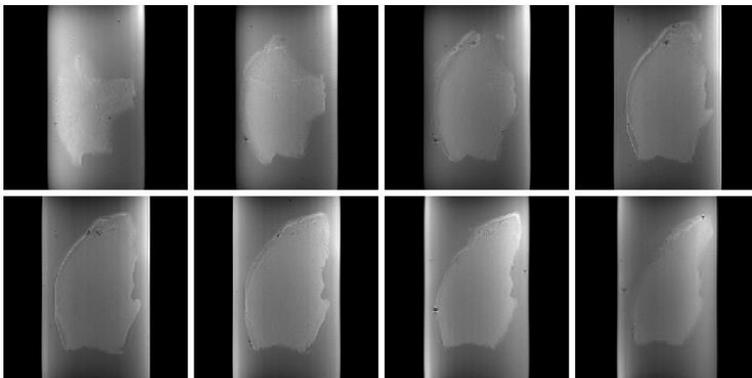


Figura AR 72. Imágenes ponderadas T1 cerdo 3 agudo remoto 1.

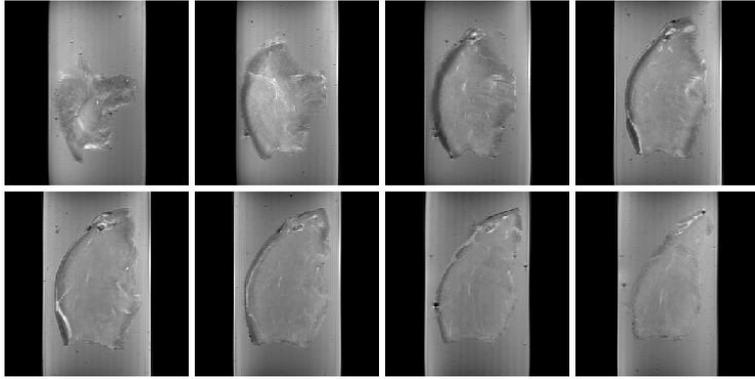


Figura AR 73. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 3 agudo remoto 1.

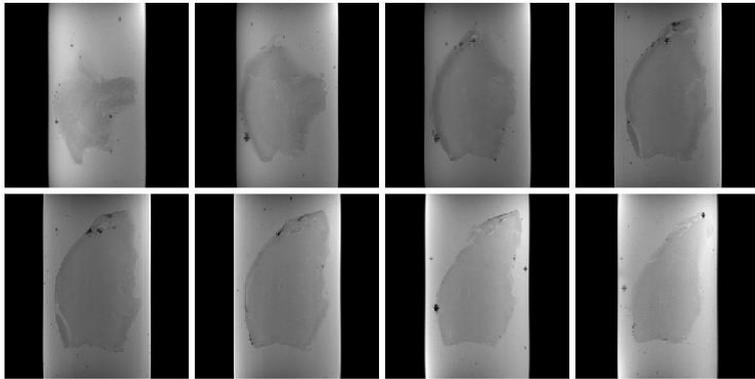


Figura AR 74. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 3 agudo remoto 1.

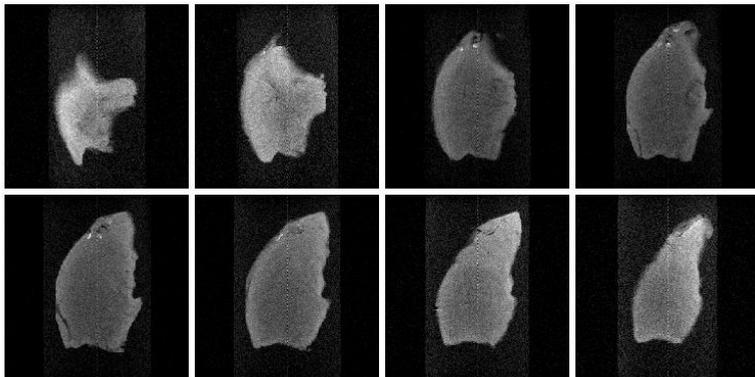


Figura AR 75. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 3 agudo remoto 1.

2.3.2. ADYACENTE

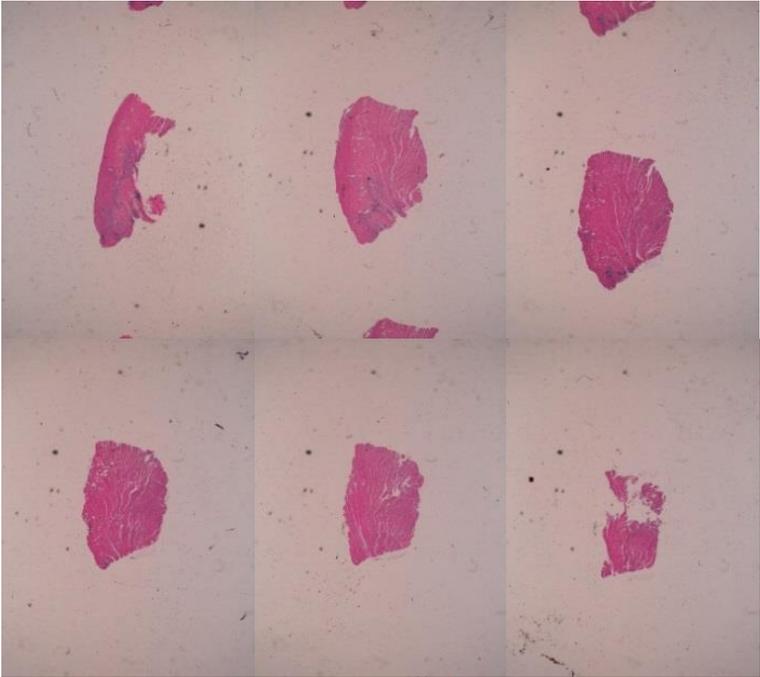


Figura AR 76. Cortes histopatológicos HE cerdo 3 agudo adyacente 1.

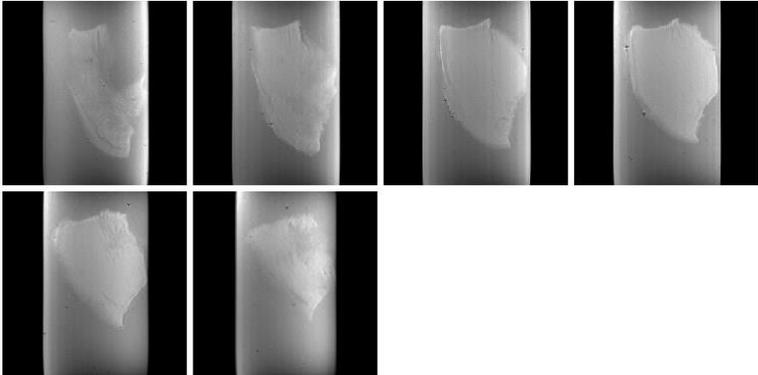


Figura AR 77. Imágenes ponderadas T1 cerdo 3 agudo adyacente 1.

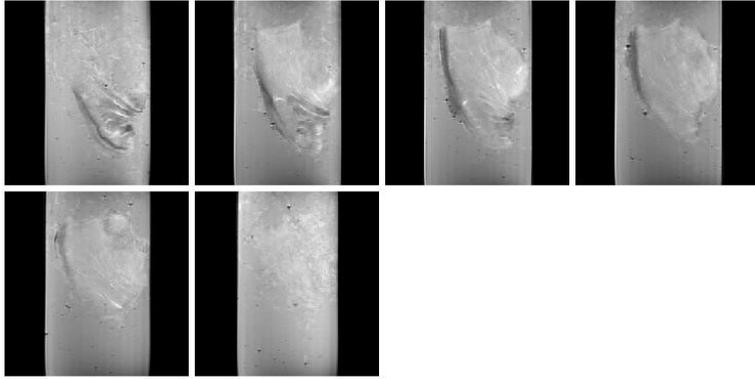


Figura AR 78. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 3 agudo adyacente 1.

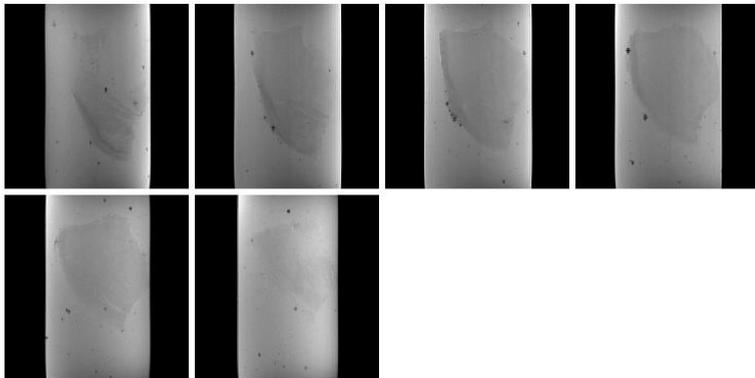


Figura AR 79. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 3 agudo adyacente 1.

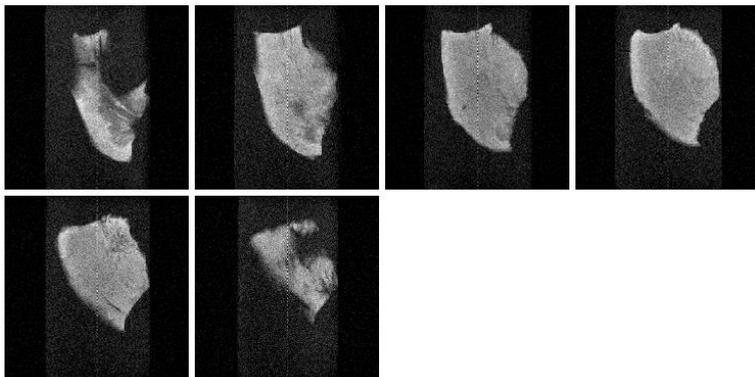


Figura AR 80. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 3 agudo adyacente 1.

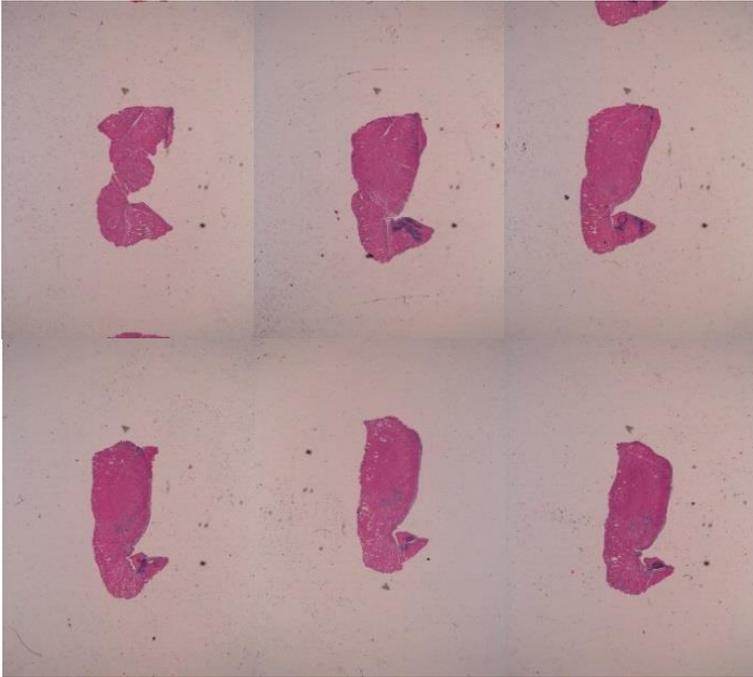


Figura AR 81. Cortes histopatológicos HE cerdo 3 agudo adyacente 2.

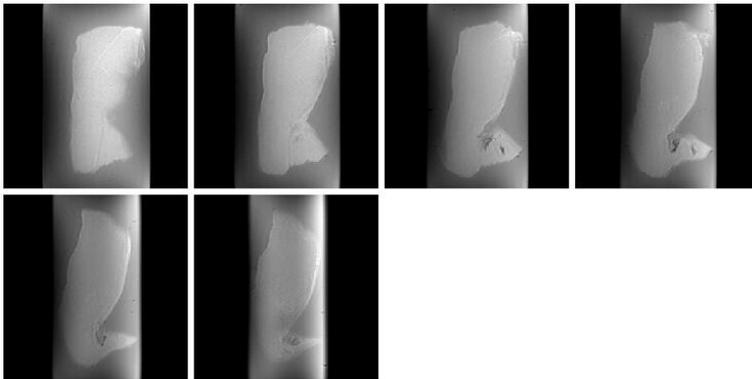


Figura AR 82. Imágenes ponderadas T1 cerdo 3 agudo adyacente 2.

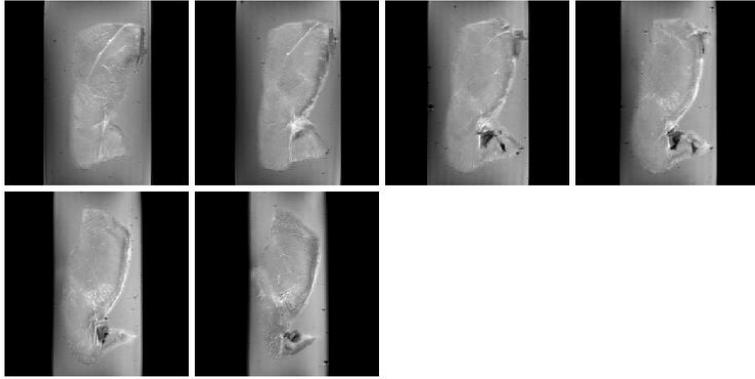


Figura AR 83. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 3 agudo adyacente 2.

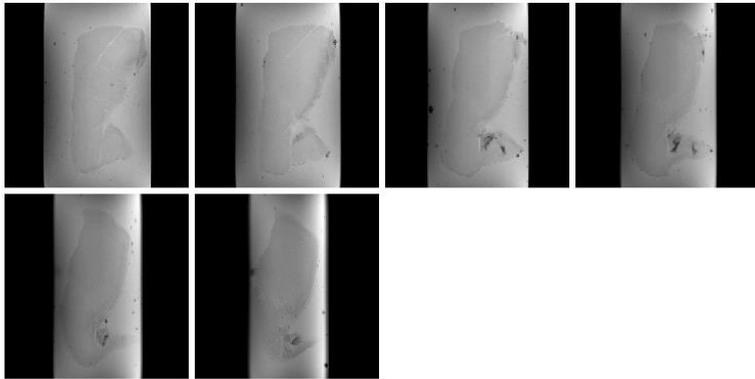


Figura AR 84. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 3 agudo adyacente 2.

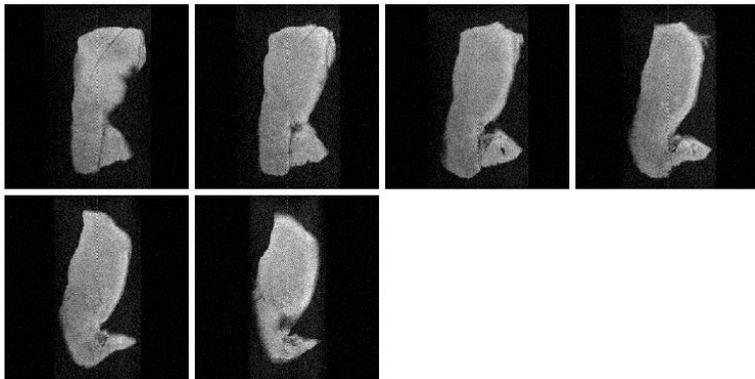


Figura AR 85. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 3 agudo adyacente 2.

2.3.3. INFARTADO

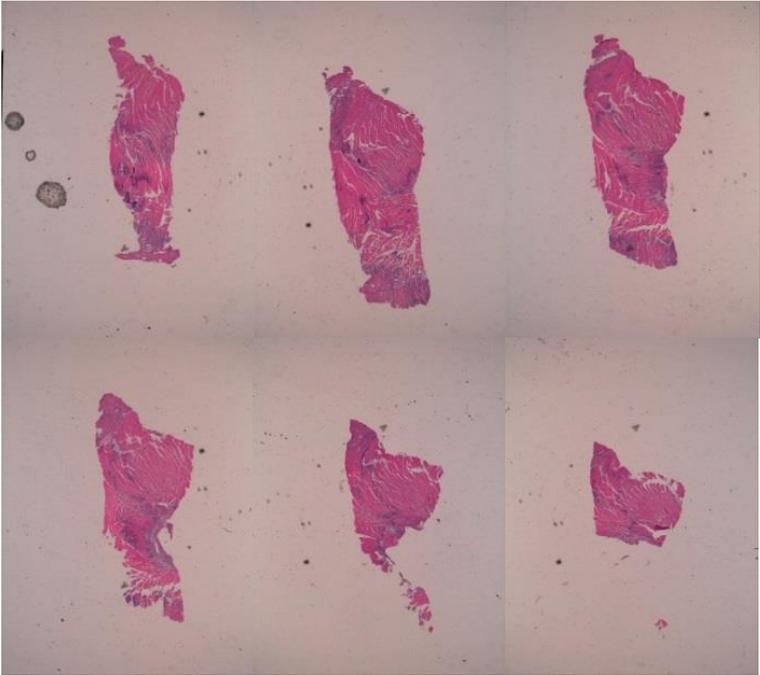


Figura AR 86. Cortes histopatológicos HE cerdo 3 agudo infartado 1.

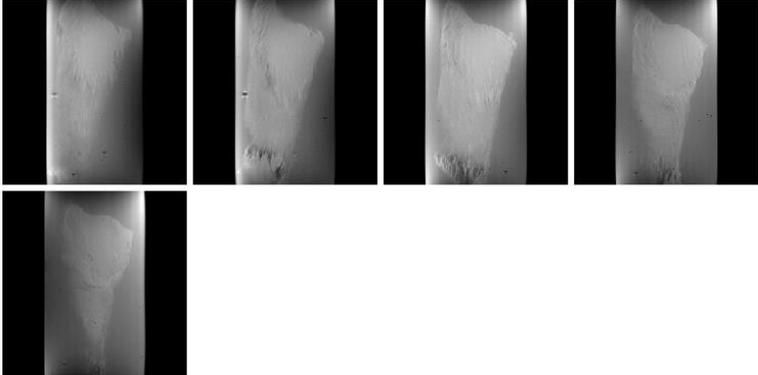


Figura AR 87. Imágenes ponderadas T1 cerdo 3 agudo infartado 1.

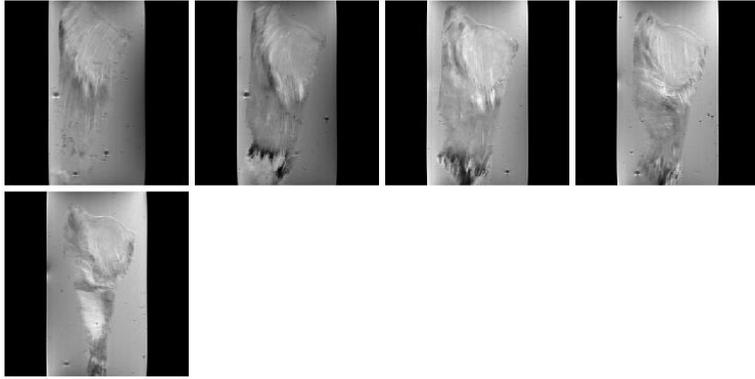


Figura AR 88. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 3 agudo infartado 1.

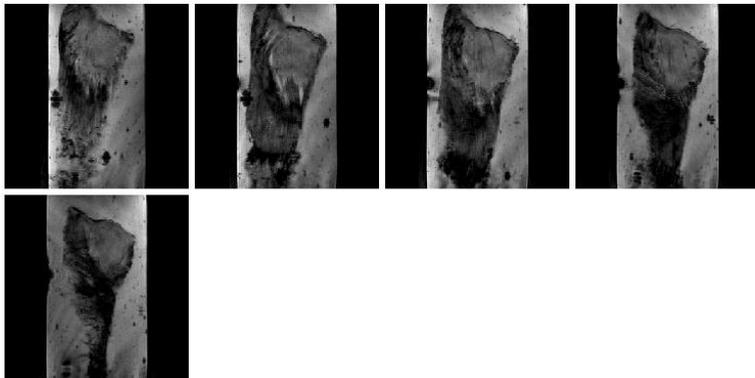


Figura AR 89. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 3 agudo infartado 1.

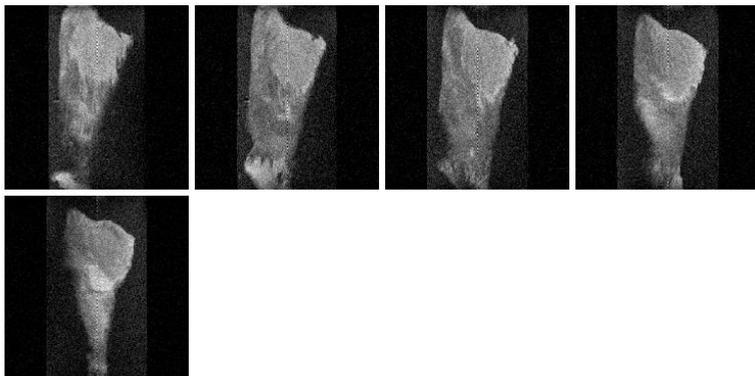


Figura AR 90. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 3 agudo infartado 1.

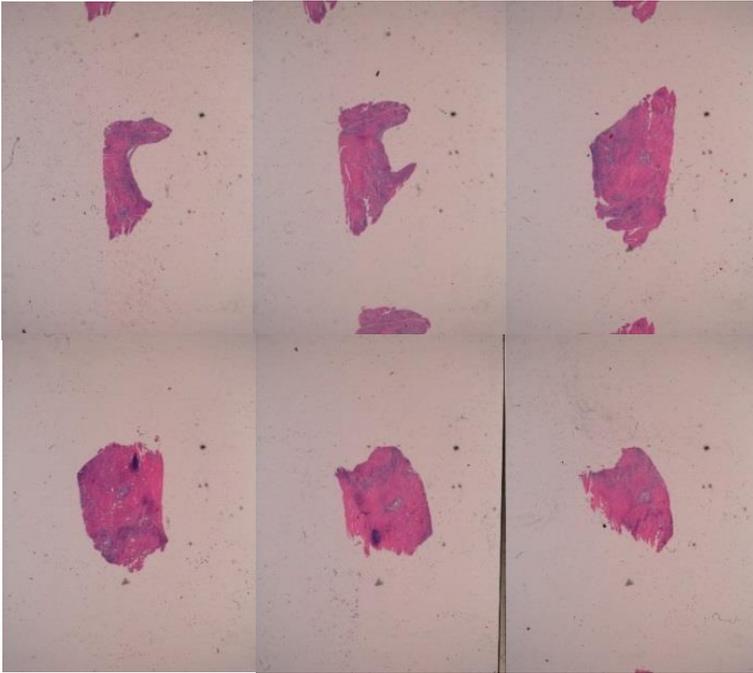


Figura AR 91. Cortes histopatológicos HE cerdo 3 agudo infartado 2.

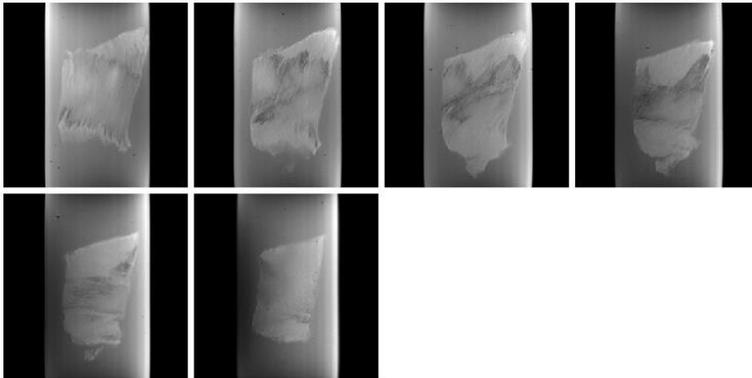


Figura AR 92. Imágenes ponderadas T1 cerdo 3 agudo infartado 2.

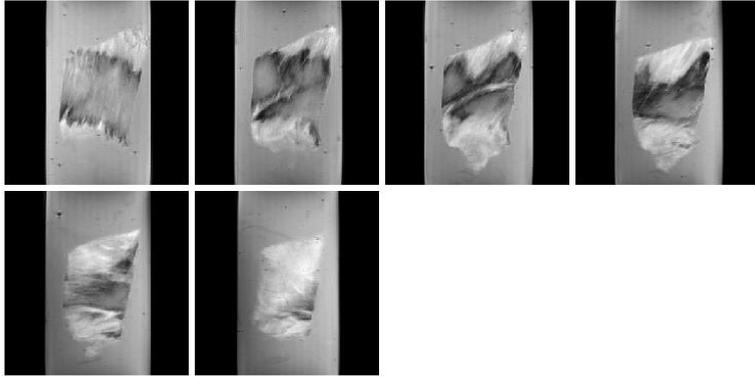


Figura AR 93. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 3 agudo infartado 2.

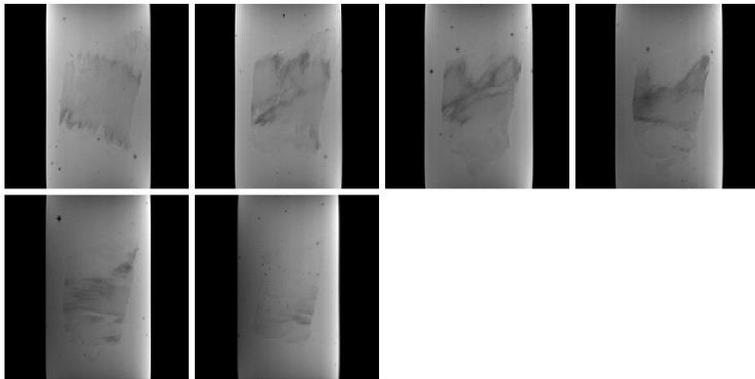


Figura AR 94. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 3 agudo infartado 2.

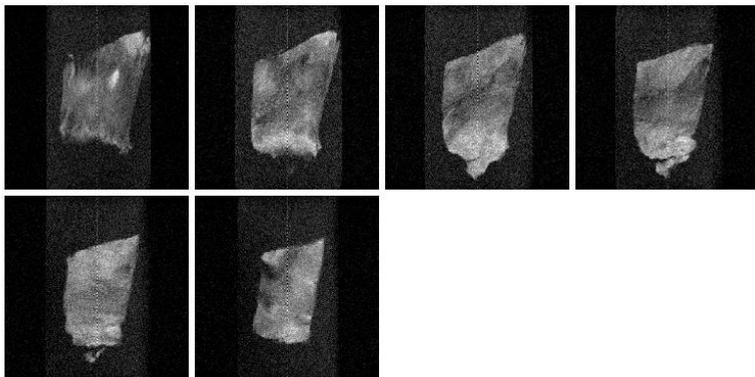


Figura AR 95. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 3 agudo infartado 2.

2.4. CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 4 AGUDO

2.4.1. REMOTO

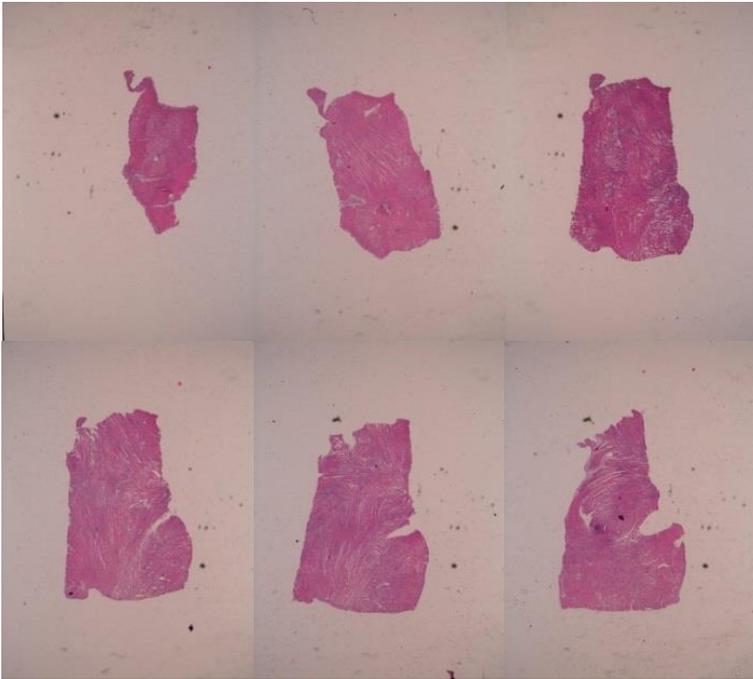


Figura AR 96. Cortes histopatológicos HE cerdo 4 agudo remoto 1.

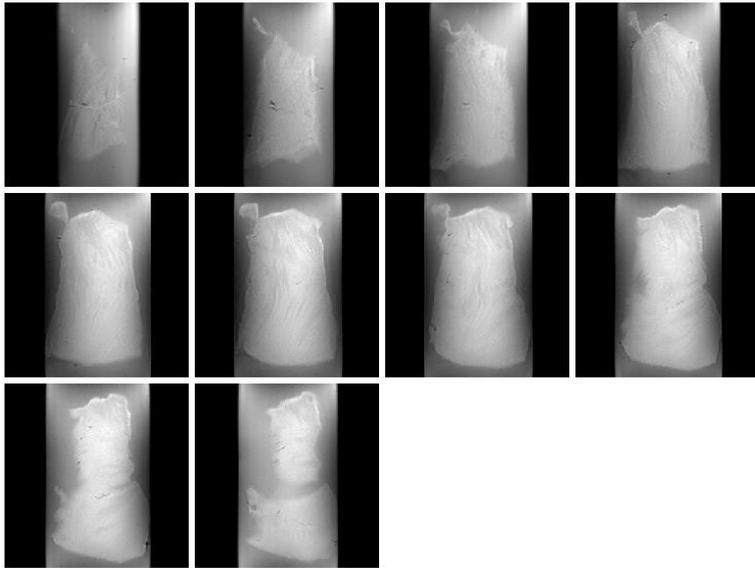


Figura AR 97. Imágenes ponderadas T1 cerdo 4 agudo remoto 1.

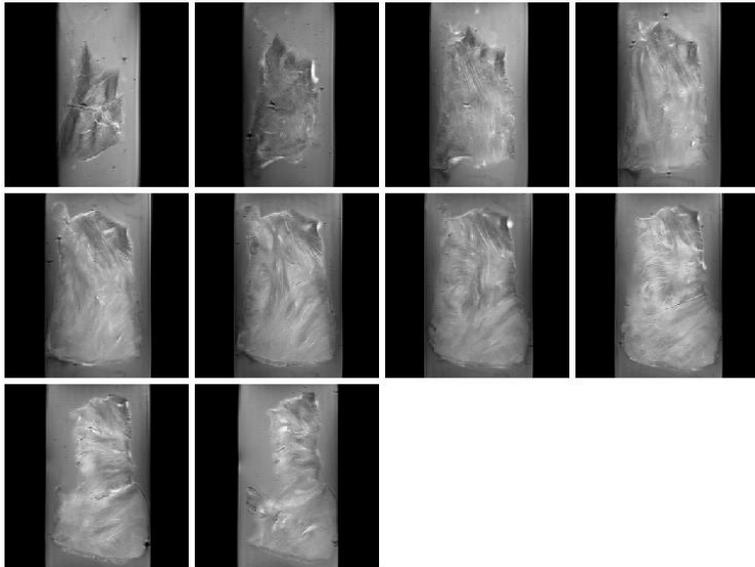


Figura AR 98. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 4 agudo remoto 1.

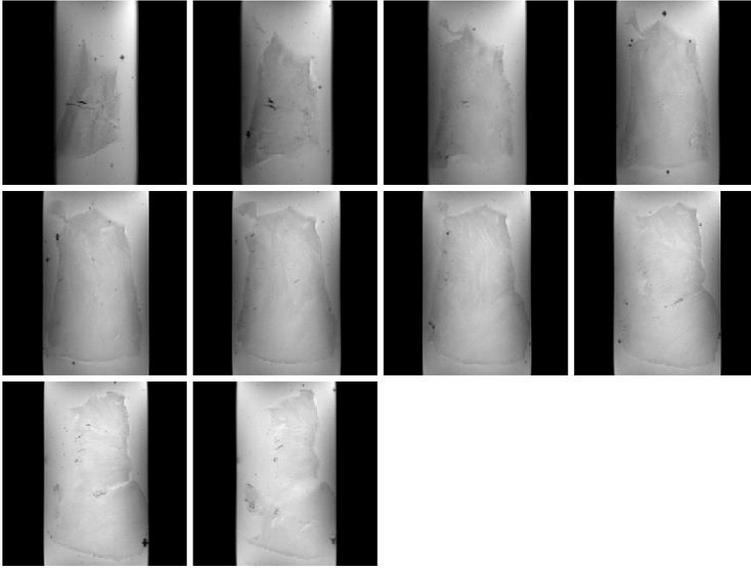


Figura AR 99. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 4 agudo remoto 1.

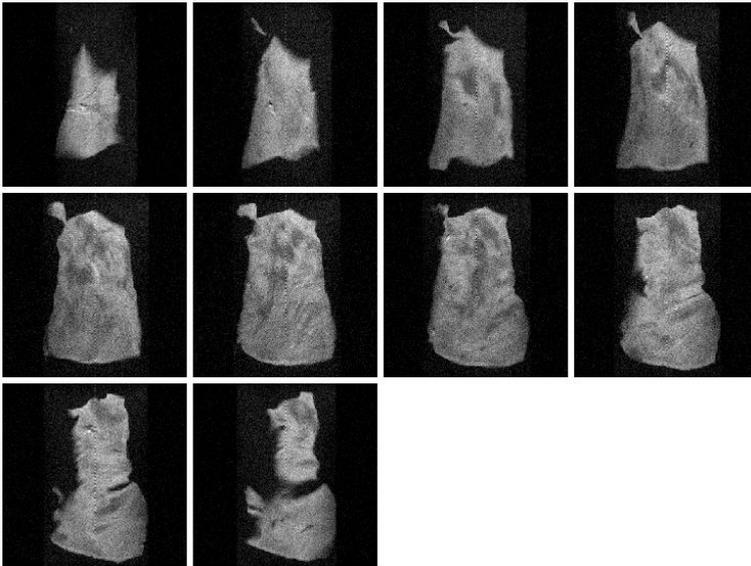


Figura AR 100. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 4 agudo remoto 1.

2.4.2. ADYACENTE

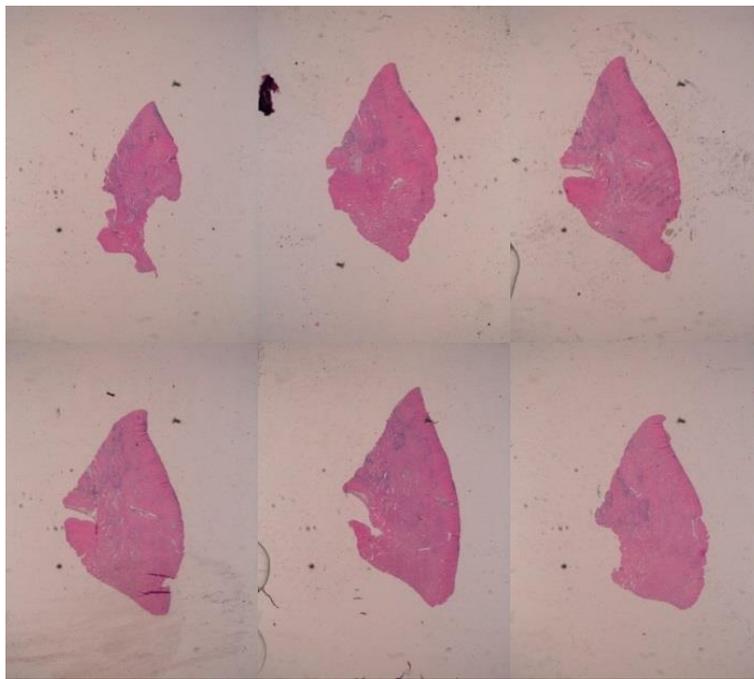


Figura AR 101. Cortes histopatológicos HE cerdo 4 agudo adyacente 1.

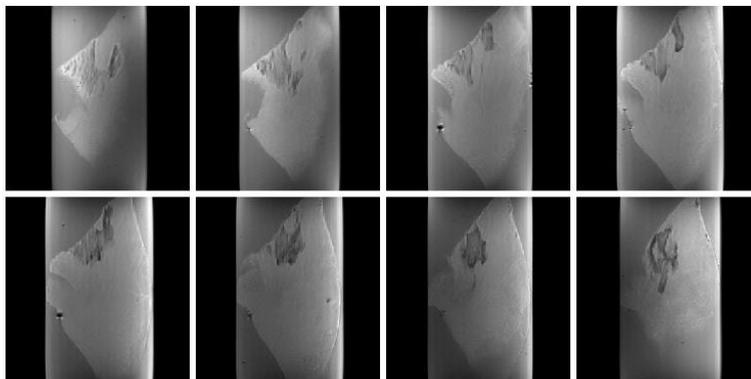


Figura AR 102. Imágenes ponderadas T1 cerdo 4 agudo adyacente 1.

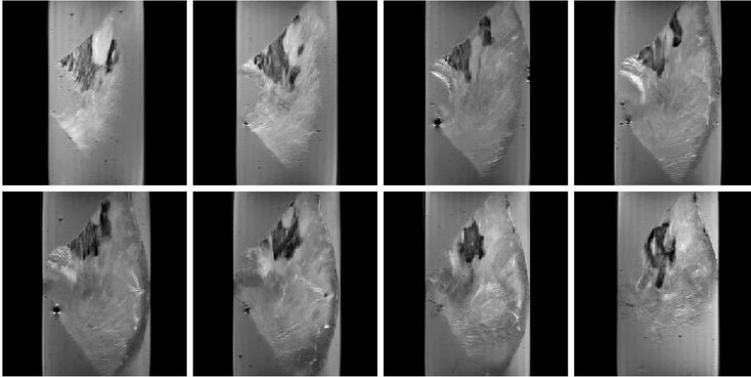


Figura AR 103. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 4 agudo adyacente 1.

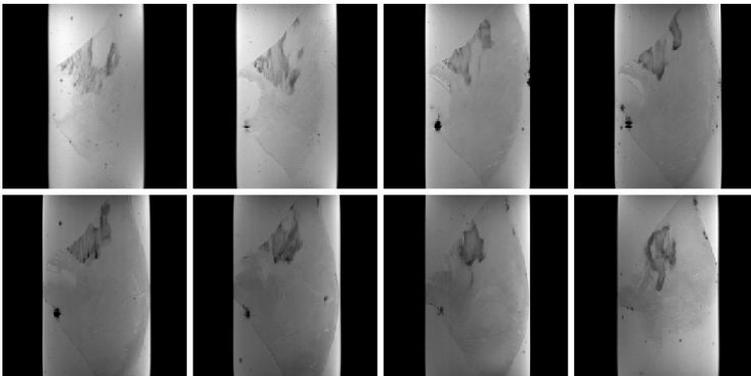


Figura AR 104.. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 4 agudo adyacente 1.

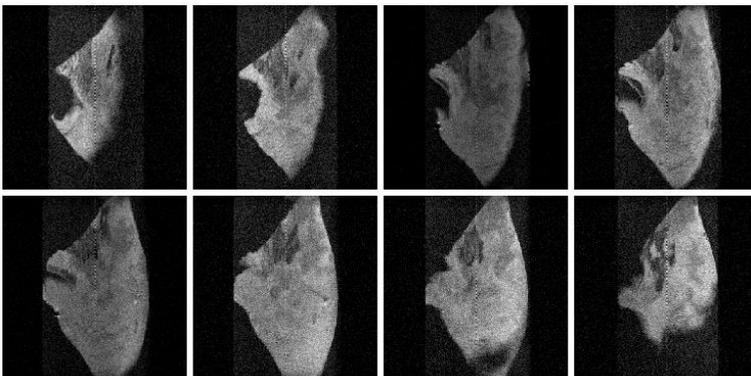


Figura AR 105. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 4 agudo adyacente 1.

2.5. **CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 5 AGUDO**

2.5.1. **ADYACENTE**

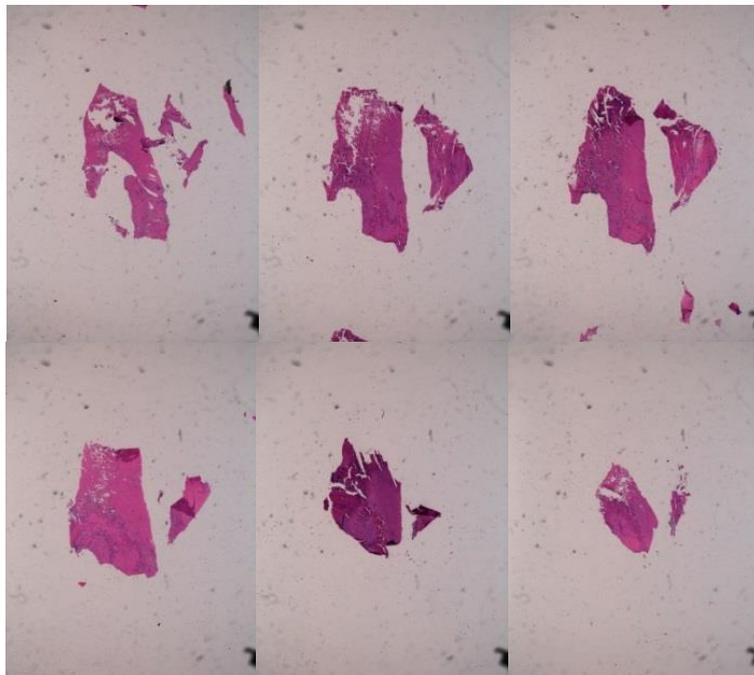


Figura 106. Cortes histopatológicos HE cerdo 5 agudo adyacente 1.

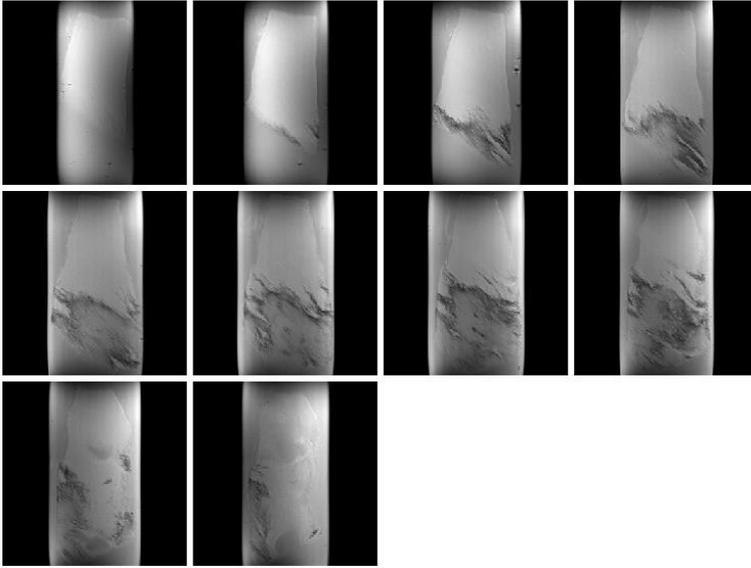


Figura AR 107. Imágenes ponderadas T1 cerdo 5 agudo adyacente 1.

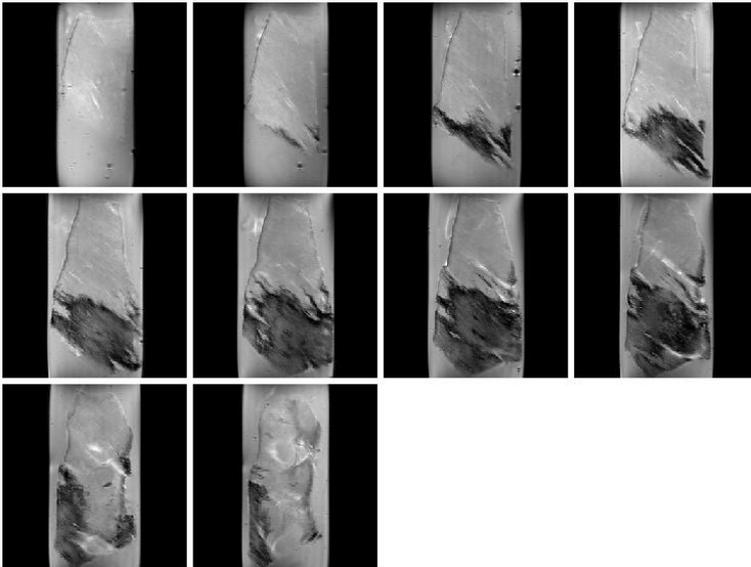


Figura AR 108. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 5 agudo adyacente 1.

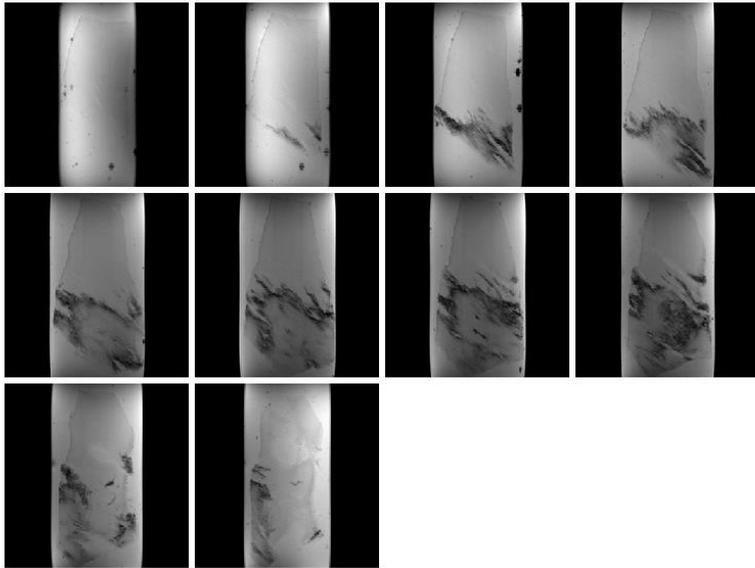


Figura AR 109. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 5 agudo adyacente 1.

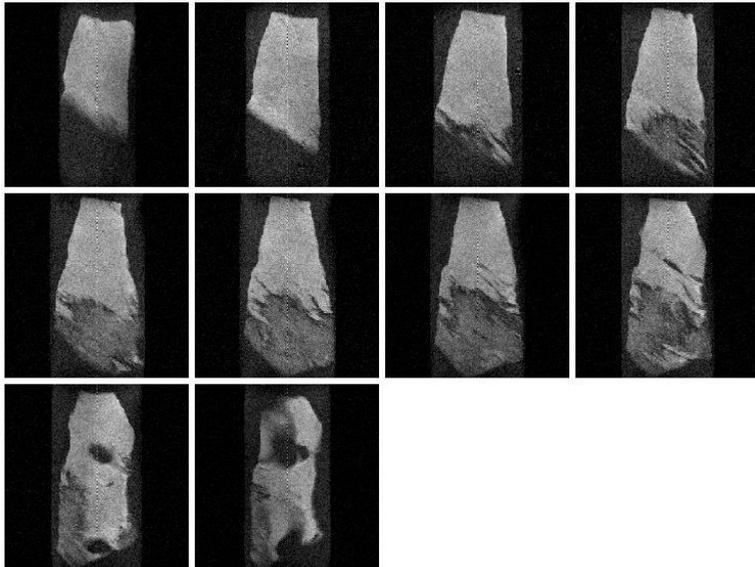


Figura AR 110. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 5 agudo adyacente 1.

2.5.2. INFARTADO



Figura AR 111. Cortes histopatológicos HE cerdo 5 agudo infartado 1.

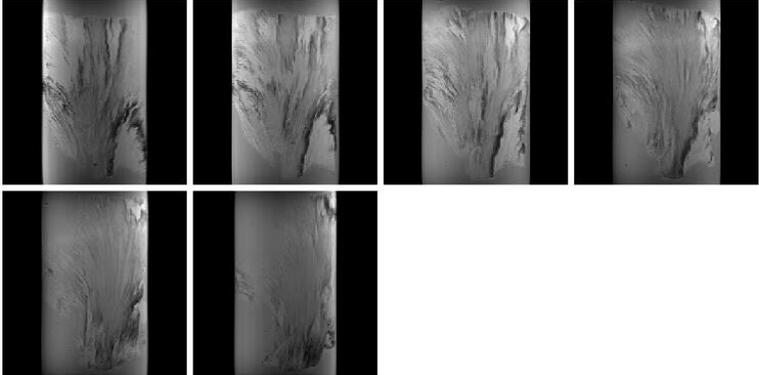


Figura AR 112. Imágenes ponderadas T1 cerdo 5 agudo infartado 1.

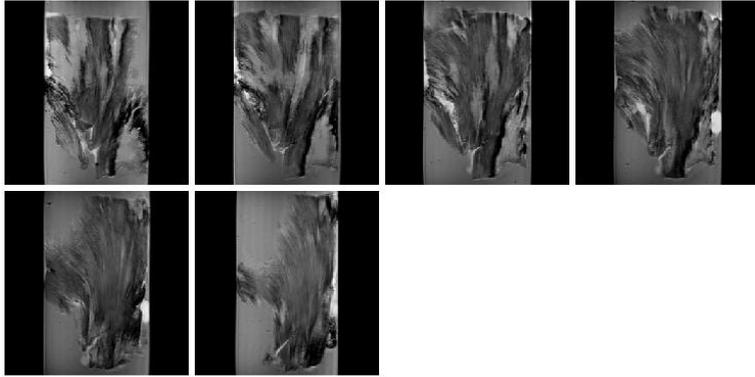


Figura AR 113. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 5 agudo infartado 1.

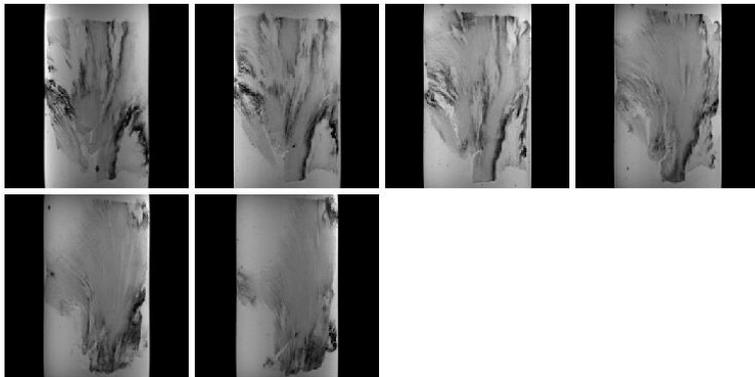


Figura AR 114. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 5 agudo infartado 1.

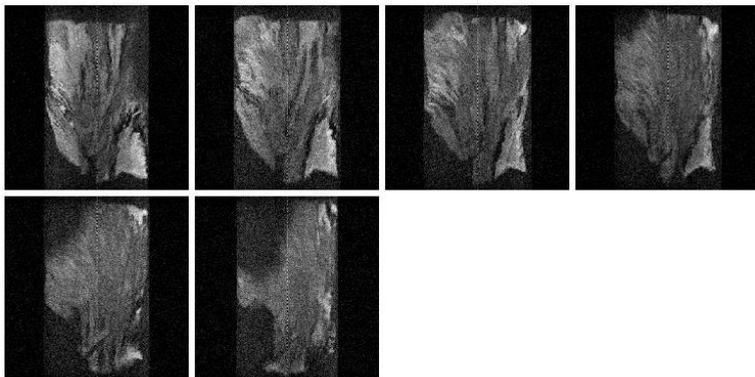


Figura AR 115. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 5 agudo infartado 1.

2.6. CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 6 AGUDO

2.6.1. ADYACENTE



Figura AR 116. Cortes histopatológicos HE cerdo 6 agudo adyacente 1.

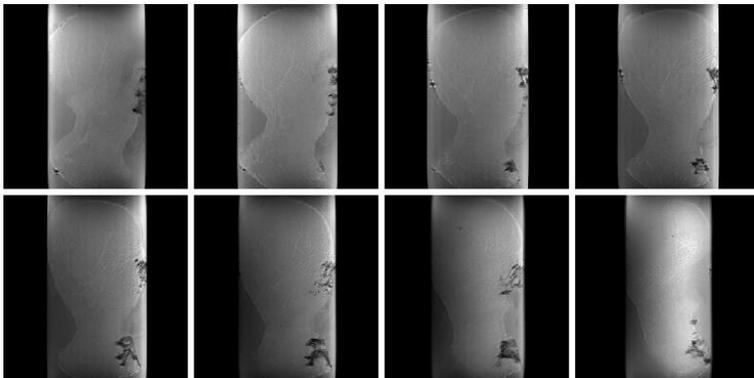


Figura AR 117. Imágenes ponderadas T1 cerdo 6 agudo adyacente 1.

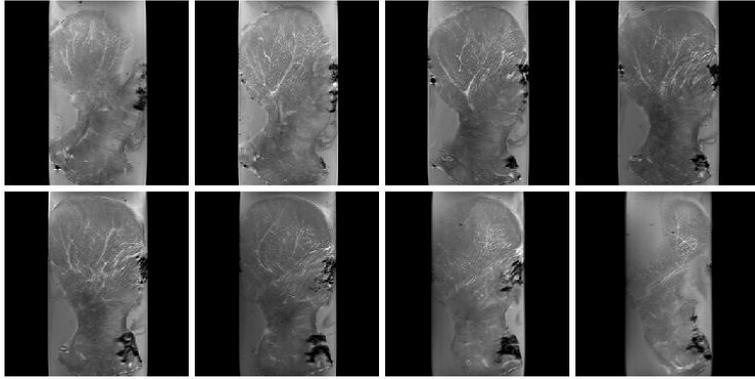


Figura AR 118. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 6 agudo adyacente 1.

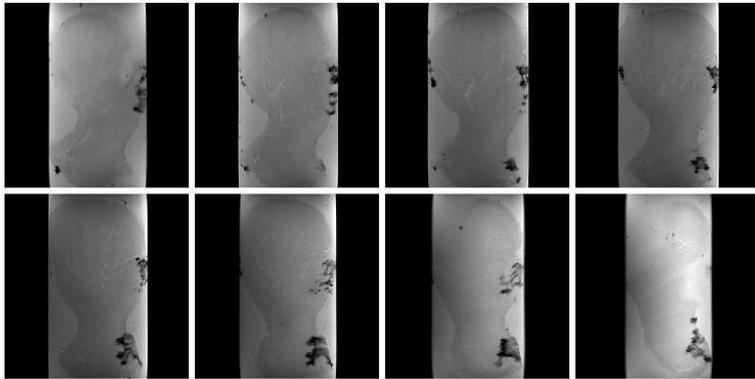


Figura AR 119. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 6 agudo adyacente 1.

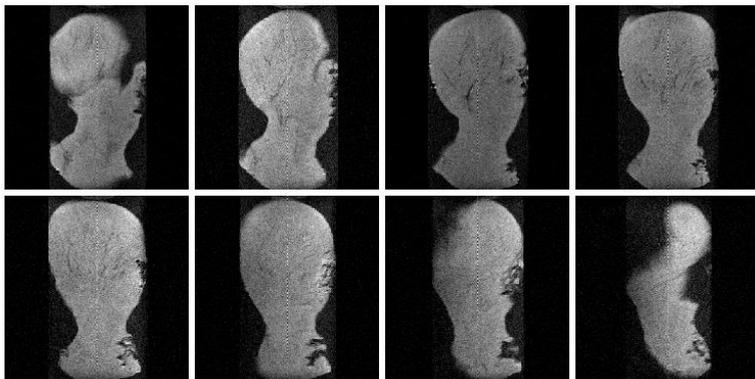


Figura AR 120. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 6 agudo adyacente 1.

2.6.2. INFARTADO

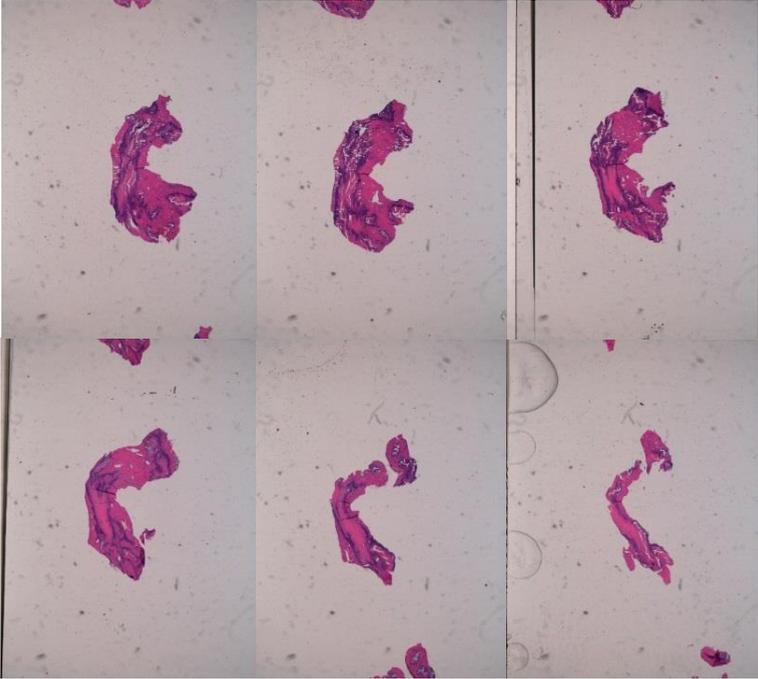


Figura AR 121. Cortes histopatológicos HE cerdo 6 agudo infartado 1.

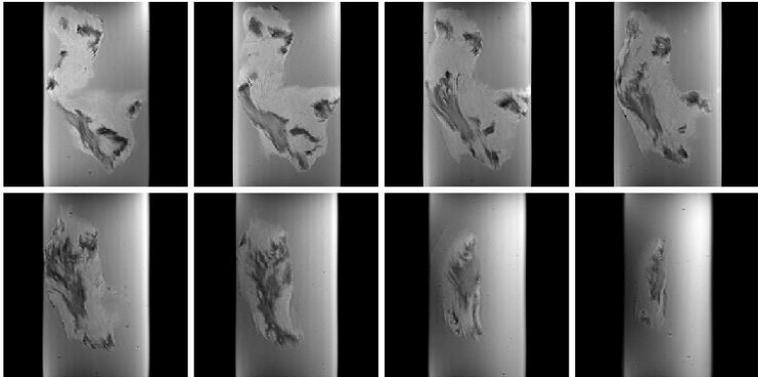


Figura AR 122. Imágenes ponderadas T1 cerdo 6 agudo infartado 1.

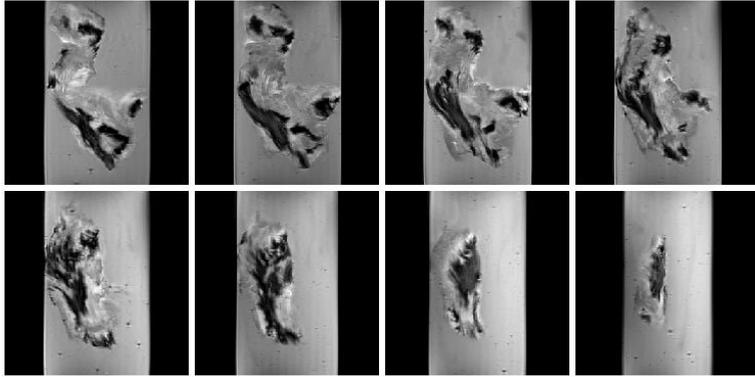


Figura AR 123. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 6 agudo infartado 1.

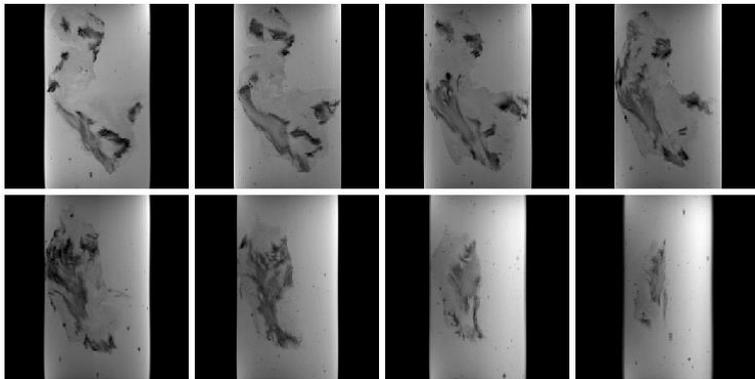


Figura AR 124. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 6 agudo infartado 1.

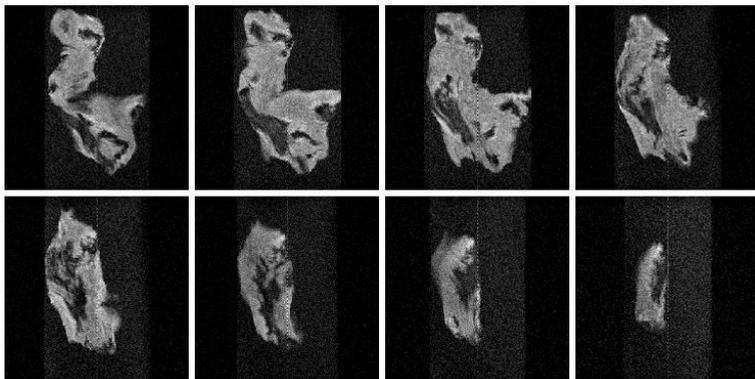


Figura AR 125. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 6 agudo infartado 1.

3. CRÓNICOS

3.1. CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 1 CRÓNICO

3.1.1. REMOTO

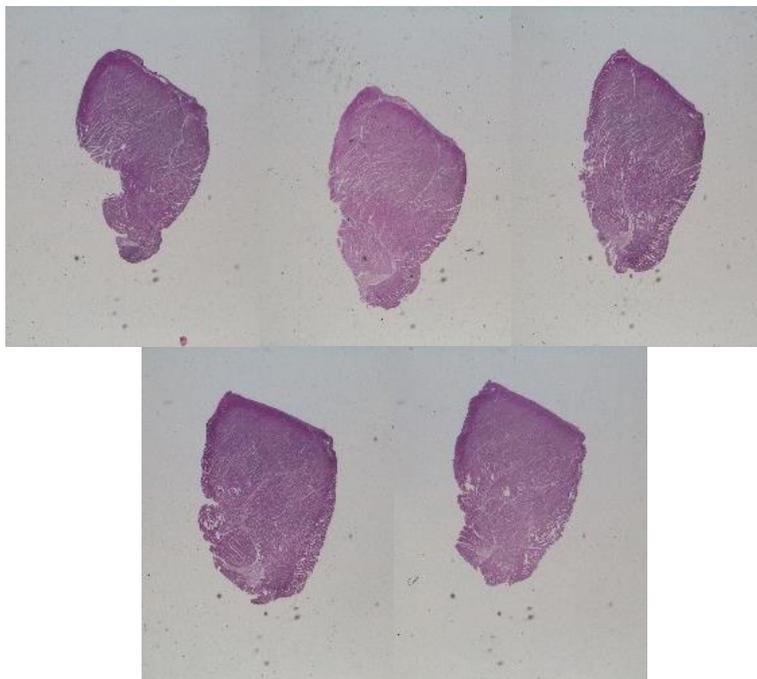


Figura AR 126. Cortes histopatológicos HE cerdo 1 crónico remoto 1.

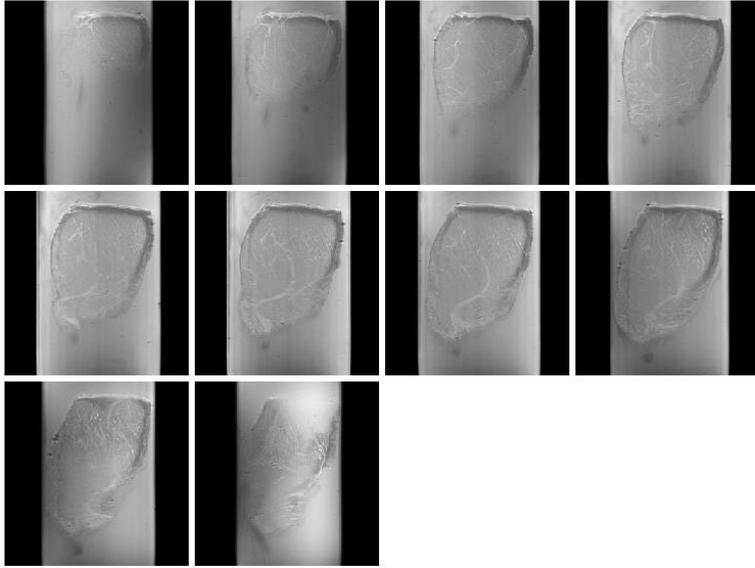


Figura AR 127. Imágenes ponderadas T1 cerdo 1 crónico remoto 1.

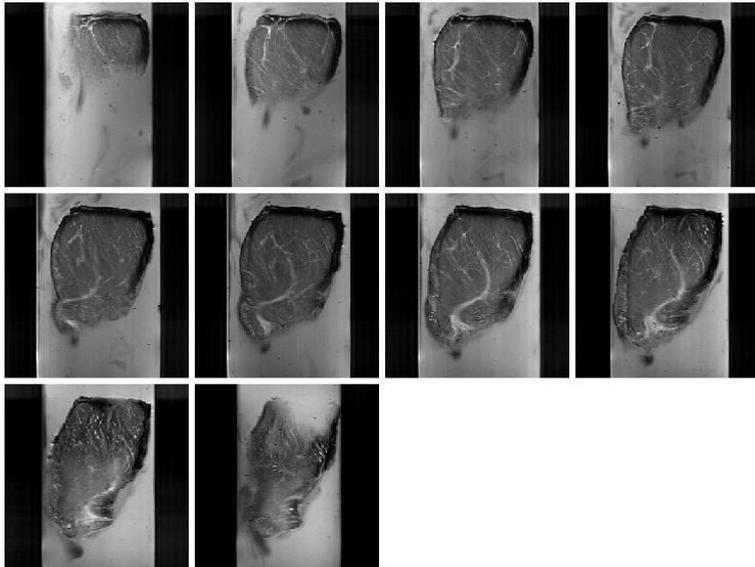


Figura AR 128. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 1 crónico remoto 1.

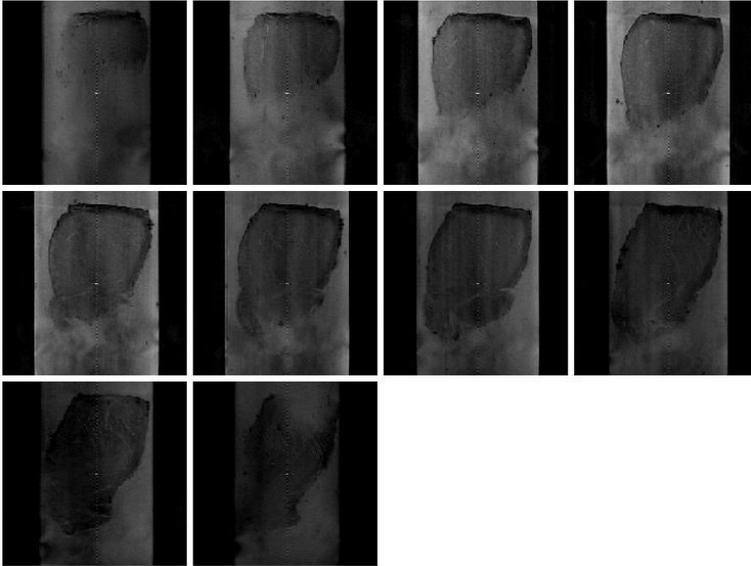


Figura AR 129.. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 1 crónico remoto 1.

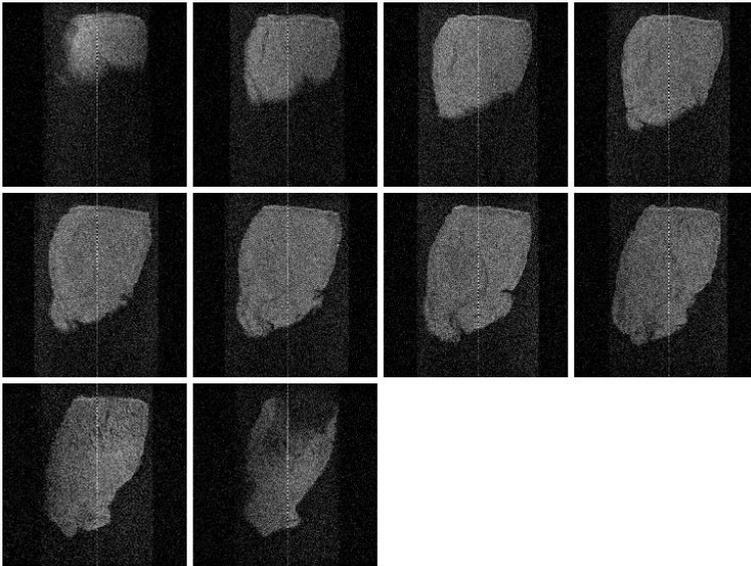


Figura AR 130. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 1 crónico remoto 1.

3.1.2. ADYACENTE

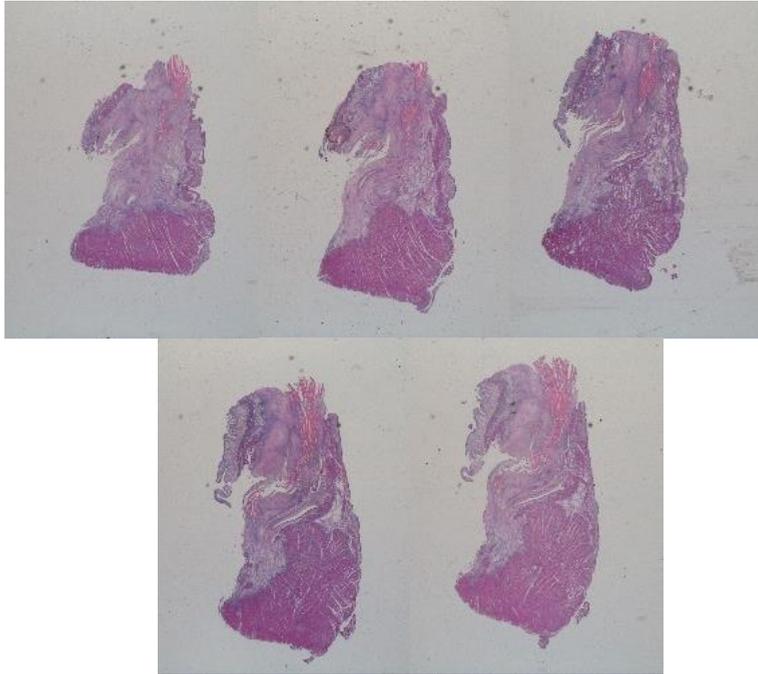


Figura AR 131. Cortes histopatológicos HE cerdo 1 crónico adyacente-infartado 1.

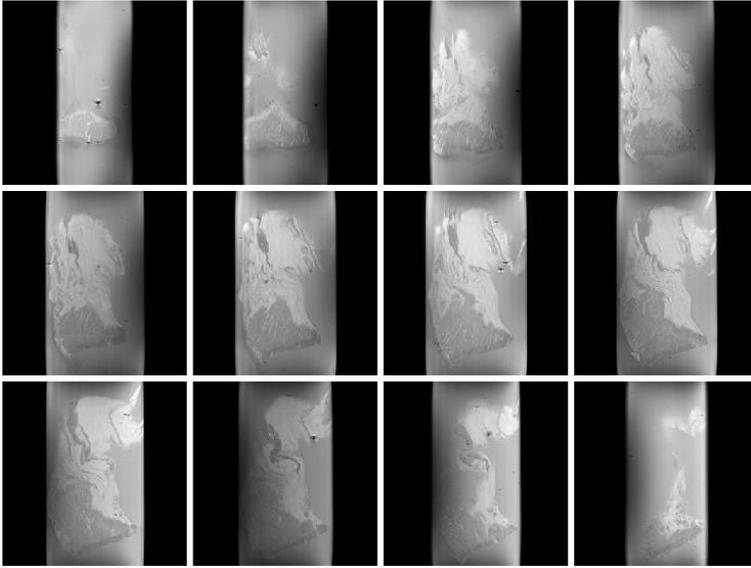


Figura AR 132. Imágenes ponderadas T1 cerdo 1 crónico adyacente-infartado 1.

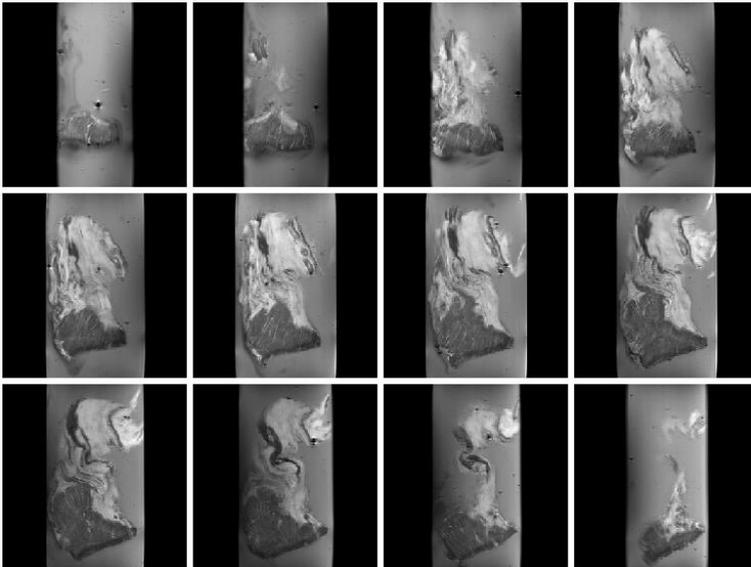


Figura AR 133. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 1 crónico adyacente-infartado 1.

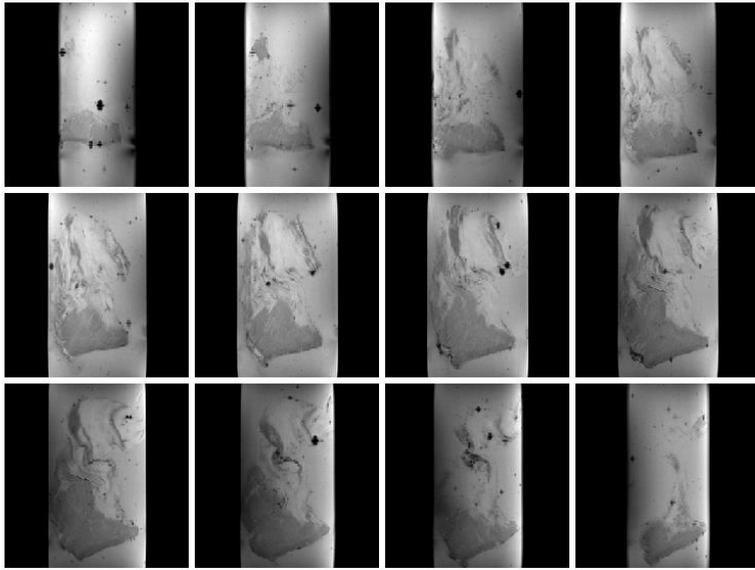


Figura AR 134. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 1 crónico adyacente-infartado 1.

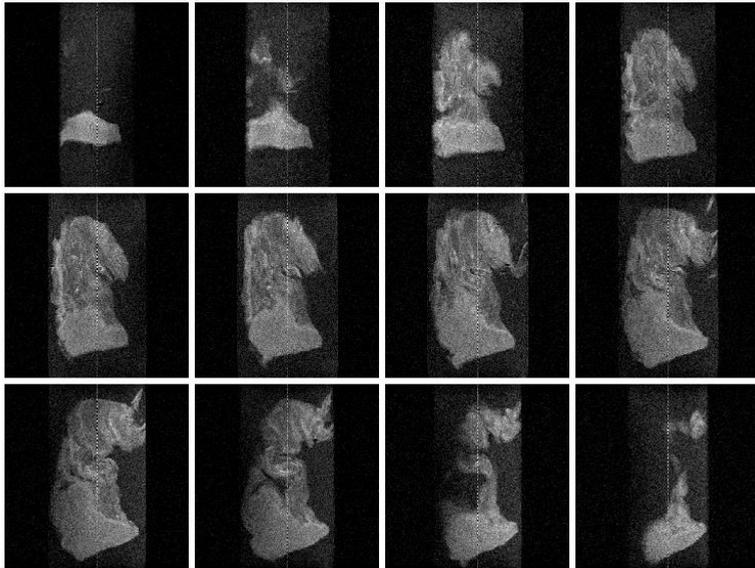


Figura AR 135. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 1 crónico adyacente-infartado 1.

3.2. CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 2 CRÓNICO

3.2.1. REMOTO

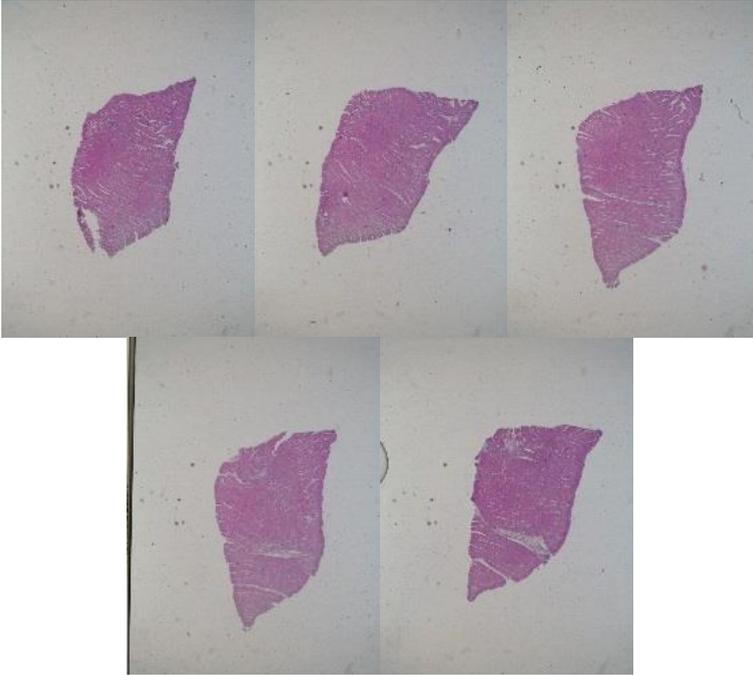


Figura AR 136. Cortes histopatológicos HE cerdo 2 crónico remoto 1.

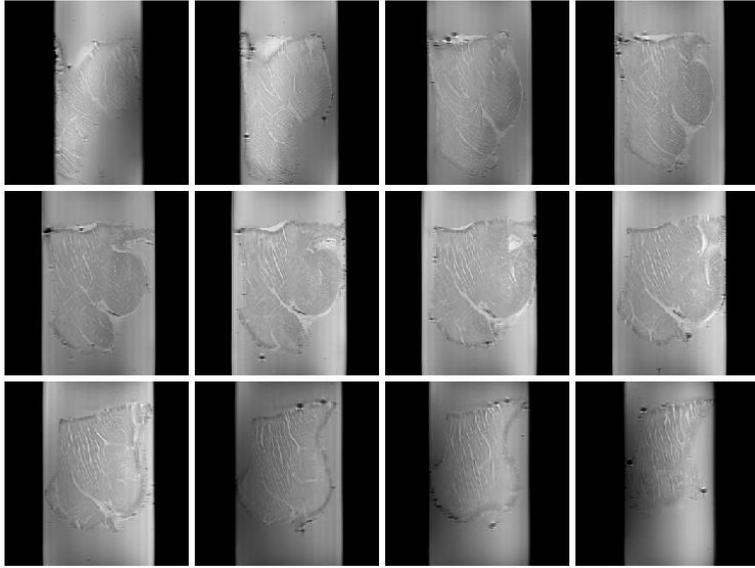


Figura AR 137. Imágenes ponderadas T1 cerdo 2 crónico remoto 1.

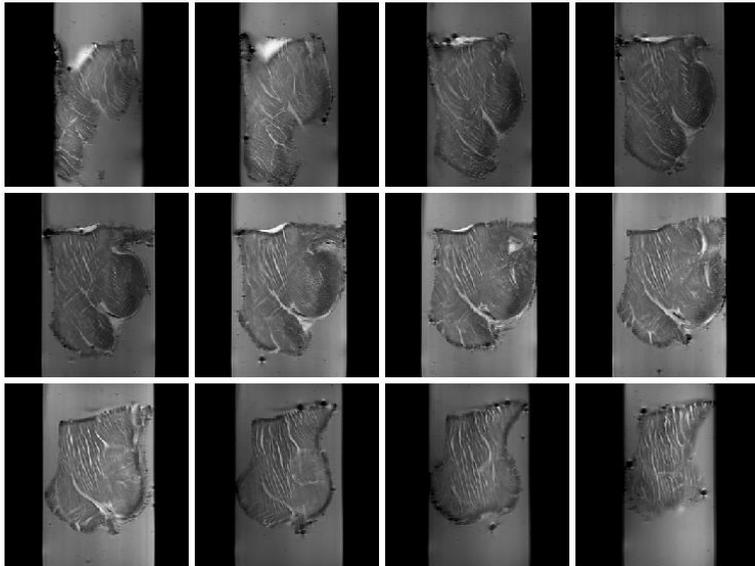


Figura AR 138. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 2 crónico remoto 1.

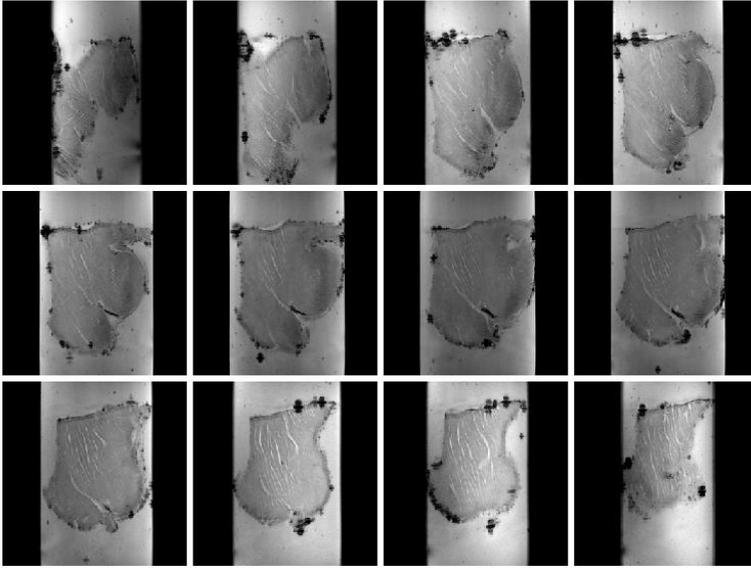


Figura AR 139. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 2 crónico remoto 1.

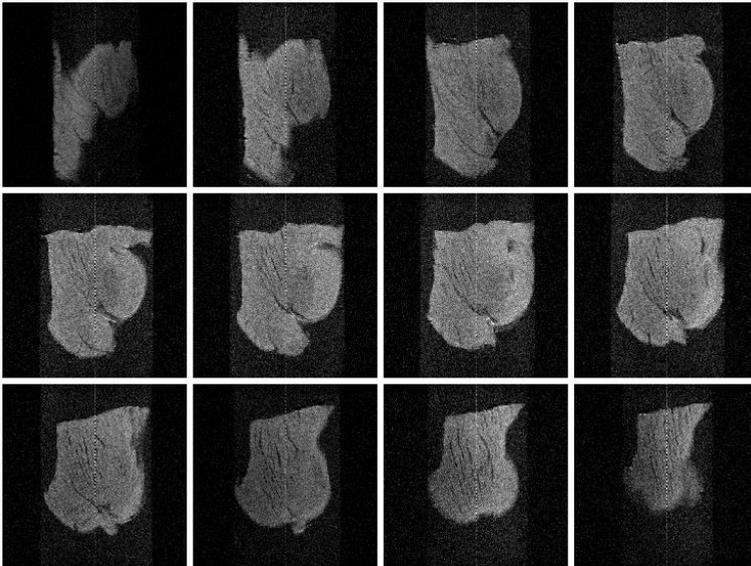


Figura AR 140. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 2 crónico remoto 1.

3.2.2. ADYACENTE

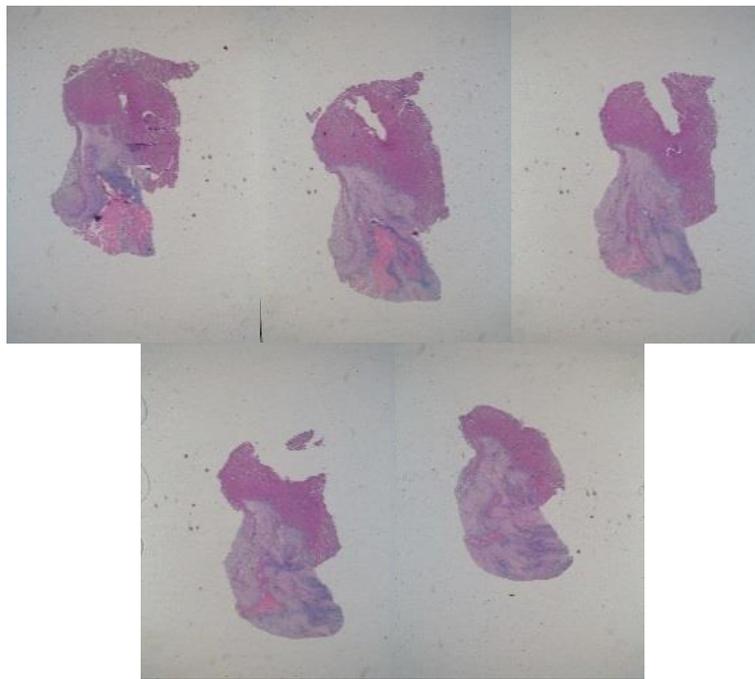


Figura AR 141. Cortes histopatológicos HE cerdo 2 crónico adyacente 1.

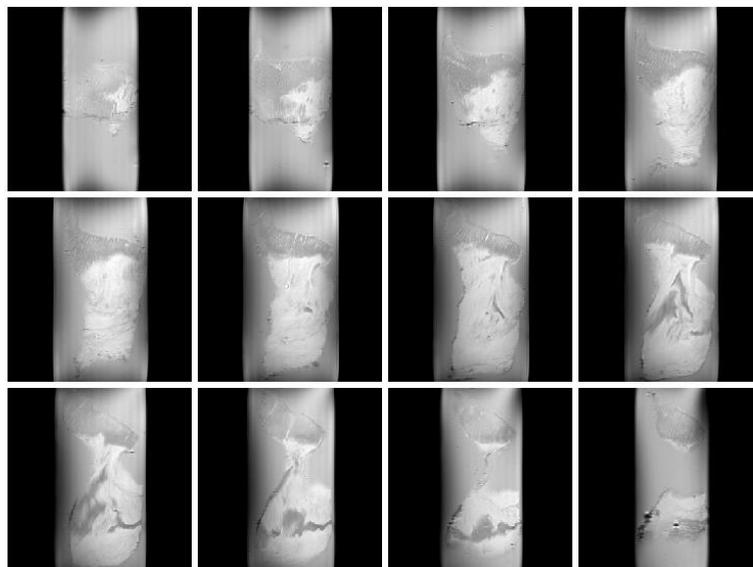


Figura AR 142. Imágenes ponderadas T1 cerdo 2 crónico adyacente 1.

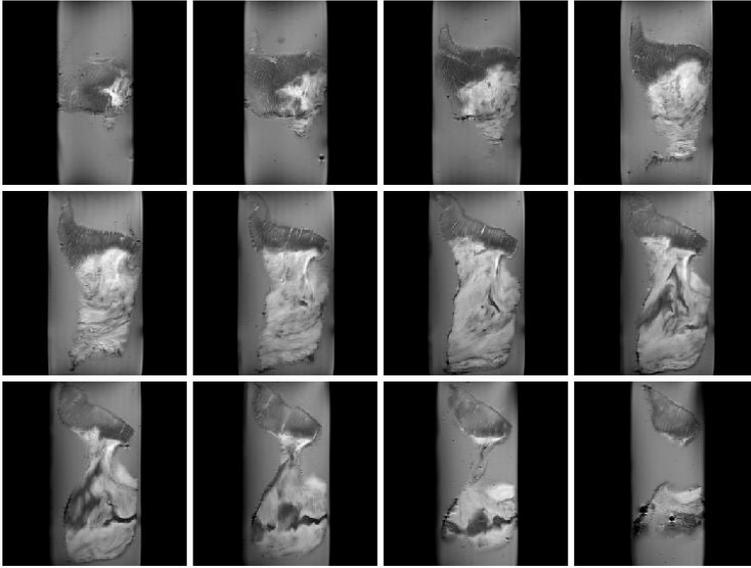


Figura AR 143. Imágenes ponderadas de T2.

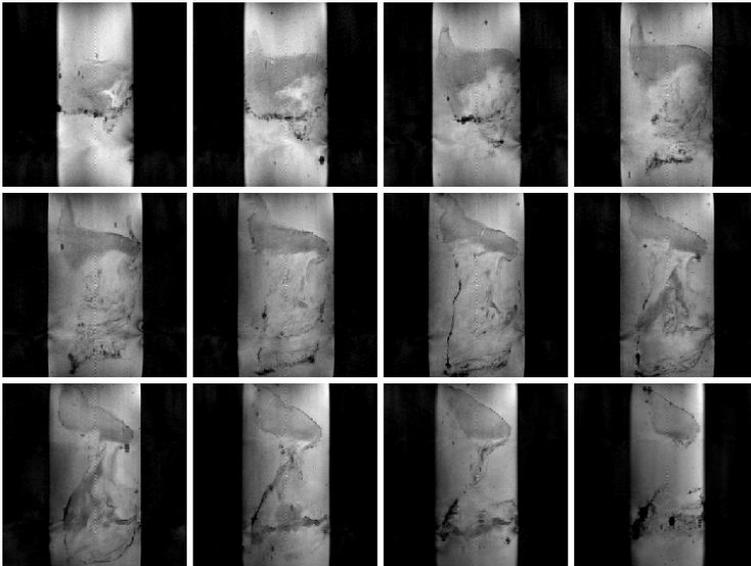


Figura AR 144. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 2 crónico adyacente 1.

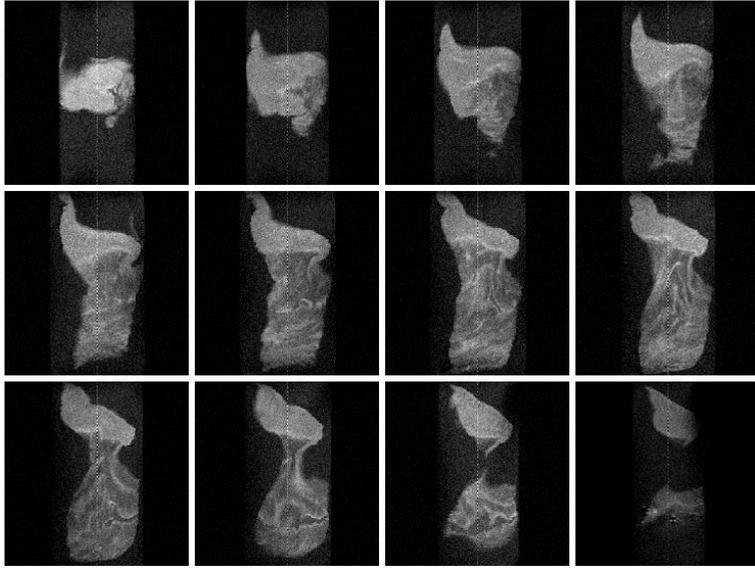


Figura AR 145. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 2 crónico adyacente 1.

3.2.3. INFARTADO

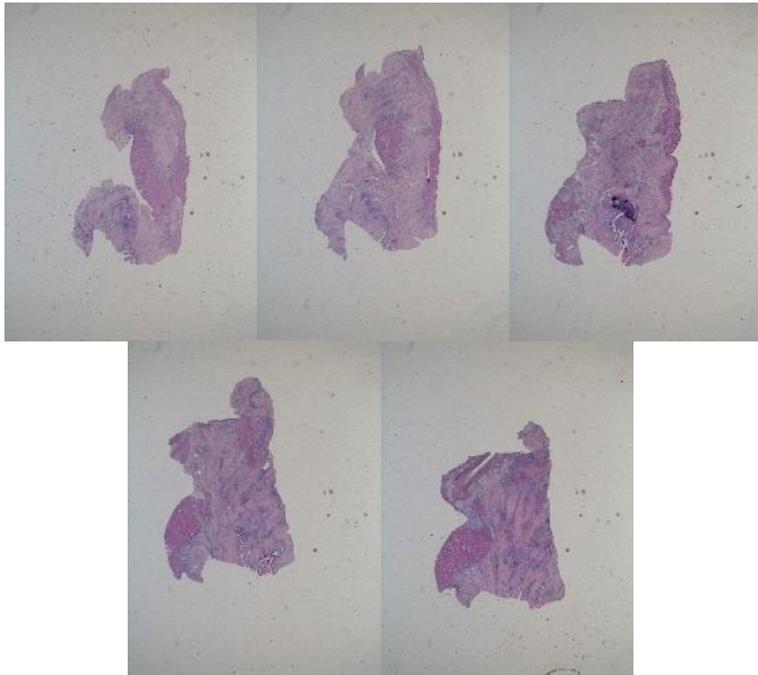


Figura AR 146. Cortes histopatológicos HE cerdo 2 crónico infartado 1.

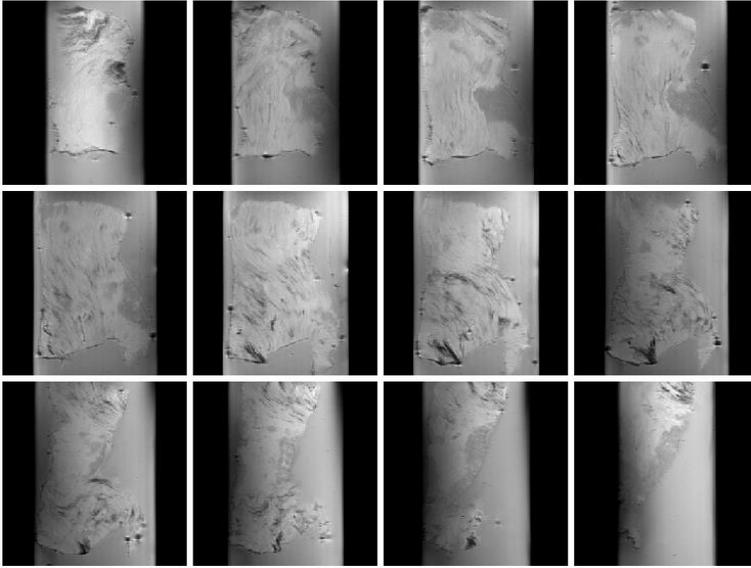


Figura AR 147. Imágenes ponderadas T1 cerdo 2 crónico infartado 1.

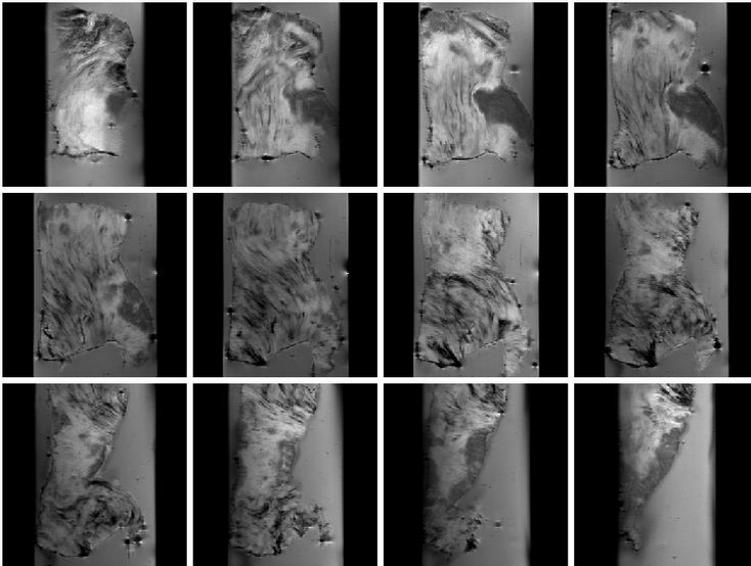


Figura AR 148. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 2 crónico infartado 1.

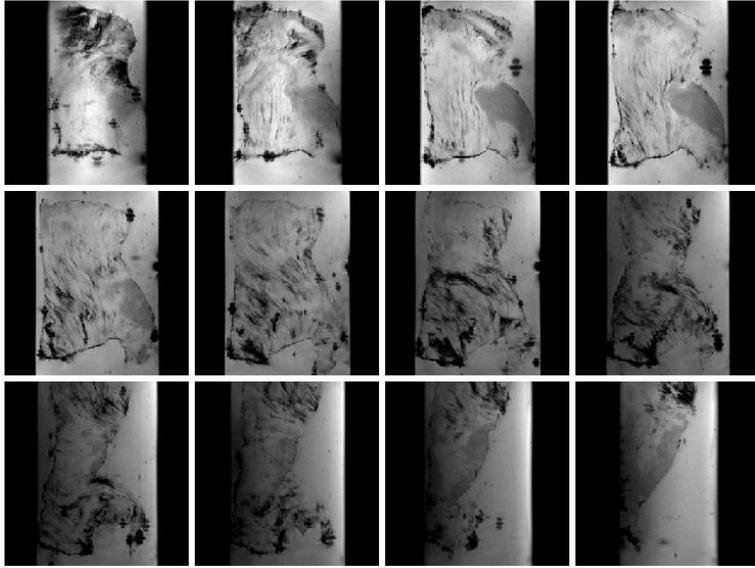


Figura AR 149.. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 2 crónico infartado 1.

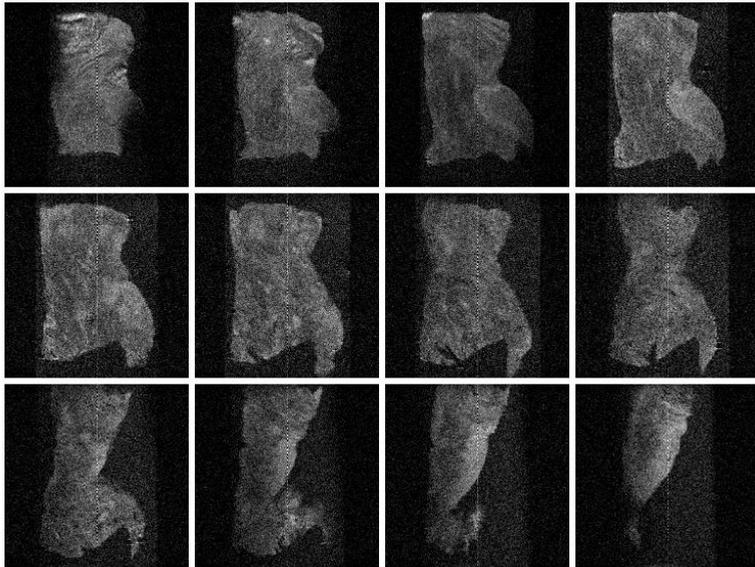


Figura AR 150.. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 2 crónico infartado 1.

3.3. CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 3 CRÓNICO

3.3.1. REMOTO

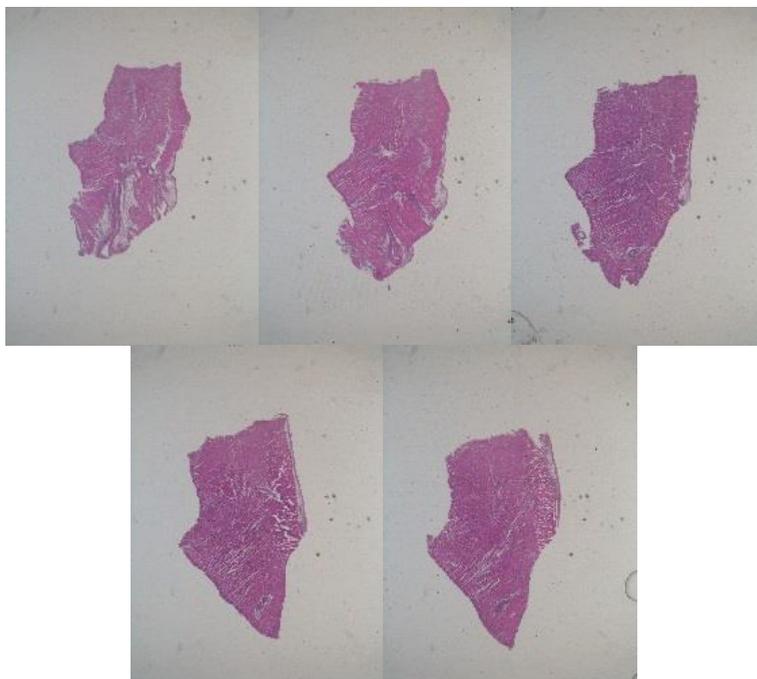


Figura AR 151. Cortes histopatológicos HE cerdo crónico 3 remoto 1.

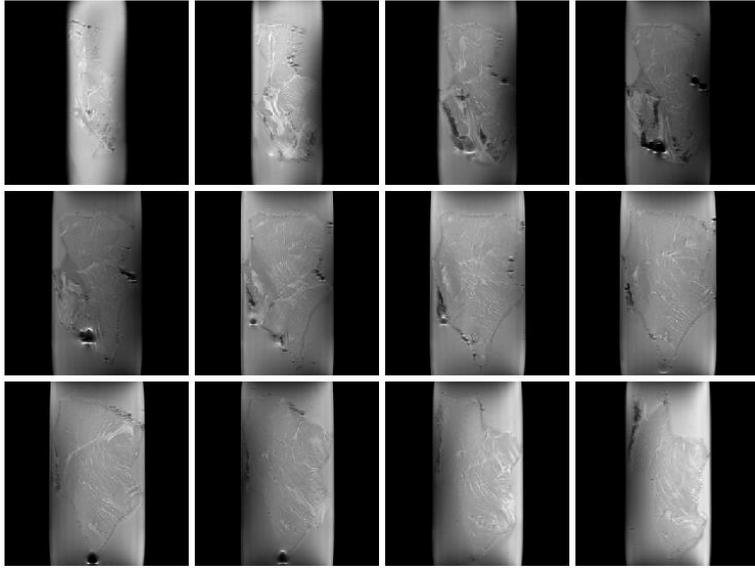


Figura AR 152. Imágenes ponderadas T1 cerdo crónico 3 remoto 1.

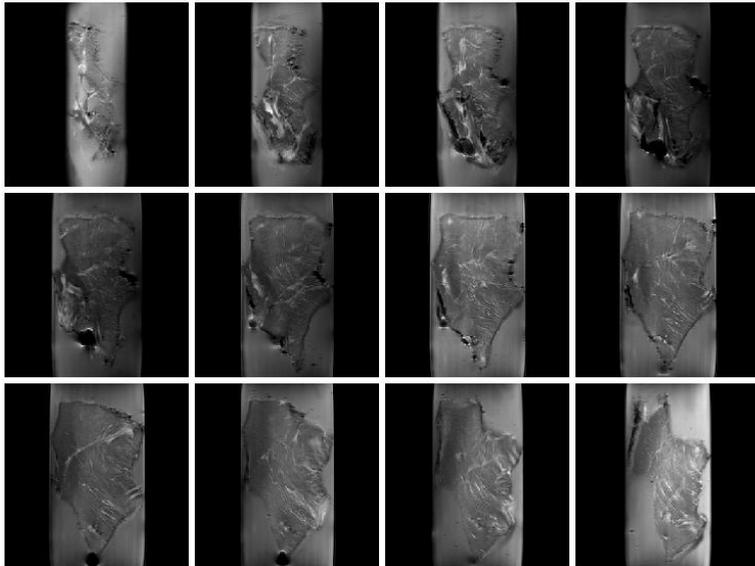


Figura AR 153. Imágenes ponderadas de T2 cerdo crónico 3 remoto 1.

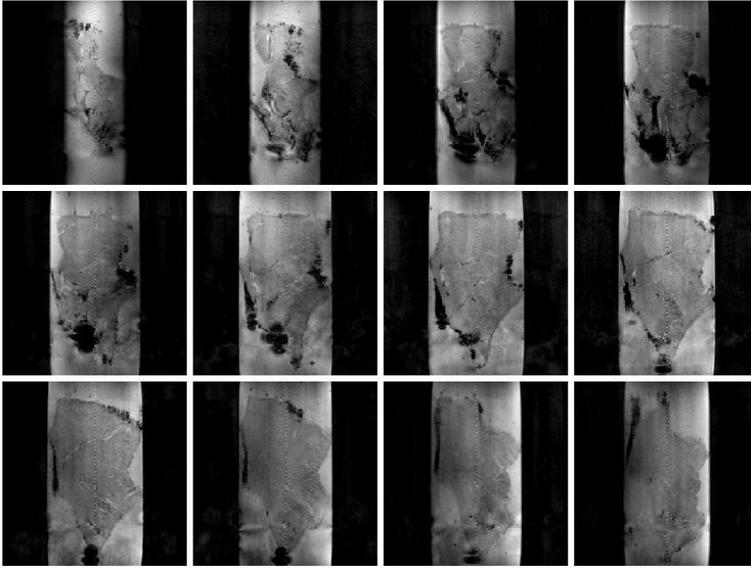


Figura AR 154.. Imágenes ponderadas de T2* cerdo crónico 3 remoto 1.

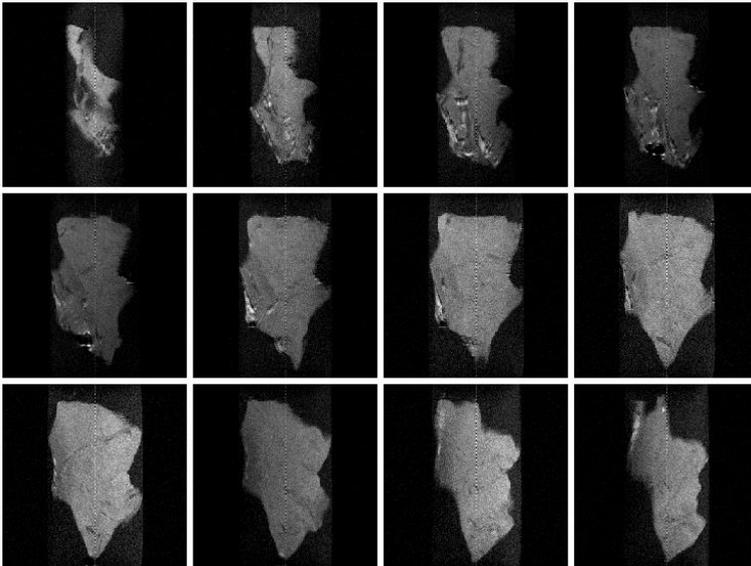


Figura AR 155. Imágenes ponderadas de difusión cerdo crónico 3 remoto 1.

3.3.2. ADYACENTE

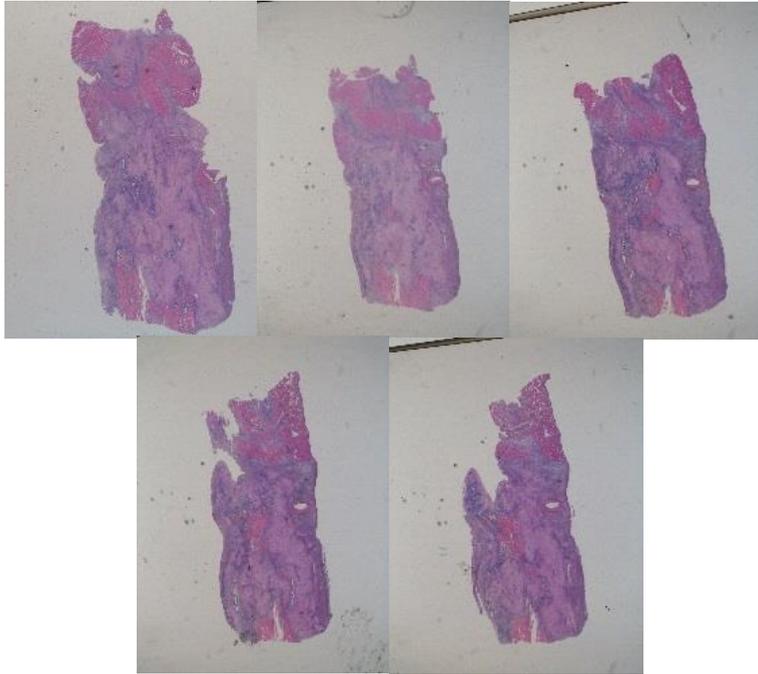


Figura AR 156. Cortes histopatológicos HE cerdo crónico 3 adyacente 1.

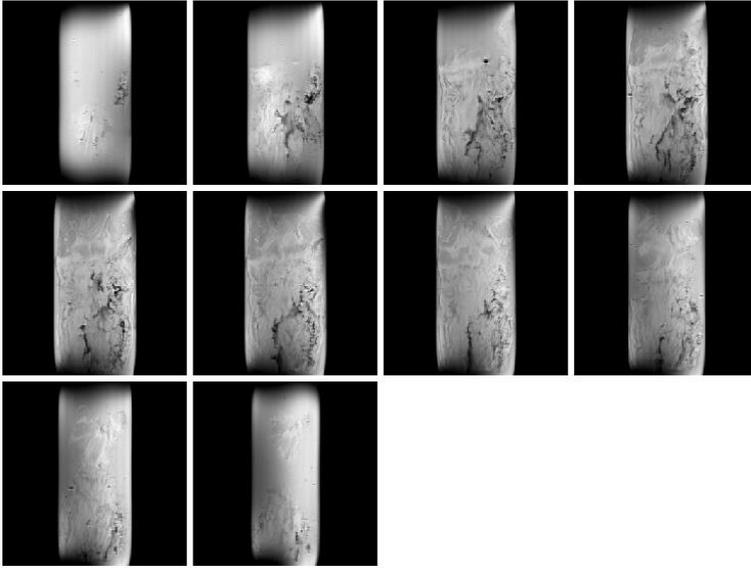


Figura AR 157. Imágenes ponderadas T1 cerdo crónico 3 adyacente 1.

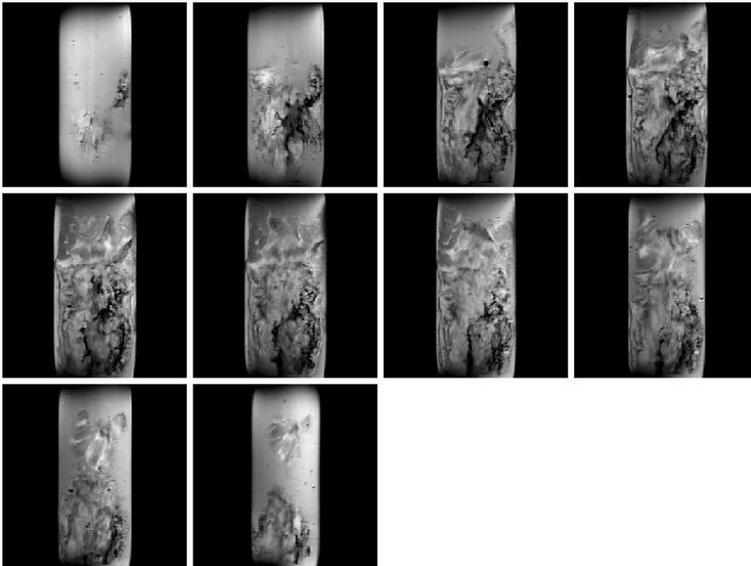


Figura AR 158. Imágenes ponderadas de T2 cerdo crónico 3 adyacente 1.

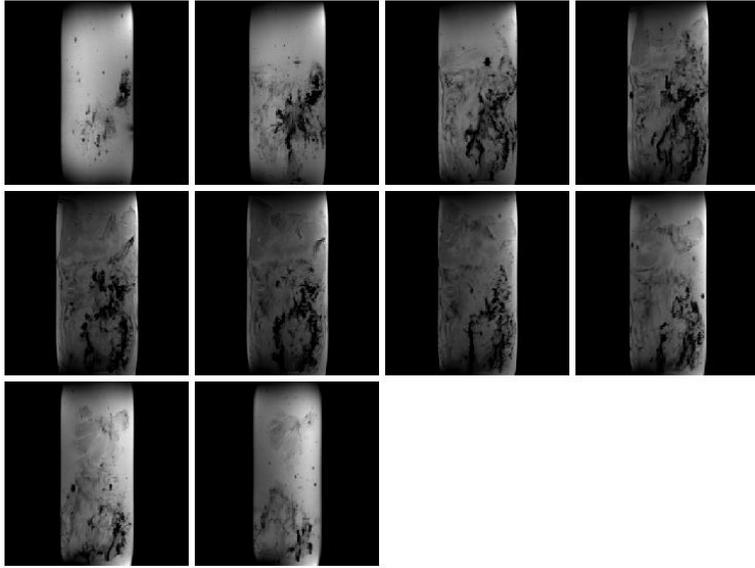


Figura AR 159. Imágenes ponderadas de T2* cerdo crónico 3 adyacente 1.

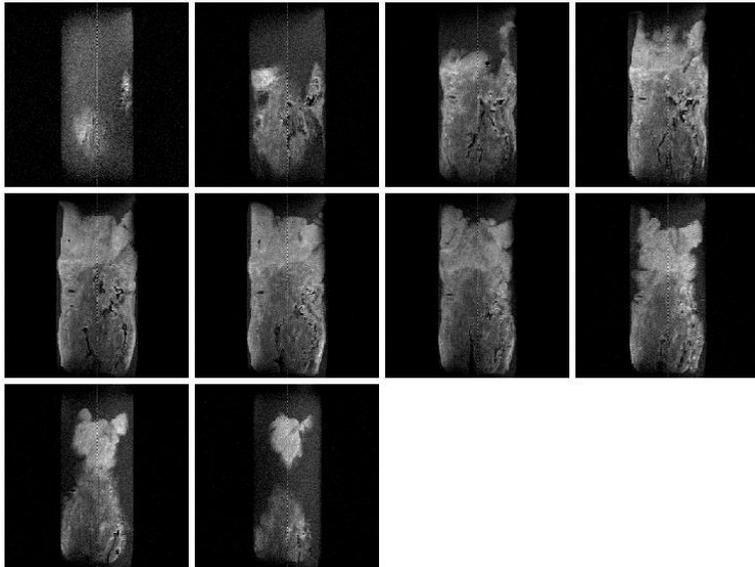


Figura AR 160. Imágenes ponderadas de difusión cerdo crónico 3 adyacente 1.

3.3.3. INFARTADO

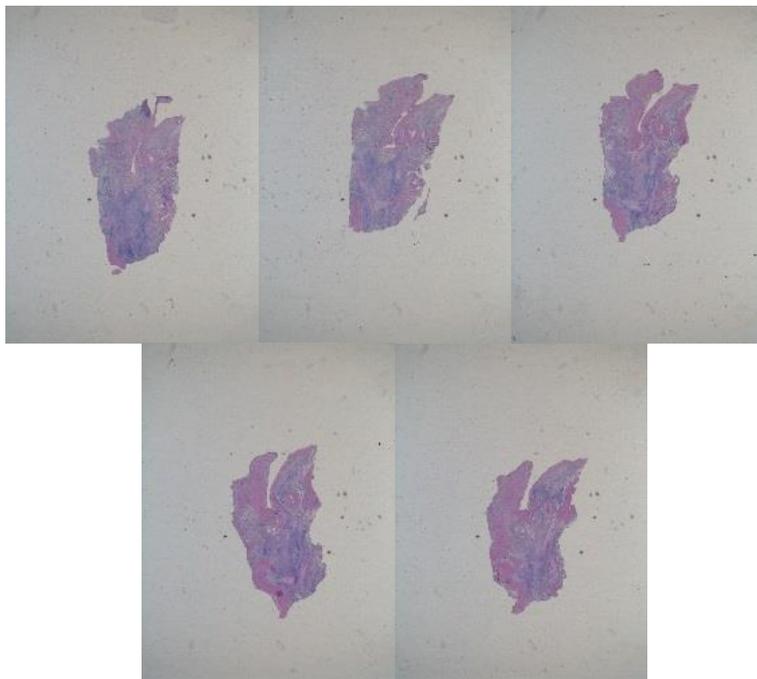


Figura AR 161. Cortes histopatológicos HE cerdo crónico 3 infartado 1.

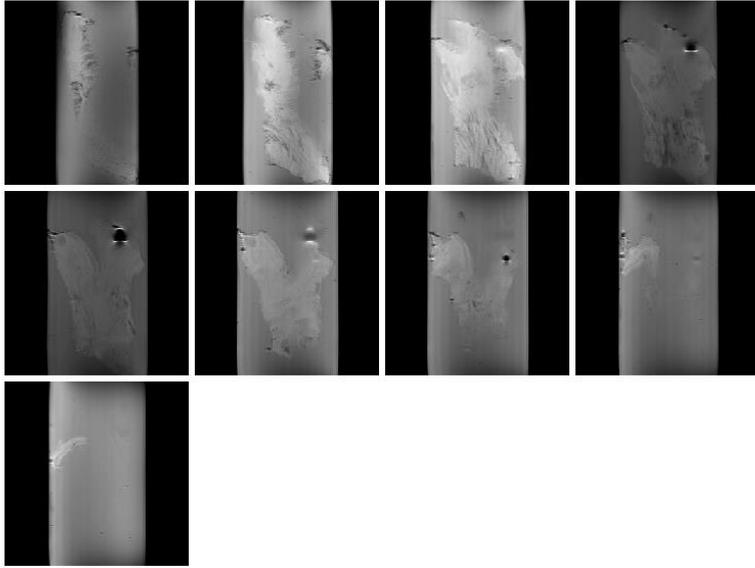


Figura AR 162. Imágenes ponderadas T1 cerdo crónico 3 infartado 1.

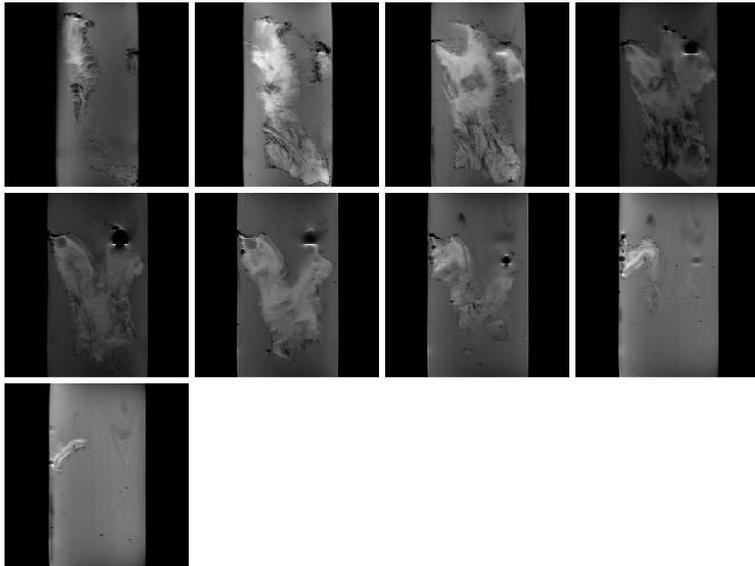


Figura AR 163. Imágenes ponderadas de T2 cerdo crónico 3 infartado 1.

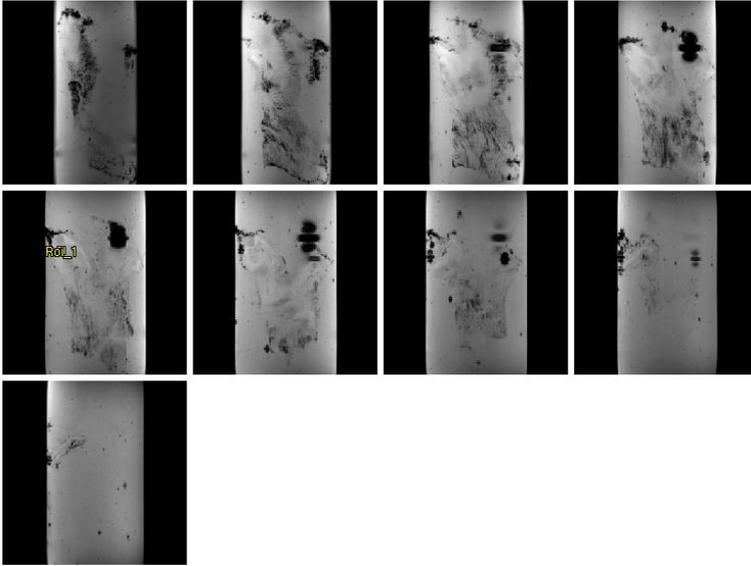


Figura AR 164. Imágenes ponderadas de T2* cerdo crónico 3 infartado 1.

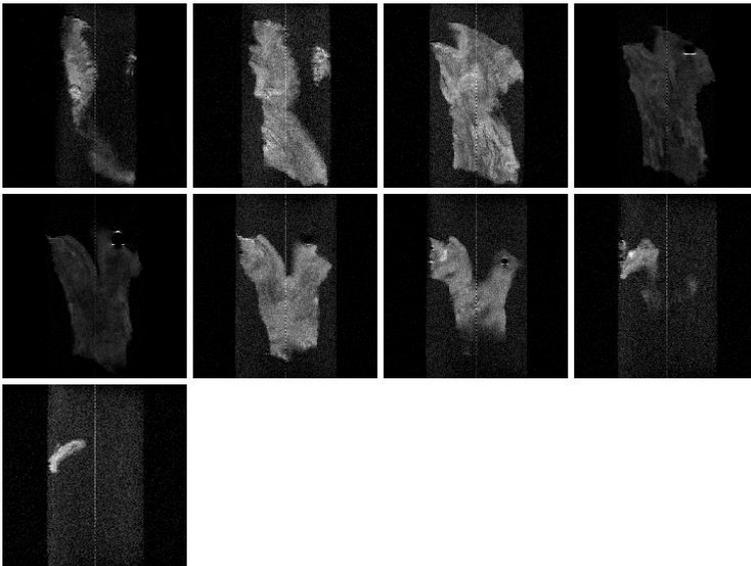


Figura AR 165. Imágenes ponderadas de difusión cerdo crónico 3 infartado 1.

3.4. CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 4 CRÓNICO

3.4.1. REMOTO

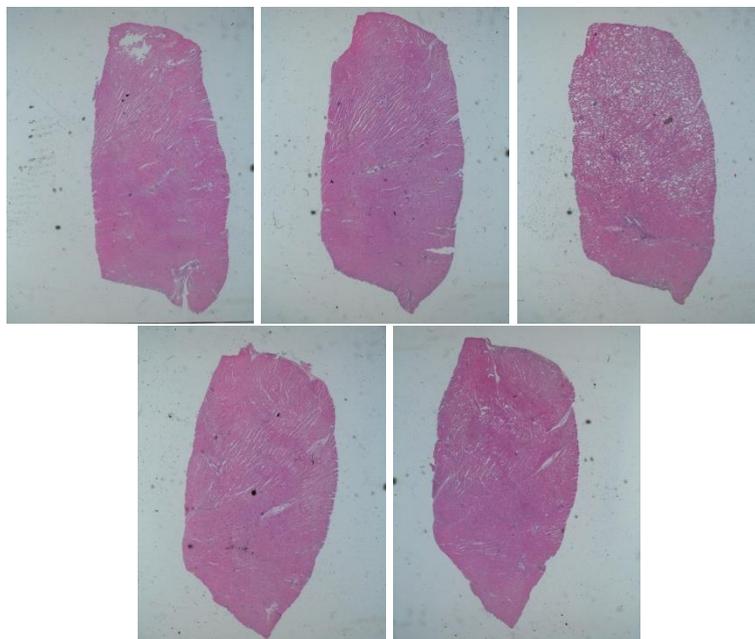


Figura AR 166. Cortes histopatológicos HE cerdo 4 crónico remoto 1.

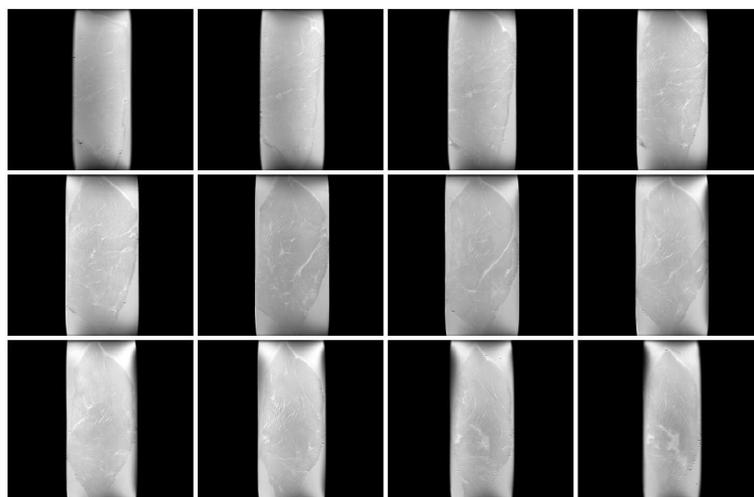


Figura AR 167. Imágenes ponderadas T1 cerdo 4 crónico remoto 1.

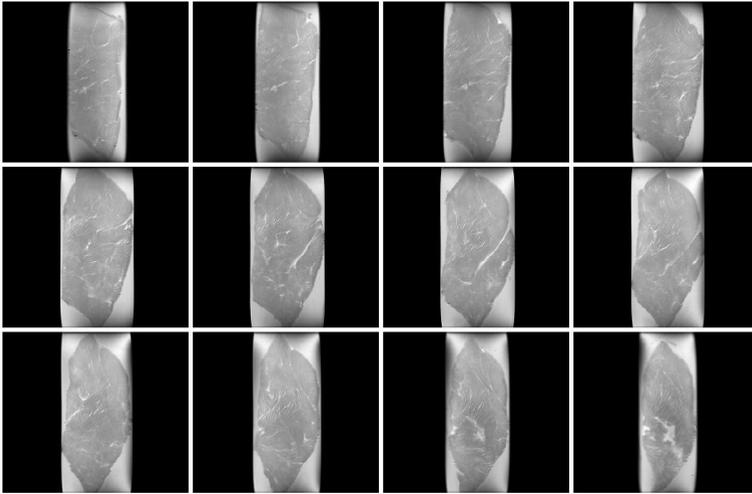


Figura AR 168. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 4 crónico remoto 1.

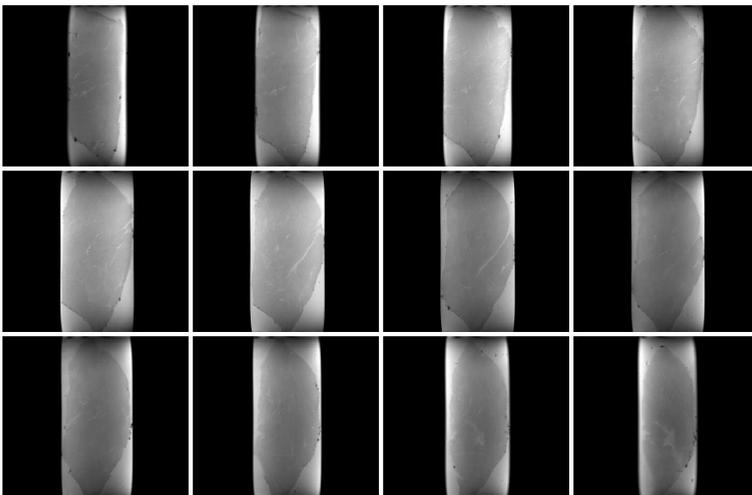


Figura AR 169. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 4 crónico remoto 1.

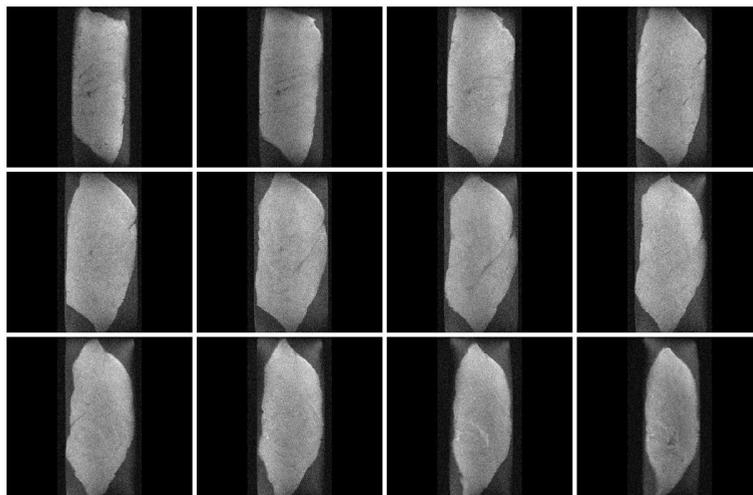


Figura AR 170. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 4 crónico remoto 1.

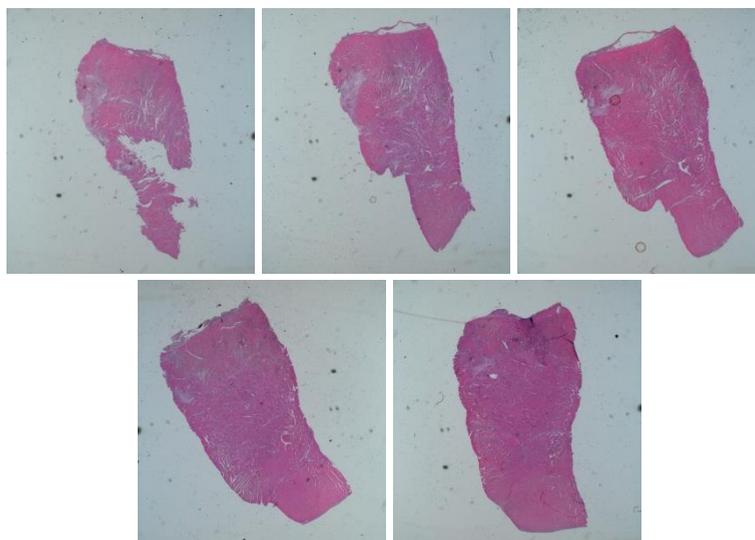


Figura AR 171. Cortes histopatológicos HE. cerdo 4 crónico remoto 2.

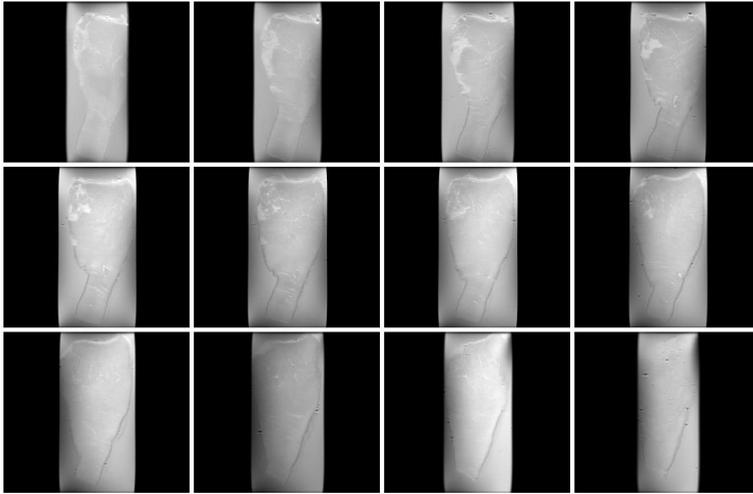


Figura AR 172. Imágenes ponderadas T1 cerdo 4 crónico remoto 2.

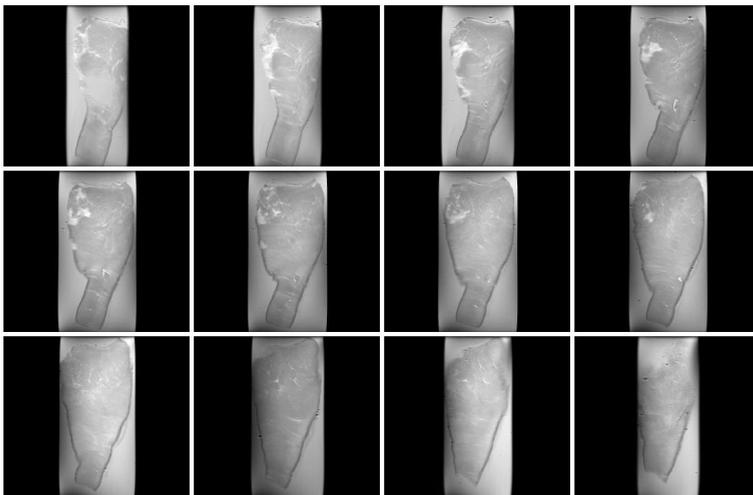


Figura AR 173. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 4 crónico remoto 2.

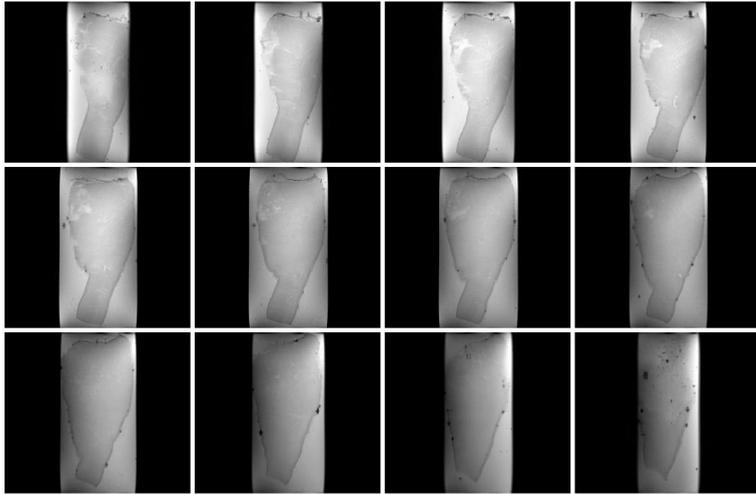


Figura AR 174. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 4 crónico remoto 2.

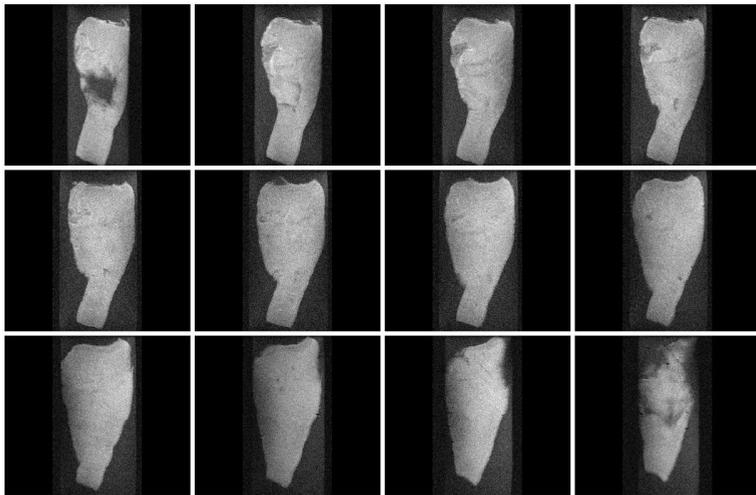


Figura AR 175. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 4 crónico remoto 2.

3.4.2. ADYACENTE

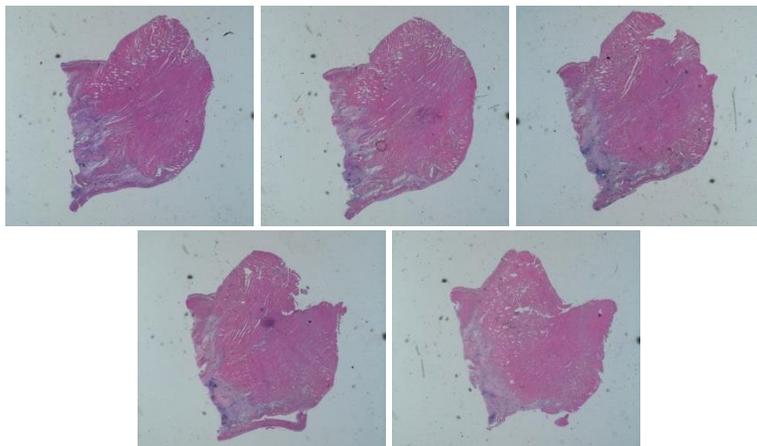


Figura AR 176. Cortes histopatológicos HE cerdo 4 crónico adyacente 1.

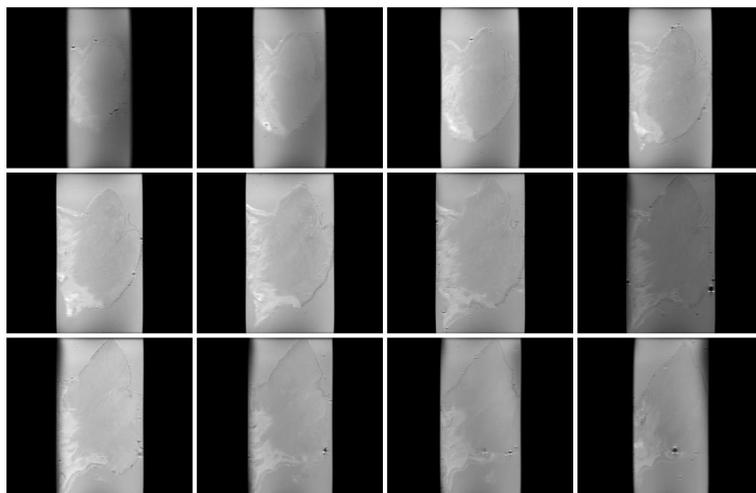


Figura AR 177. Imágenes ponderadas T1 cerdo 4 crónico adyacente 1.

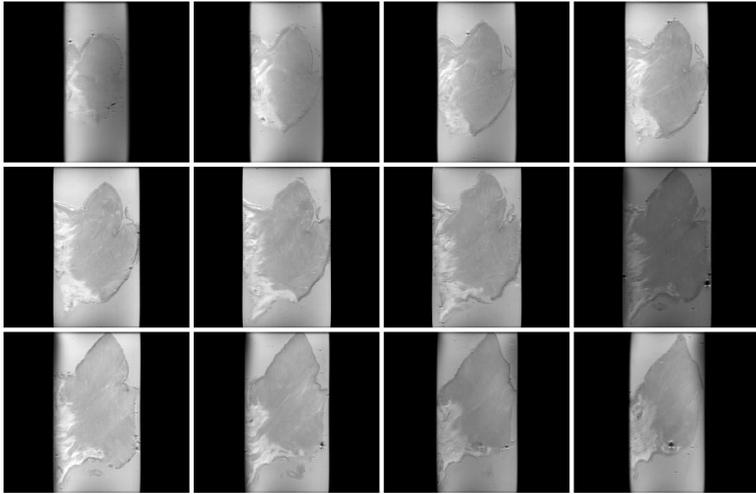


Figura AR 178. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 4 crónico adyacente 1.

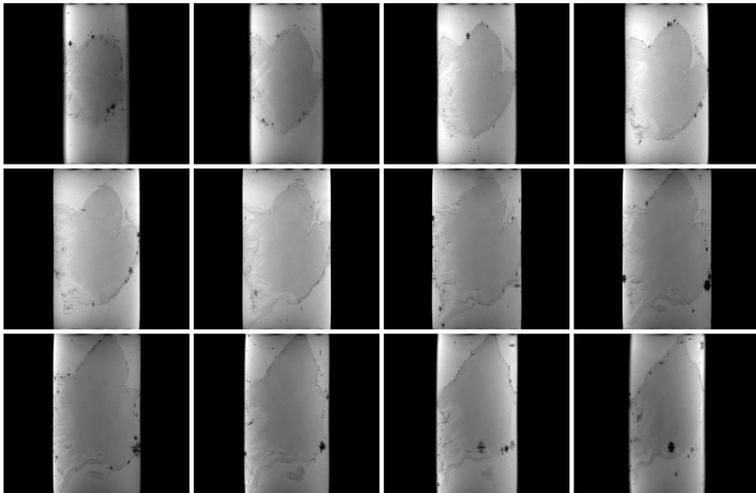


Figura AR 179. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 4 crónico adyacente 1.

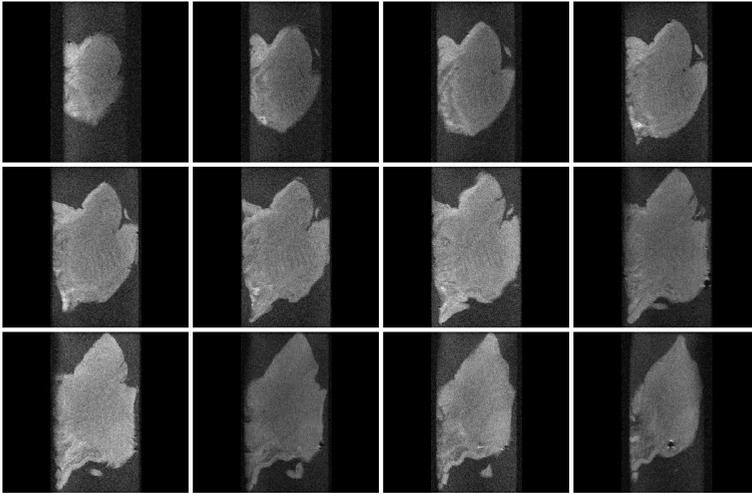


Figura AR 180. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 4 crónico adyacente 1.

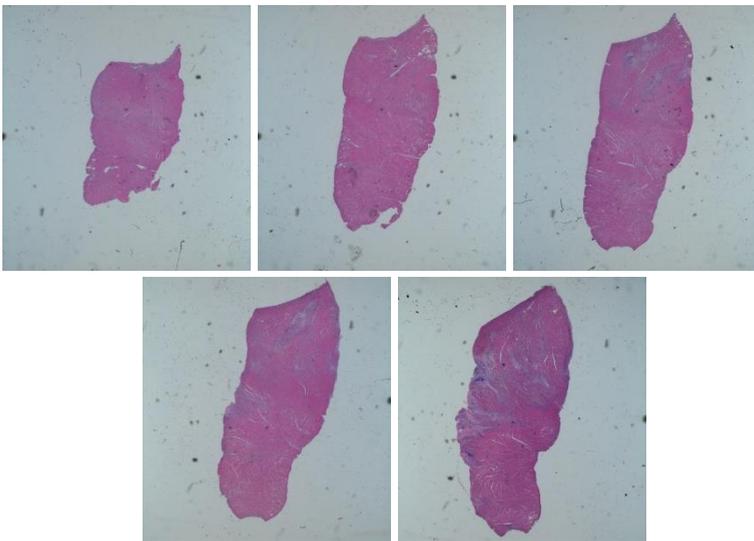


Figura AR 181. Cortes histopatológicos HE cerdo 4 crónico adyacente 2.

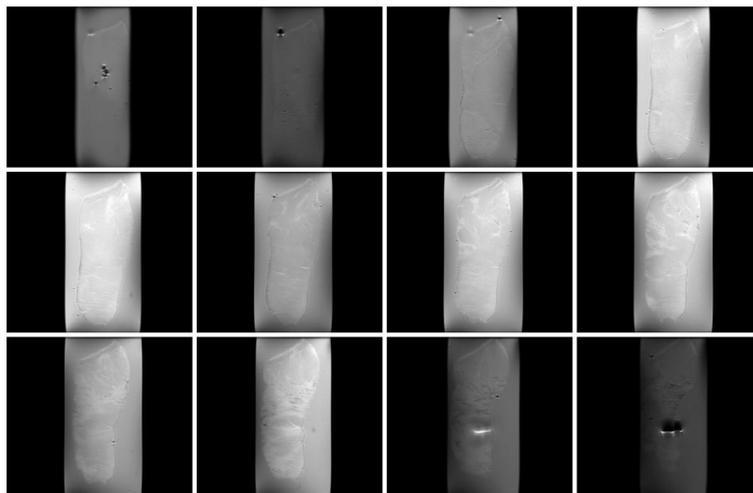


Figura AR 182. Imágenes ponderadas T1 cerdo 4 crónico adyacente 2.

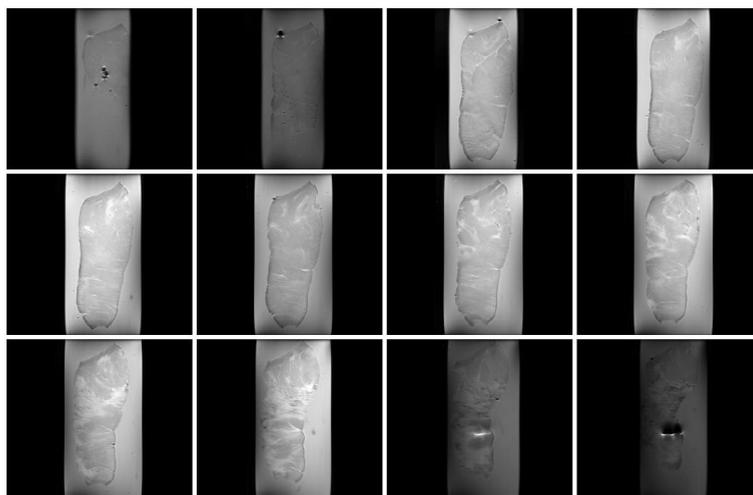


Figura AR 183. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 4 crónico adyacente 2.

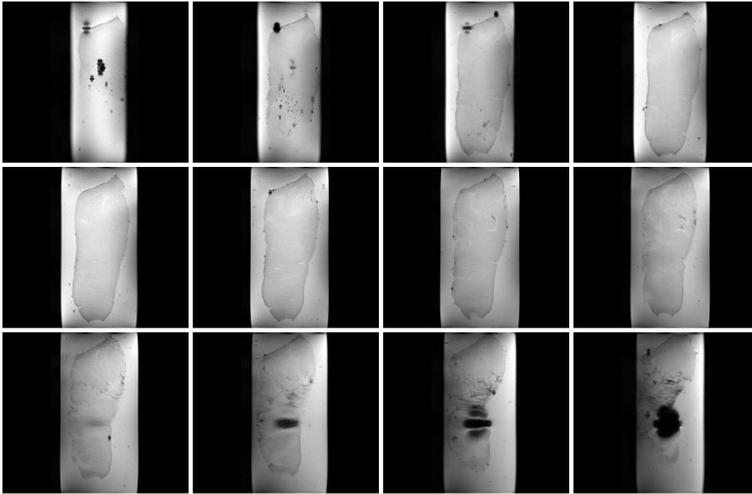


Figura AR 184.. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 4 crónico adyacente 2.

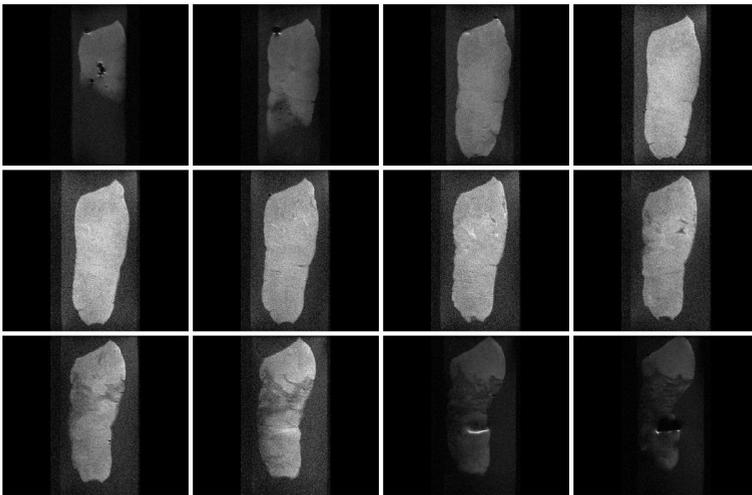


Figura AR 185. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 4 crónico adyacente 2.

3.4.3. INFARTADO

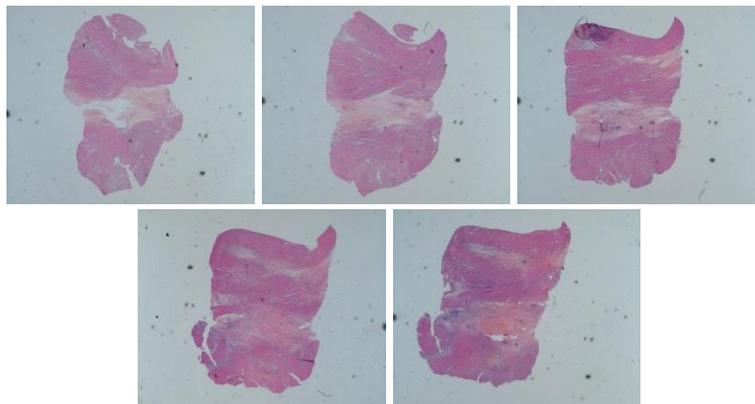


Figura AR 186. Cortes histopatológicos HE cerdo 4 crónico infartado 1.

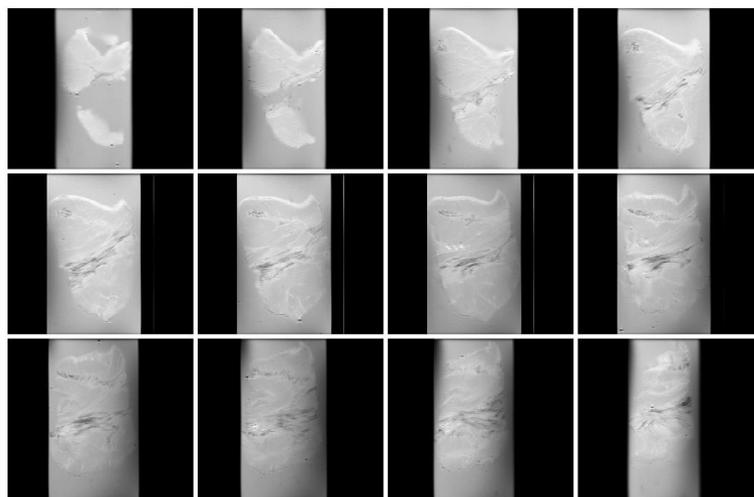


Figura AR 187. Imágenes ponderadas T1 cerdo 4 crónico infartado 1.

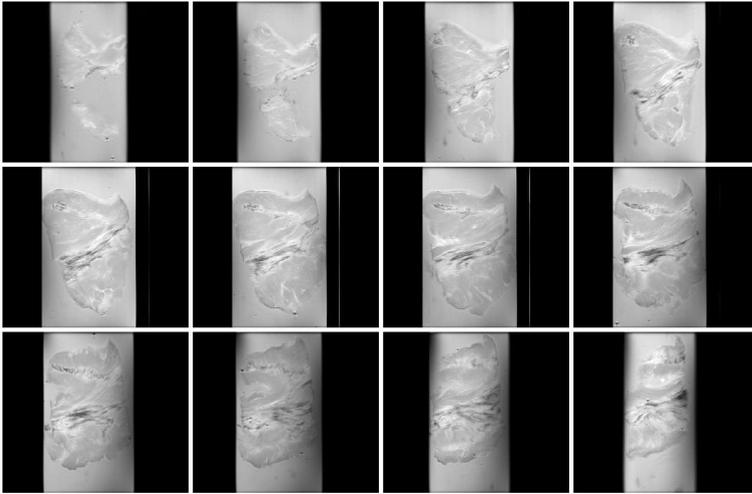


Figura AR 188. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 4 crónico infartado 1.

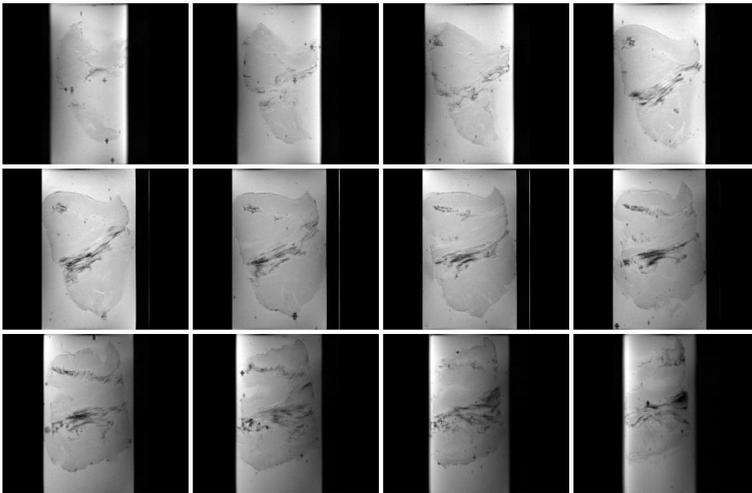


Figura AR 189. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 4 crónico infartado 1.

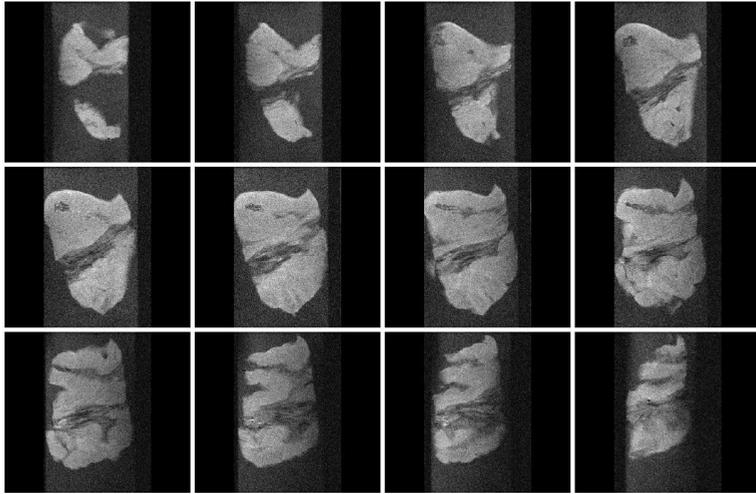


Figura AR 190. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 4 crónico infartado 1.

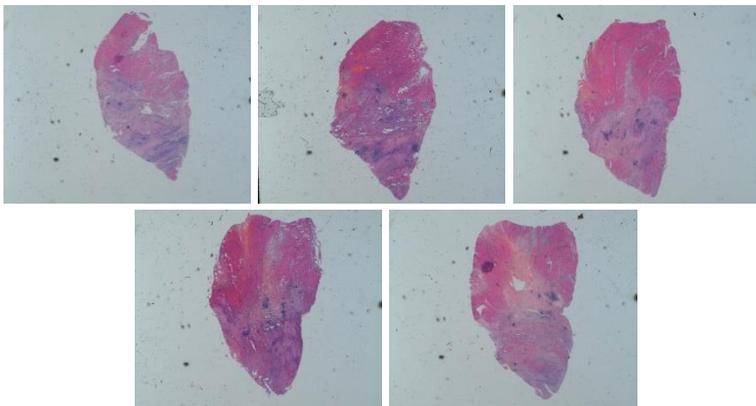


Figura AR 191. Cortes histopatológicos HE cerdo 4 crónico infartado 2.

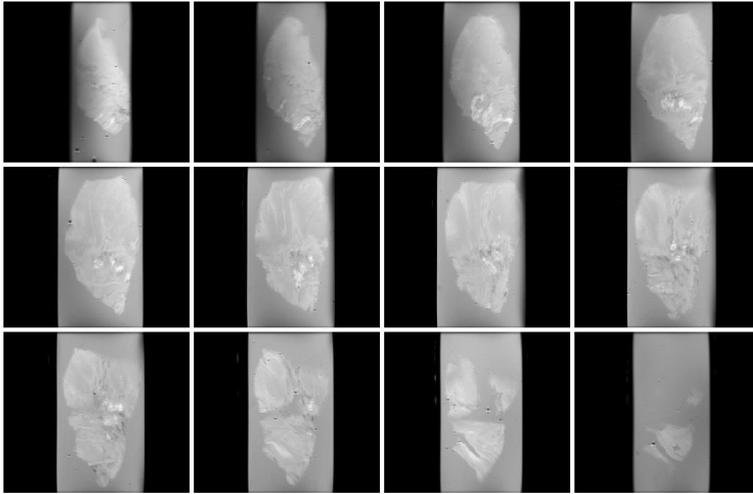


Figura AR 192. Imágenes ponderadas T1 cerdo 4 crónico infartado 2.

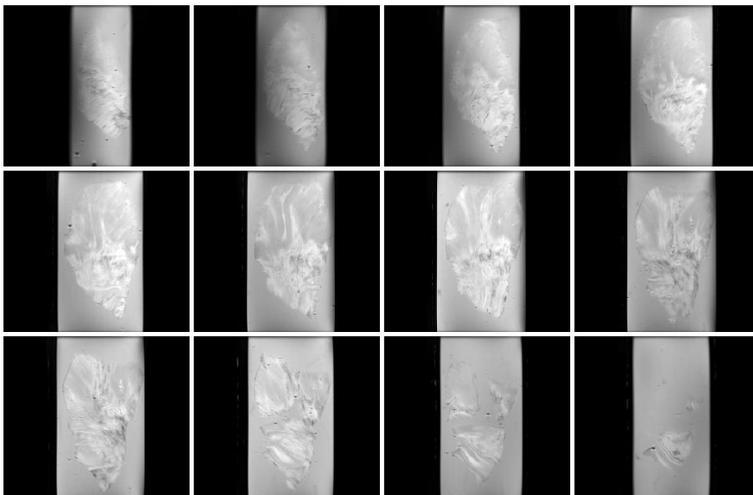


Figura AR 193. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 4 crónico infartado 2.

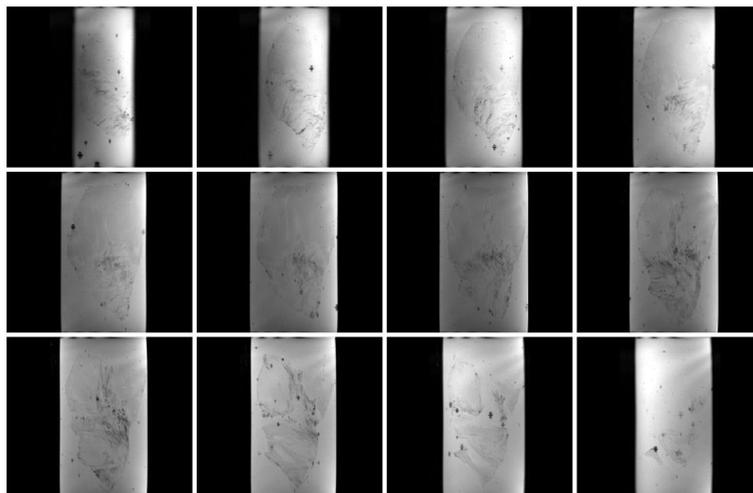


Figura AR 194. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 4 crónico infartado 2.

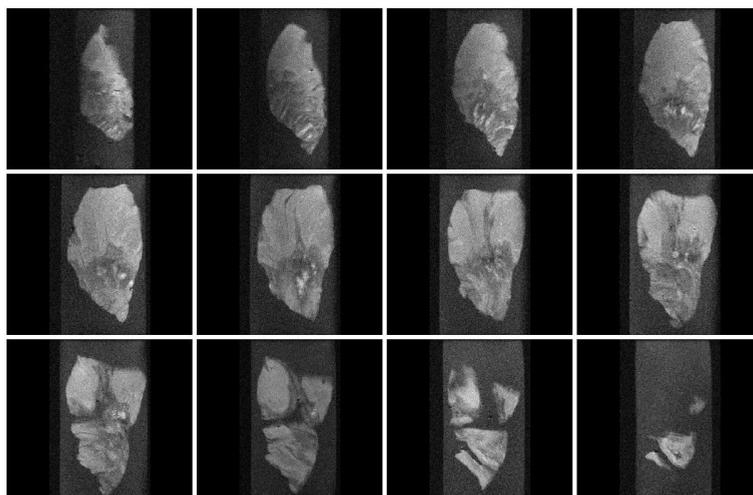


Figura AR 195. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 4 crónico infartado 2.

3.5. CORTES HISTOPATOLÓGICOS E IRM DEL CERDO 5 CRÓNICO

3.5.1. REMOTO

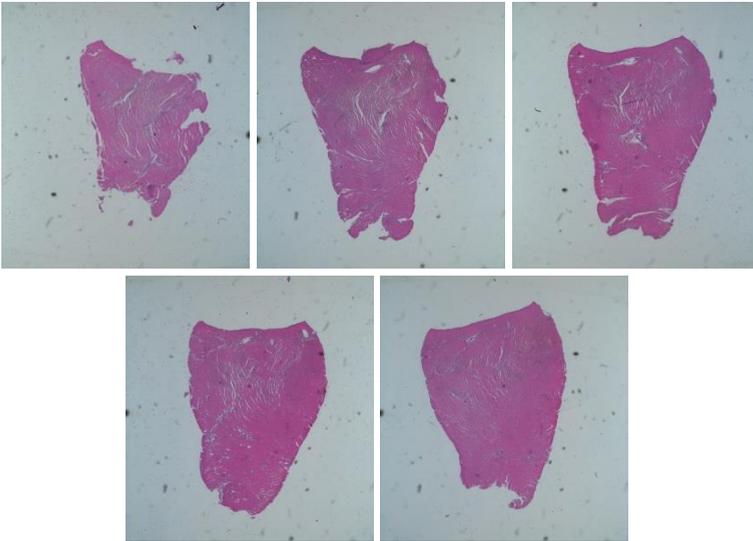


Figura AR 196. Cortes histopatológicos HE cerdo 5 crónico remoto 1.

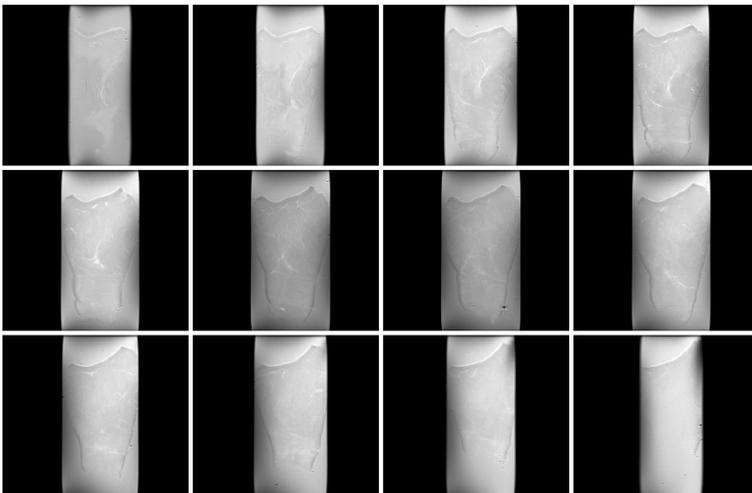


Figura AR 197. Imágenes ponderadas T1 cerdo 5 crónico remoto 1.

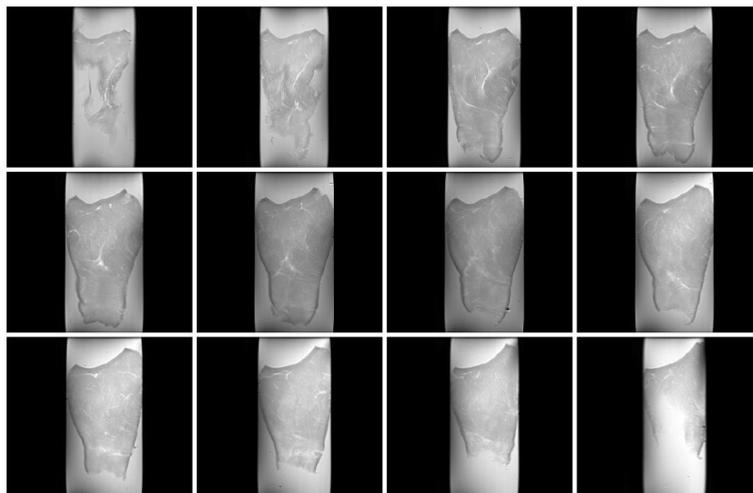


Figura AR 198. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 5 crónico remoto 1.

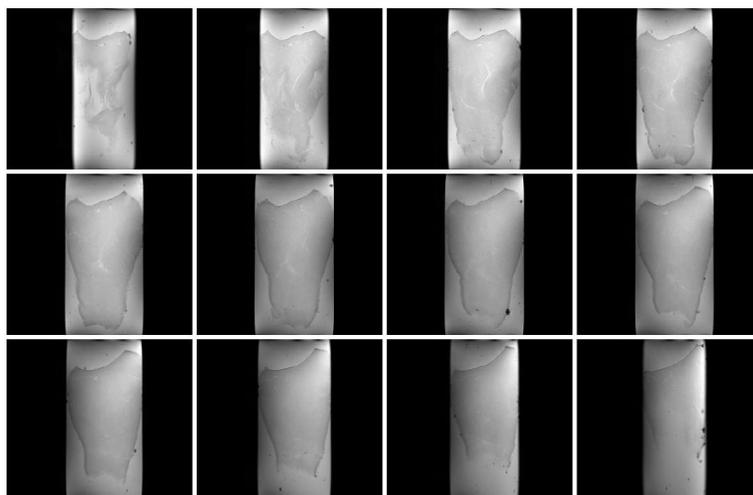


Figura AR 199.. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 5 crónico remoto 1.

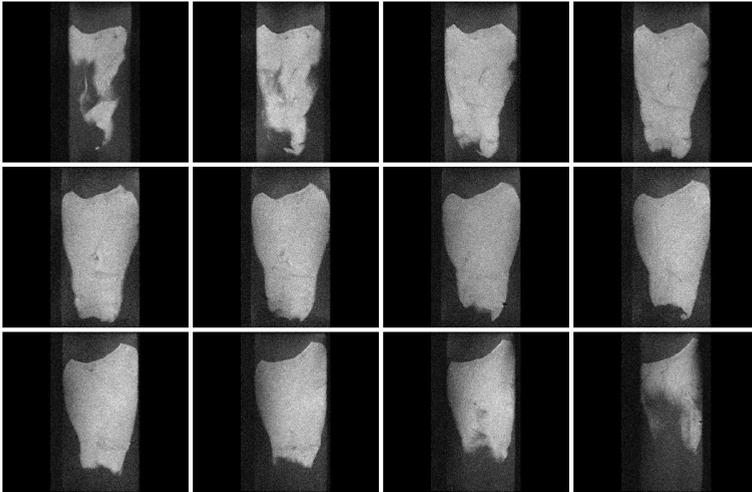


Figura AR 200. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 5 crónico remoto 1.

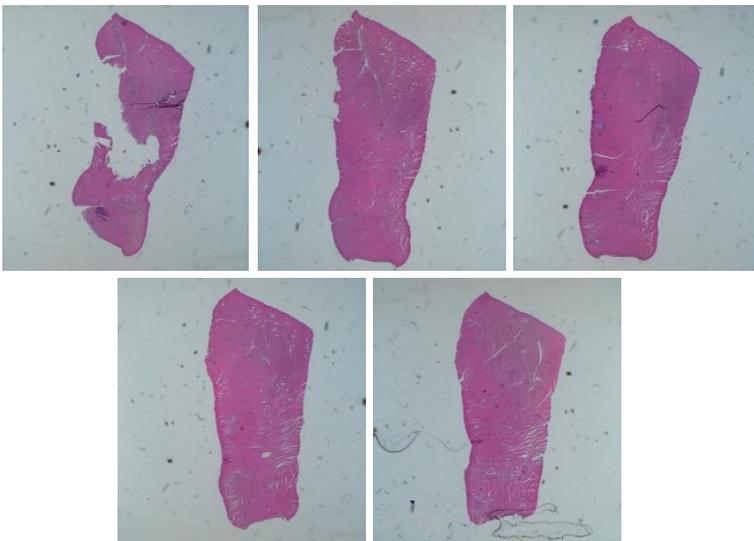


Figura AR 201. Cortes histopatológicos HE cerdo 5 crónico remoto 2.

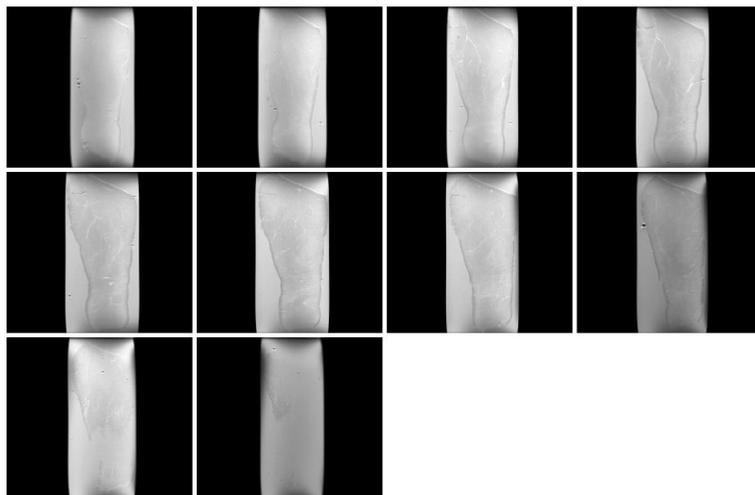


Figura AR 202. Imágenes ponderadas T1 cerdo 5 crónico remoto 2.

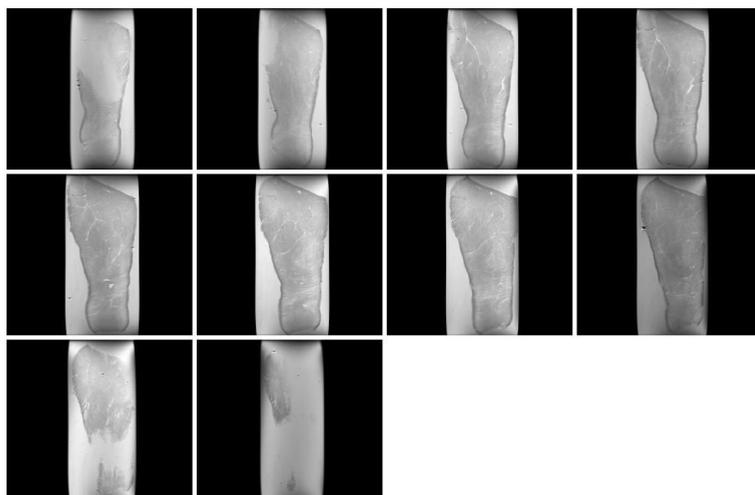


Figura AR 203. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 5 crónico remoto 2.

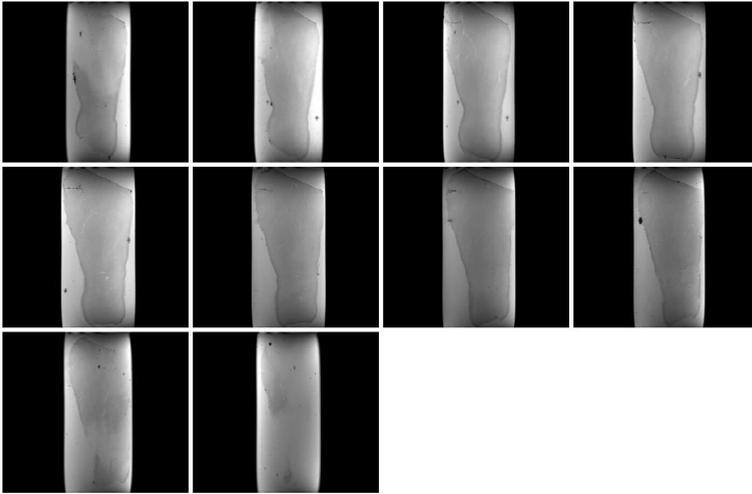


Figura AR 204. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 5 crónico remoto 2.

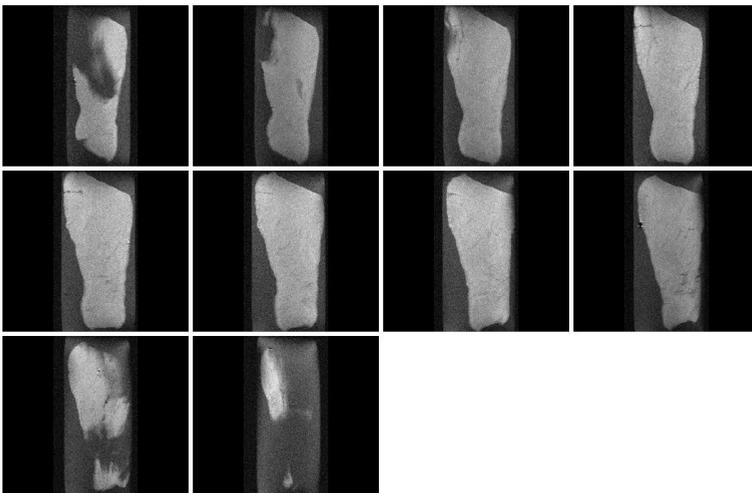


Figura AR 205. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 5 crónico remoto 2.

3.5.2. ADYACENTE

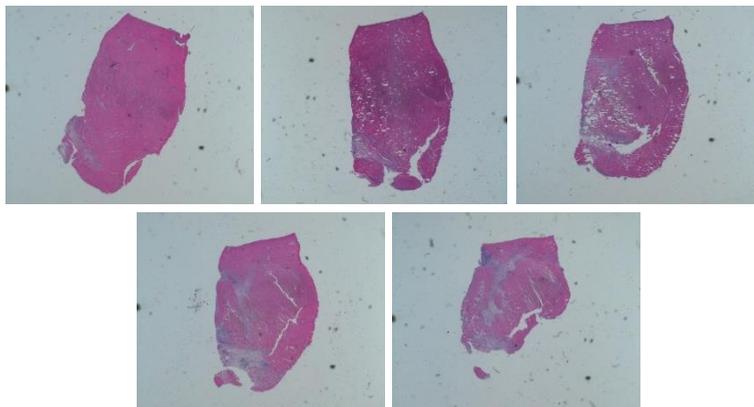


Figura AR 206. Cortes histopatológicos HE cerdo 5 crónico adyacente 1.

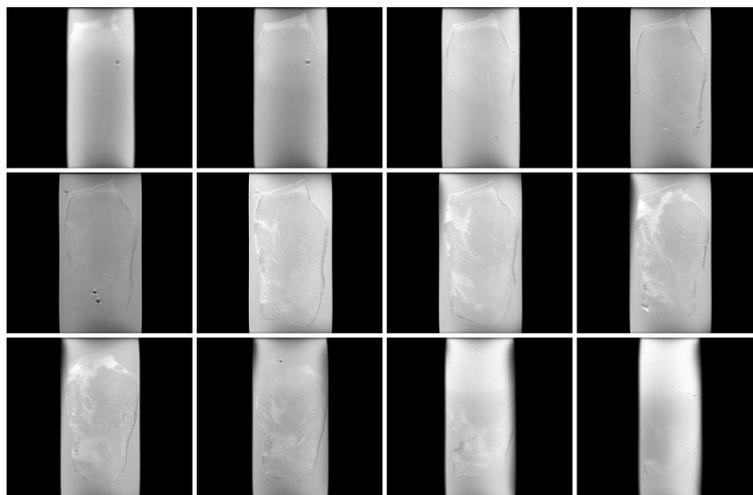


Figura AR 207. Imágenes ponderadas T1 cerdo 5 crónico adyacente 1.

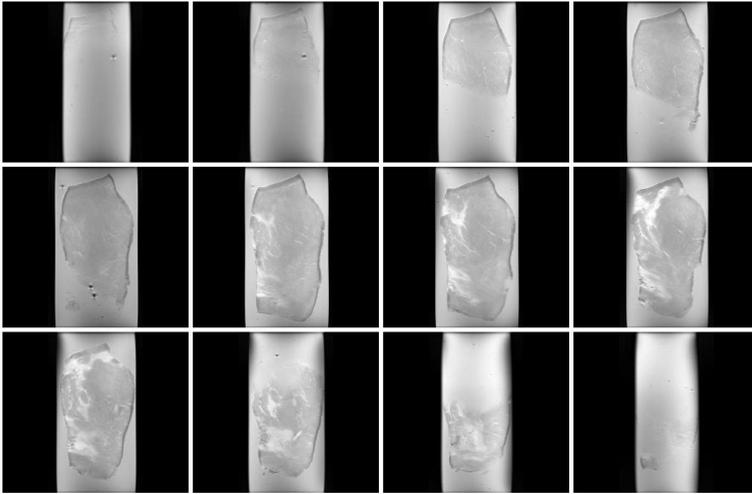


Figura AR 208. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 5 crónico adyacente 1.

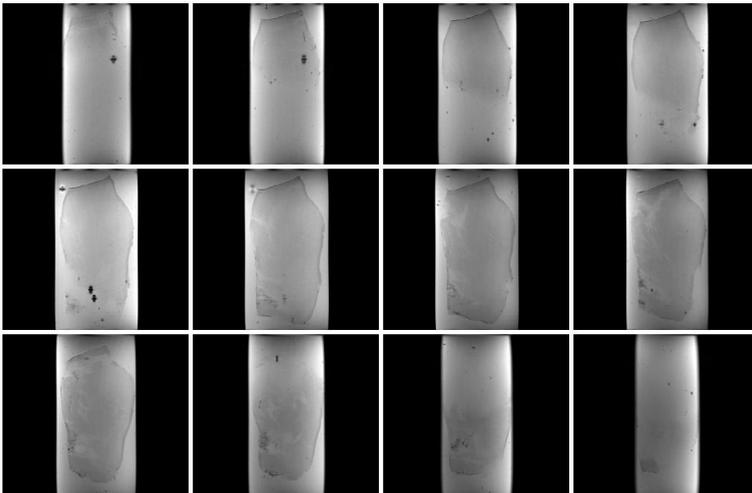


Figura AR 209. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 5 crónico adyacente 1.

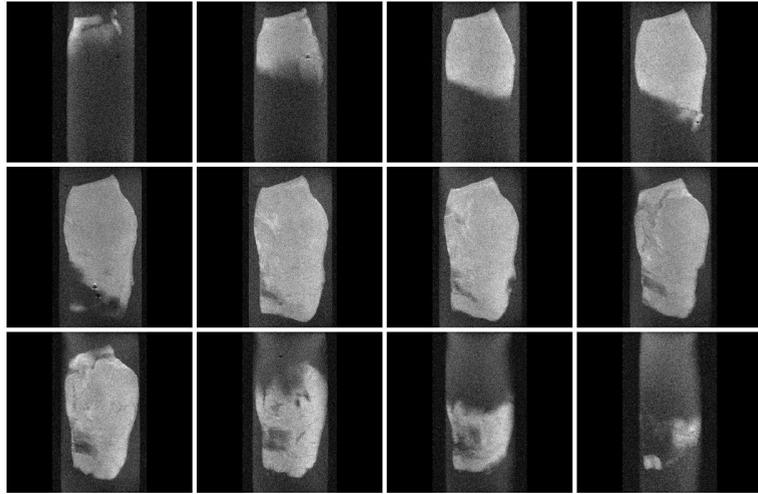


Figura AR 210. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 5 crónico adyacente 1.

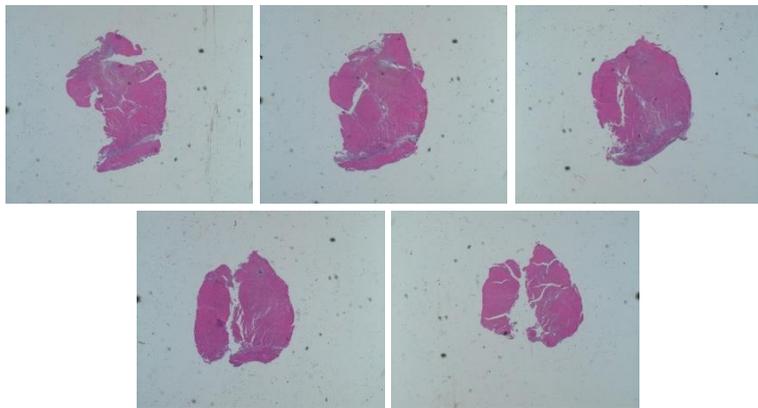


Figura AR 211. Cortes histopatológicos HE cerdo 5 crónico adyacente 2.

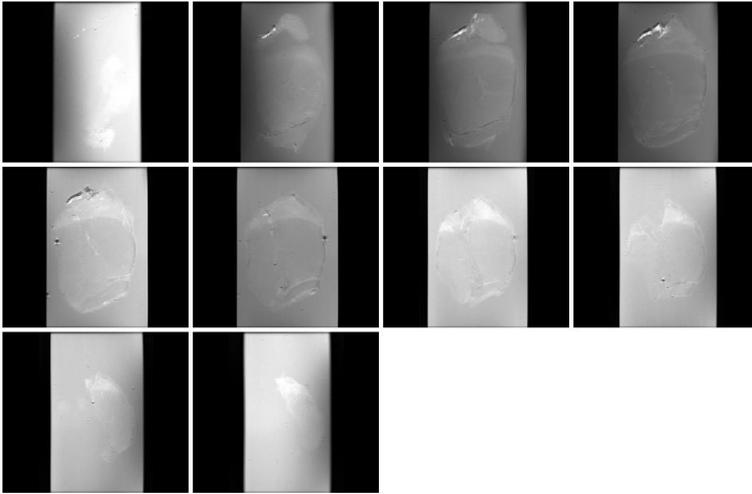


Figura AR 212. Imágenes ponderadas T1 cerdo 5 crónico adyacente 2.

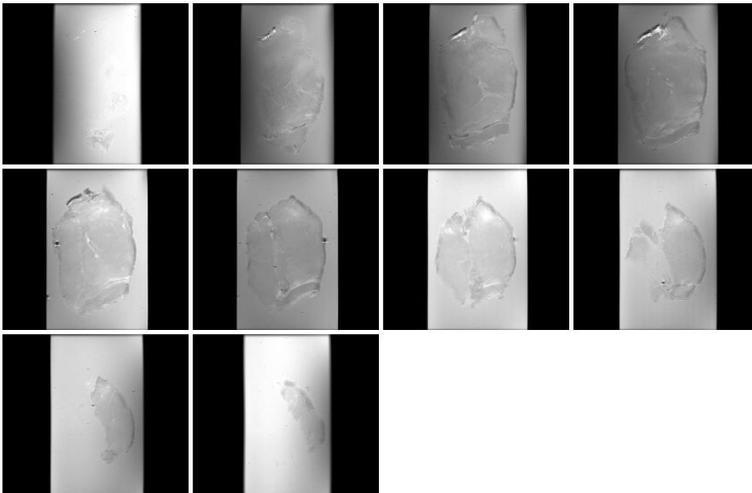


Figura AR 213. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 5 crónico adyacente 2.

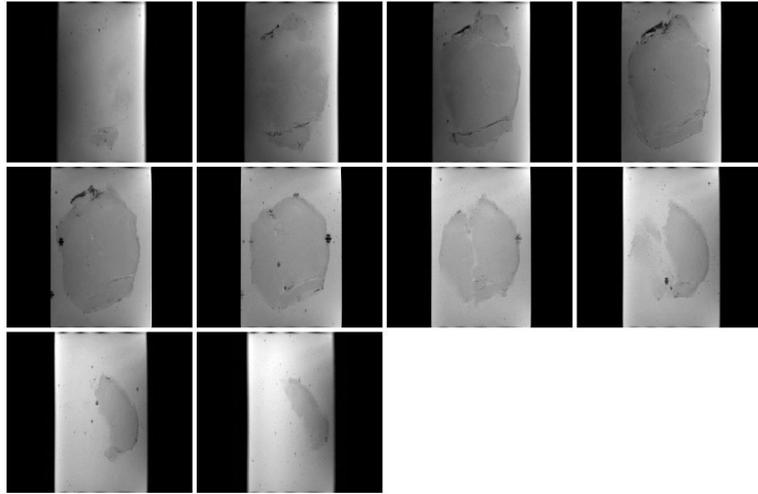


Figura AR 214. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 5 crónico adyacente 2.

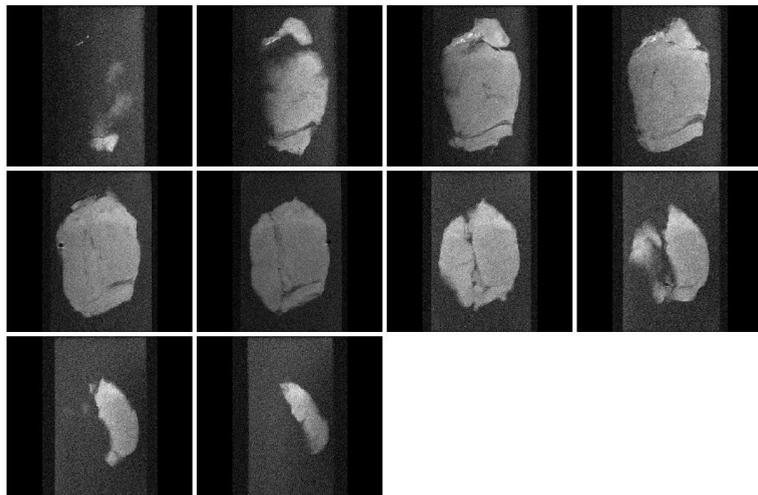


Figura AR 215. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 5 crónico adyacente 2.

3.5.3. INFARTADO

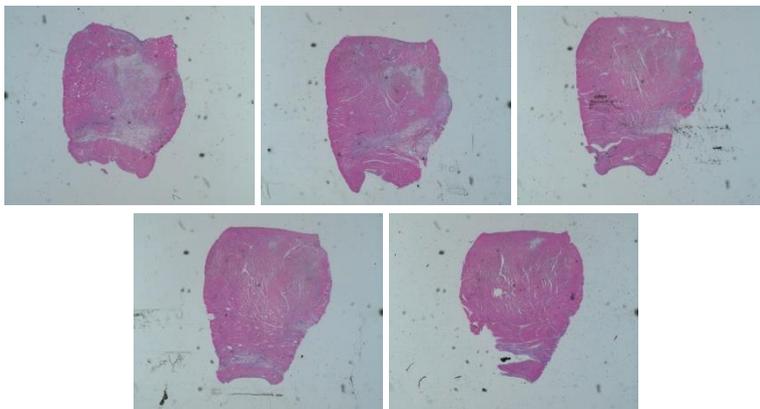


Figura AR 216. Cortes histopatológicos HE cerdo 5 crónico infartado 1.

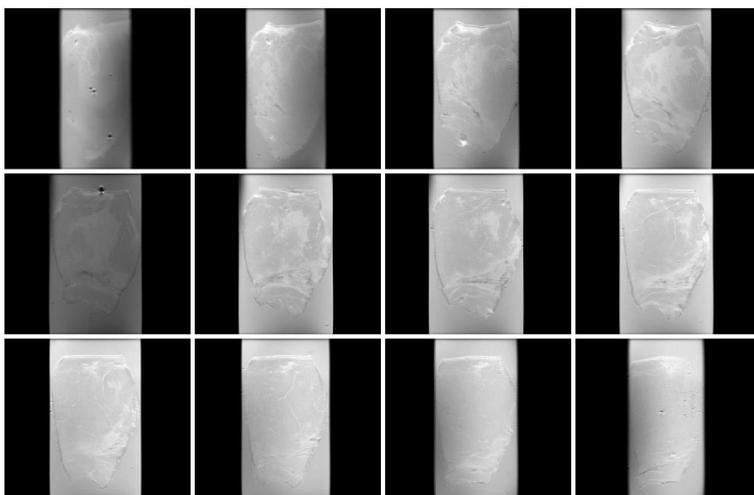


Figura AR 217. Imágenes ponderadas T1 cerdo 5 crónico infartado 1.

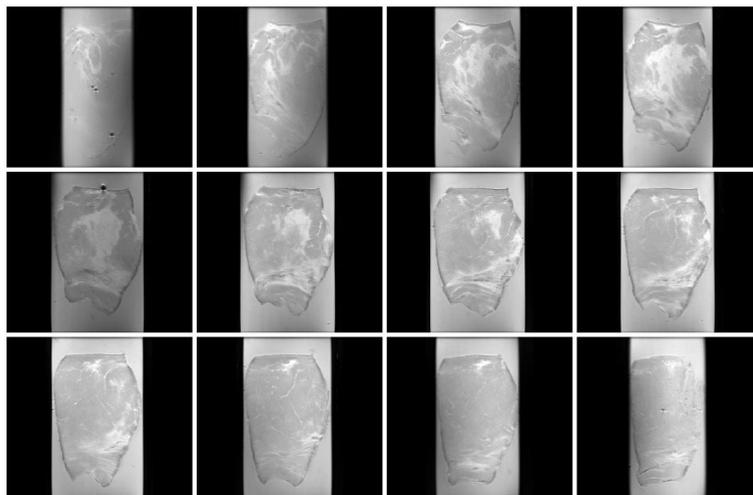


Figura AR 218. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 5 crónico infartado 1.

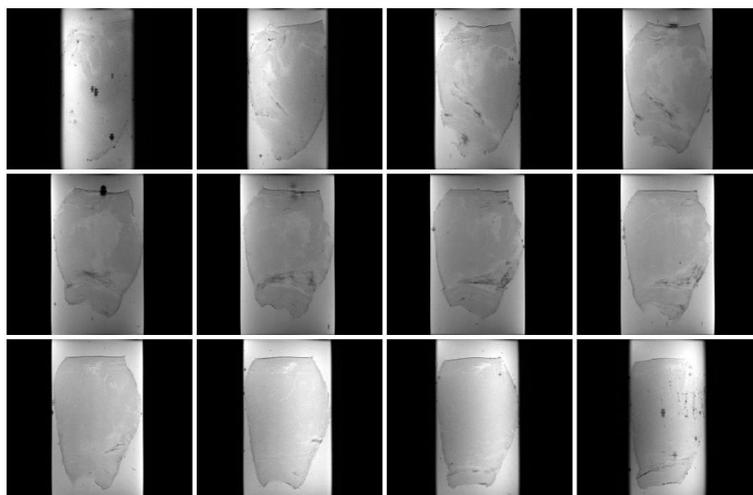


Figura AR 219. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 5 crónico infartado 1.

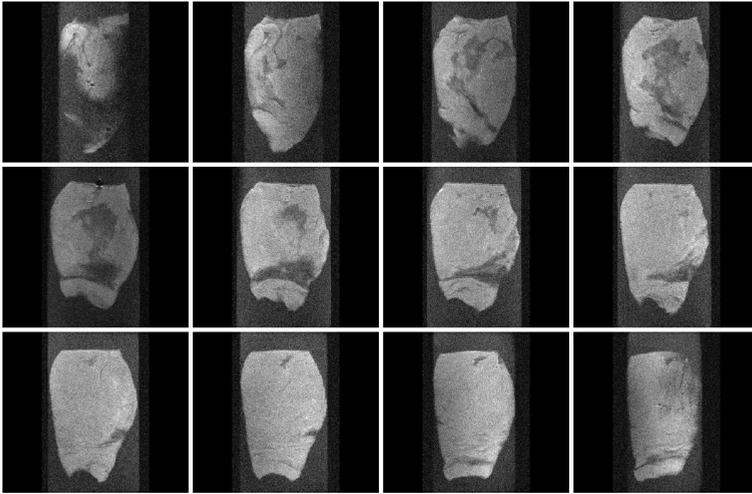


Figura AR 220. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 5 crónico infartado 1.

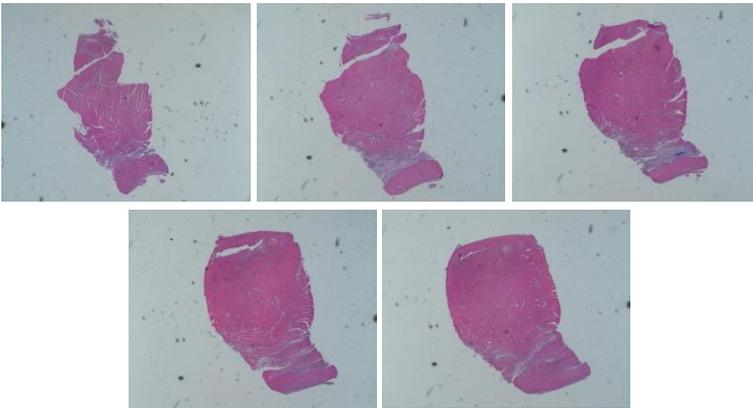


Figura AR 221. Cortes histopatológicos HE cerdo 5 crónico infartado 2.

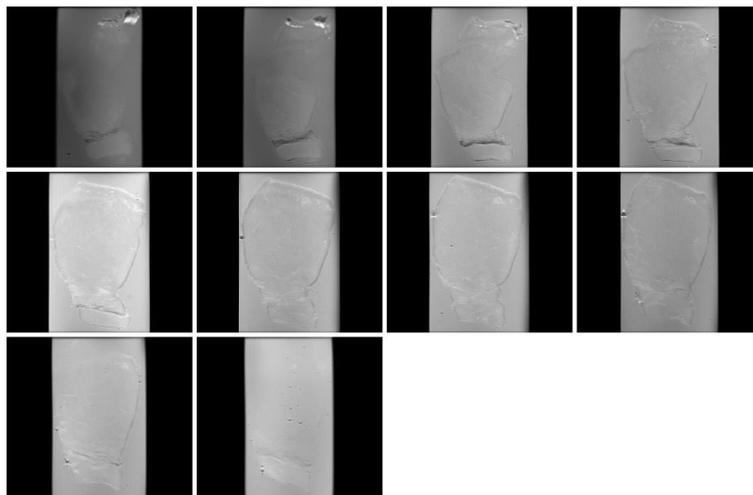


Figura AR 222. Imágenes ponderadas T1 cerdo 5 crónico infartado 2.

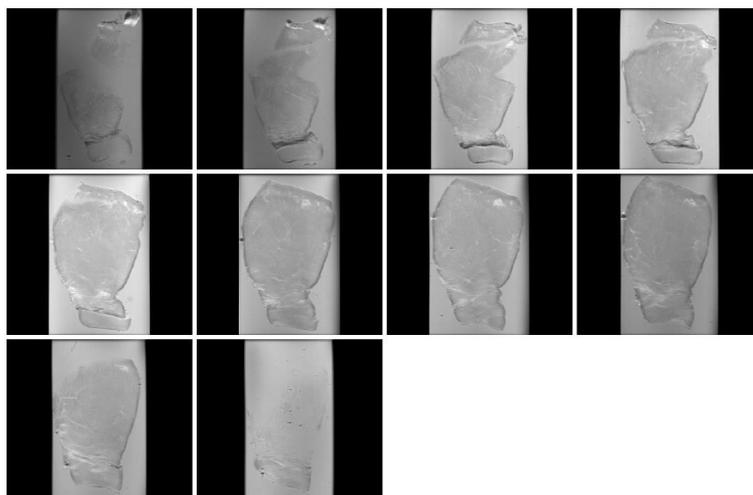


Figura AR 223. Imágenes ponderadas de T2 cerdo 5 crónico infartado 2.

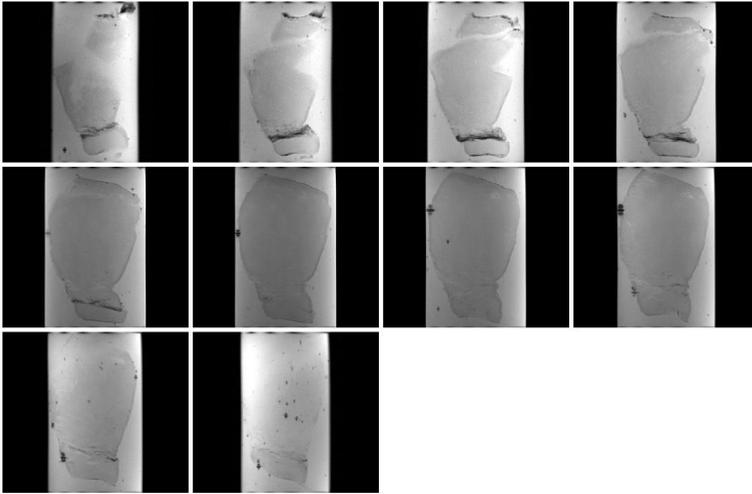


Figura AR 224. Imágenes ponderadas de T2* cerdo 5 crónico infartado 2.

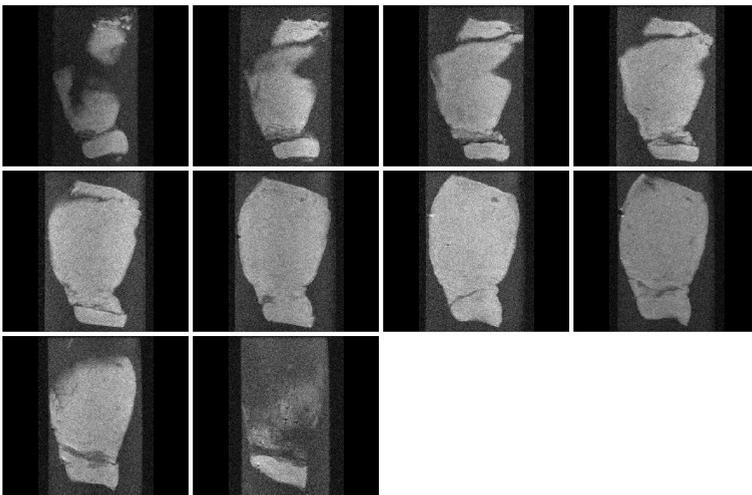


Figura AR 225. Imágenes ponderadas de difusión cerdo 5 crónico infartado 2.