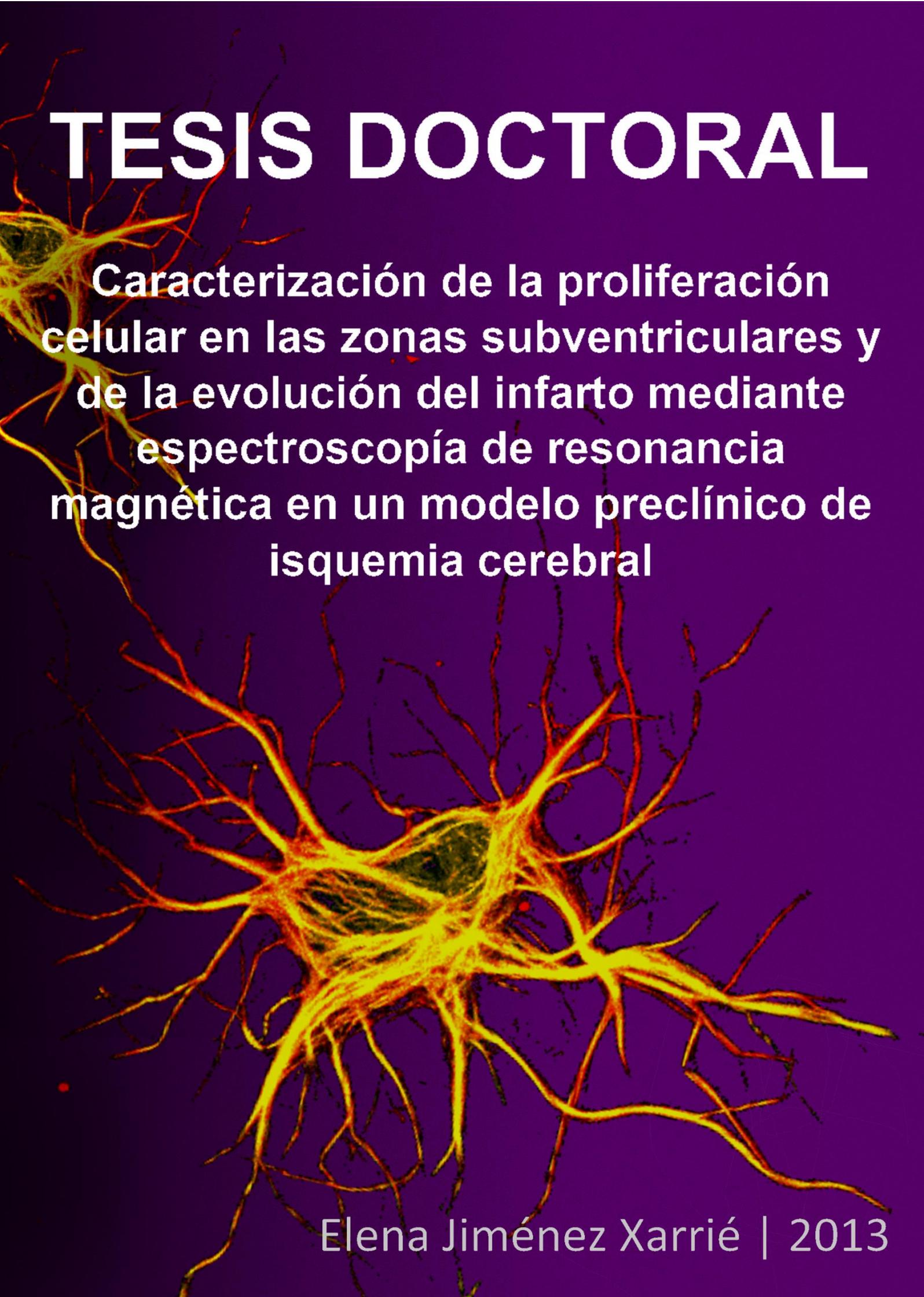


TESIS DOCTORAL



Caracterización de la proliferación celular en las zonas subventriculares y de la evolución del infarto mediante espectroscopía de resonancia magnética en un modelo preclínico de isquemia cerebral

Elena Jiménez Xarrié | 2013



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**Caracterización de la proliferación
celular en las zonas subventriculares y
de la evolución del infarto mediante
espectroscopía de resonancia
magnética en un modelo preclínico de
isquemia cerebral**

Elena Jiménez Xarrié

Septiembre 2013

Tesis doctoral

Memoria presentada por

Elena Jiménez Xarrié

para optar al grado de

Doctor por la Universidad Autònoma de Barcelona.

Tesis adscrita al programa de doctorado en

Bioquímica, Biología Molecular i Biomedicina

del departamento de

Bioquímica i Biología Molecular

de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Tesis co-dirigida por

Dr. Joan Martí Fàbregas, Dr. Carles Arús Caraltó

y Dr. Josep Lluís Martí Vilalta.

Firma de los directores:

Dr. Joan Martí Fàbregas

Dr. Carles Arús Caraltó

Dr. Josep Lluís Martí Vilalta

Firma de la doctoranda:

Elena Jiménez Xarrié

Cerdanyola del Vallès, 9 de septiembre de 2013

Al meu avi,
que sense tenir el títol,
va ser el primer biòleg
que vaig conèixer.

*“Nunca te entregues ni te apartes,
junto al camino nunca digas,
no puedo más y aquí me quedo.”*

Palabras para Julia (J.A. Goytisolo)

AGRADECIMIENTOS

Aquesta memòria de tesi té l'objectiu de recollir la part corresponent als resultats científics i són els que ocupen el 99,8% del volum de la tesi. Objectivament, la part dels agraïments serà significativament més curta. Subjectivament, no hi hauria pàgines suficients per expressar tot el que cadascú de vosaltres m'ha aportat en aquest temps i que ja forma part de mi, però intentaré fer un breu resum.

Agraïr....

Als meus directors de tesi, l'acompanyament durant aquest període, que un sap quan comença però ni on ni quan acaba.

-Al Dr. Joan Martí i el Dr. Josep Lluís Martí Vilalta per donar-me la meua primera oportunitat en el món científic (que no és poc), haver apostat per començar una línia d'investigació bàsica i així haver-me permès formar part de l'Unitat d'Ictus de Sant Pau. Al Dr. Joan Martí, especialment, gràcies per endinsar-me en el món de l'ictus fins aleshores desconegut per mi (*focusing*), la confiança dipositada en mi fins que mica en mica anés guanyant la meua pròpia *self-confidence*, per saber transmetre la seva energia científica contagiosa (*passion*) i, no menys important, per predicar amb l'exemple de que la ciència és una carrera de fons que suposa un gran esforç i determinació (*discipline*).

- Al Prof. Carles Arús, per haver acceptat la col·laboració en aquest projecte sobre Ictus i, per tant, donar-me la oportunitat d'unir-me al seu grup sense el qual aquesta tesi no hagués estat ni remotament possible. La seva direcció pacient, els seus coneixements i totes les idees aportades al projecte eren, a cada moment, el millor full de ruta que ens ha permès arribar fins aquí.

Agraïr també el Seguiment de la Comissió de Seguiment:

- Ana Paula, moltes gràcies per *seguir* de tan a prop de la tesi i també a mi tot aquest temps. Per les hores de reunions i correccions que m'has fet i que indubtablement sempre han sumat.

- Raquel Delgado, por *seguir* de cerca mis pasos y yo poder ver igualmente los tuyos, que son muchos!.

- Elena Serrano, por su *seguimiento* desde Sant Pau y por estar siempre dispuesta a colaborar en todo lo posible.

A mis compañeras de Sant Pau, Rebeca y Lavinia, porque aunque no nos hayamos visto a diario siempre os he sentido muy cerca. Por los ánimos, por los desayunos, por los congresos... y porque yo he tardado más en escribir una tesis que todas vosotras en ser madres!!. Ahora empieza verdaderamente una nueva etapa *together*.

A mis compañeras del GABRMN, al cual me siento una afortunada tanto a nivel científico pero sobretodo a nivel personal de haber llegado. Trabajar con vosotras ha sido la "parte más fácil" de todo el proceso.

- A Myriam, por su COLABORACIÓN más allá de lo que humanamente significa esta palabra. Si las tesis pudieran tener co-autores tu estarías en esta también, porque hay personas que tienen capacidad de hacer un *refocusing*, cambiar el rumbo de los acontecimientos y hacer que las cosas buenas empiecen a suceder y contigo fue así. Si no fuera por ti, no habría tenido que pronunciar en los congresos "*High Resolution Magic Angle Spinning*" (ahora tengo la lengua más ágil). Y más allá del laboratorio, por tu amistad que valoro por encima de todo.

- A Milena, mi primera mentora en el GABRMN, por llamarme cada vez que bajabas al Biospec, por asistir a mis reuniones, por compartir las alegrías y las penas... y porque tu amistad que me ha llevado a ver el mundo con otros ojos.

- A Teresa, por ser el comodín que ayuda a que salgan todas las jugadas, y porque aunque tu no seas consciente, eres de las personas más valientes que conozco, y porque tu amistad me ha regalado un montón de momentos maravillosos.

- A Magda, por tantas horas de "reflexión" *in and out the university* y el apoyo que me has dado siempre y porque contigo siempre es todo más divertido.

- A Juana, por las horas de mesa compartidas ya sean en el laboratorio (con un ordenador) o fuera (con alguna que otra cenilla). .

- A Marga, a Alina y a Sandra, la informática al poder, el grupo IBB, sus *softwares* desarrollados son el pan nuestro de cada día (estamos vendidas a los ordenadores) y además (muy de agradecer) también tienen soluciones para *back ups*, licencias de campus varias, las impresoras que no se instalan...y en general, la lucha contra la rebelión de las máquinas.

- Al David, jo ja et considero GABRMN també, jo de gran vull ser com tu.

- A Núria, a Laura y a Victor, que llegaron para quedarse, y que han traído nuevos aires, nuevas historias, nuevos proyectos y con ello te hacen sentir que a ti ya te toca ir terminando la tesis, cosa que también es de agradecer (sino...). Sois un gran fichaje!

También a toda la gente que he conocido a través vuestro y hemos pasado grandes momentos: Luis, Yayo, Toni, Adriana, Adolfo, Irenita, a Juan Carlos y Eli, a Jordi, a Emanuel, a Jonathan, a John, Enrique y Paula, Gio y Geovanny.

Al grupo de Valencia, el tercer pilar del proyecto, gracias Sara por facilitar tanto nuestro trabajo a distancia y por todo lo que he aprendido con vosotros de la neurogénesis. Haber podido estar en el laboratorio del Dr. Jose Manuel García Verdugo es un privilegio para mi.

A Silvia Lope por poner a punto todos los protocolos de imagen y espectroscopía de la tesis y además por ser lo que vendría siendo una profesional "como la copa de un pino". Entrar en el mundo de la RMN con alguien que siempre tiene una explicación/solución a cualquier duda (o sea, problema) es un bálsamo para cualquier doctorando o al menos para mí. También al resto de compañeros del SeRMN: Miquel, Eva, Pau, Albert, Laura... porque son innumerables horas compartiendo el frío polar del servicio.

A toda la gente del estabulario que han estado pendientes de la llamada, e-mail, favor... incluidos vísperas y festivos. El *in vivo* no perdona, pero ellos siempre tienen la mejor disposición: Ignacio, Cruz, Rafi, Joan, Juan Carlos... que han hecho todo lo que estaba en sus manos para facilitarnos el trabajo.

Al Santi, al Salva, a l'Elena i la Magda... de tota bioquímica, probablement la gent que ha portat més tesis a les seves mans... uns grans aliats.

A la Dra. Ana Planas y Fernando Perez Asensio por ayudarme en mis inicios con el modelo experimental. Desde el principio han sido una referencia de lo que me quedaba y aún me queda por aprender.

A RETICS-RENEVAS, el proyecto de Redes, el cual culminó en 2012 por ser un proyecto ilusionante. Más allá de mi financiación personal, considero un verdadero lujo para mi formación, el haber compartido cursos y reuniones pero también *coffee breaks* y cenas con los GRANDES del Ictus en este país..

A la farmacéutica Ferrer Internacional S.A que fue la responsable de la financiación de este proyecto. Su apoyo ha sido fundamental no solo para nuestro grupo sino para muchos otros en el campo del ictus a nivel de España.

I com no, m'agradaria agrair a la meva gent, els que han viscut l'abans, el durant i espero, si tot va bé, que el després de la tesis:

A les meves amigues biotecs i masterlife, la nostra relació ja comença a tenir més d'una dècada i espero que el que va unir la carrera no ho separin els postdocs a l'estranger. Bromes a part Marta, Nuri, Merx, Mireia, Forn, Ester, Xarlo i Ruth i també als nous membres que s'incorporen al "clan" com l'Arlet, sou imprescindibles per mi.

A Juan Antonio, tu apoyo no conoce distancias ni fechas en el calendario. Que sepas ya de lactato y lípidos móviles solo implica lo cerca que has vivido toda la tesis con todos los pros y contras que esto pueda implicar. A ti y a mí siempre nos quedará la UAB-Ciudad de Vacaciones, pero valió la pena porque era necesario...

I finalment, als que sempre han estat allà, des del principi i amb el seu suport fan que tot sigui possible: a la meva família, molt en especial als meus pares i germana i també al Víctor (responsable de la portada d'aquesta tesis). Diuen que la família és l'únic que no pots escollir en aquesta vida. Jo tinc la sort de que si hagués hagut de triar, no ho hauria fet millor.

A todos vosotros espero que sintáis que esta tesis también es un poco vuestra porque yo sí considero que formáis parte de ella.

Moltes gràcies!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ECUACIONES

ABREVIATURAS

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	CONCEPTO DE ICTUS, EPIDEMIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN	1
1.2.	FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS	3
1.3.	MECANISMOS MOLECULARES DEL ICTUS	5
1.3.1.	<i>Fallo en el metabolismo energético</i>	7
1.3.2.	<i>Despolarización anóxica</i>	8
1.3.3.	<i>Excitotoxicidad</i>	9
1.3.4.	<i>Estrés oxidativo</i>	10
1.3.5.	<i>La respuesta inmunitaria</i>	11
1.3.6.	<i>Tipos de muerte celular</i>	13
1.4.	LA NEURORREPARACIÓN CEREBRAL	15
1.4.1.	<i>La neurogénesis</i>	16
1.5.	TERAPIA CON CITICOLINA	23
1.6.	BASES FUNDAMENTALES DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA	26
1.6.1.	<i>Las propiedades físicas del átomo</i>	26
1.6.2.	<i>Imagen de resonancia magnética</i>	38
1.6.3.	<i>Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (ERM)</i>	46
1.6.4.	<i>Espectroscopía in vivo</i>	53
1.6.5.	<i>Espectroscopía ex vivo</i>	55
1.7.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	75
2.	HIPÓTESIS	79
3.	OBJETIVOS	81
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	83
4.1.	GENERACIÓN DEL MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA CEREBRAL CON REPERFUSIÓN	83
4.1.1.	<i>Pauta de analgesia</i>	87
4.2.	ADMINISTRACIÓN DE TERAPIA (CITICOLINA)	87
4.3.	EXPLORACIONES MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA	88
4.3.1.	<i>Imagen de inicio del experimento RMN: Secuencia Tripilot</i>	89

4.3.2.	<i>Imagen de angiografía</i>	90
4.3.3.	<i>Imagen de difusión</i>	90
4.3.4.	<i>Imagen ponderada enT₂</i>	91
4.3.5.	<i>Análisis de parámetros derivados de la IRM</i>	93
4.3.6.	<i>Espectroscopía single voxel</i>	95
4.3.7.	<i>Espectroscopía multivóxel</i>	98
4.3.8.	<i>Sacrificio de los animales por perfusión transcardíaca</i>	98
4.3.9.	<i>Sacrificio por irradiación con microondas focalizadas</i>	101
4.3.10.	<i>Espectroscopía ex vivo por HRMAS</i>	103
4.3.11.	<i>Post-procesamiento de los espectros de RMN</i>	106
4.3.12.	<i>Inmunohistoquímica</i>	111
4.3.13.	<i>Técnicas de reconocimiento de patrones</i>	113
4.4.	ESTADÍSTICA	116
4.5.	DISEÑO EXPERIMENTAL	118
4.5.1.	<i>Diseño experimental ERM in vivo con correlación inmunohistoquímica</i>	119
4.5.2.	<i>Diseño experimental correlación ERM in vivo y ex vivo</i>	121
4.5.3.	<i>Listado de los animales utilizados en el protocolo experimental</i>	121
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	123
5.1.	ANÁLISIS DE LA ZONA DE INFARTO Y CONTRALATERAL	123
5.1.1.	<i>Caracterización de los cambios morfológicos y metabólicos en la zona de infarto</i>	123
5.1.2.	<i>Discusión del análisis de la zona de infarto</i>	170
5.2.	ANÁLISIS DE LAS ZONAS SUBVENTRICULARES	183
5.2.1.	<i>Caracterización de los cambios inmunohistoquímicos en las zonas subventriculares</i>	183
5.2.2.	<i>Caracterización de los cambios espectroscópicos en las zonas subventriculares</i>	188
5.2.3.	<i>DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS EN LAS ZONAS SUBVENTRICULARES</i>	222
5.3.	ADMINISTRACIÓN DE TERAPIA	231
5.3.1.	<i>Análisis comparativo por imagen de resonancia magnética</i>	231
5.3.2.	<i>Análisis de las Zonas Subventriculares</i>	233
5.3.3.	<i>Análisis de la zona de infarto</i>	242
5.3.4.	<i>Discusión de la terapia con Citicolina</i>	250
6.	DISCUSIÓN GENERAL	257
7.	CONCLUSIONES	263
8.	BIBLIOGRAFIA	265

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación del infarto según su naturaleza.....	2
Figura 2: Esquema de las regiones del infarto cerebral:.....	4
Figura 3: Esquema de la cascada isquémica que se activa tras un ictus.....	6
Figura 4: Etapas de la evolución de un infarto.....	7
Figura 5: Esquema del metabolismo energético de la célula.....	8
Figura 6: Esquema del mecanismo de liberación y recaptura del glutamato.....	10
Figura 7: Radicales libres de oxígeno en la isquemia cerebral.....	11
Figura 8: La respuesta inmunitaria en el infarto cerebral.....	12
Figura 9: Esquema de los procesos de muerte neuronal vía necrosis y apoptosis.....	14
Figura 10: Esquema de los procesos de neuroreparación.....	15
Figura 11: Neurogénesis en la zonas subventriculares laterales.....	18
Figura 12: Proliferación de las CPNs en la ZSV y migración.....	20
Figura 13: Estructura química de la CDP-colina o citicolina.....	23
Figura 14: Diagrama de la síntesis de fosfatidilcolina a partir de la colina.....	24
Figura 15: Esquema de la cascada isquémica.....	25
Figura 16: Diagrama representativo del momento magnético.....	27
Figura 17: El efecto del campo magnético.....	28
Figura 18: Representación gráfica de la precesión de Larmor.....	28
Figura 19: Representación gráfica de los átomos en equilibrio térmico.....	30
Figura 20: Efecto de un campo magnético adicional (B1) sobre los átomos.....	31
Figura 21: Representación de la perturbación de la magnetización macroscópica.....	32
Figura 22: Recuperación de la magnetización longitudinal.....	33
Figura 23: Representación gráfica de pérdida de la magnetización transversal.....	34
Figura 24: Esquema de la transformación de la FID en un espectro.....	35
Figura 25: Obtención de una imagen 2D.....	38
Figura 26: Representación de los distintos tipos de contraste de la imagen.....	41
Figura 27: Imagen ponderada en difusión y mapa de ADC.....	43
Figura 28: Angiografía.....	45
Figura 29: Representación en el espectro de la relación de intensidades relativas.....	49
Figura 30: Esquema de una molécula de lactato y sus acoplamiento escalares q.....	50

Figura 31: Representación de una curva Lorentziana t	51
Figura 32: Secuencia Point Resolved Spectroscopy (PRESS)l	54
Figura 33: Equipo y funcionamiento de la resonancia por HRMAS.	57
Figura 34: Esquema de las secuencias de pulsos de excitación.....	58
Figura 35: Patrón espectral de rata Sprague Dawley por ERM y HRMAS e	60
Figura 36: Resonancia de la creatina y fosfocreatina	61
Figura 37: Resonancia del aspartato	62
Figura 38: Resonancia del N-acetilaspártato	63
Figura 39: Resonancia de la Colina, fosfocolina y glicerofosfocolina.	65
Figura 40: Resonancia del Lactato.....	66
Figura 41: Resonancia de los lípidos móviles visibles por RMN.....	68
Figura 42: P-ERM y H-ERM de oclusión permanente de la ACM	70
Figura 43: Mantenimiento de la PCr en estudios de tejido cerebral	73
Figura 44: Generación del modelo experimental de isquemia cerebral focal.	86
Figura 45: Protocolo experimental para el análisis del efecto de la Citicolina.....	88
Figura 46: Secuencia TriPilot	89
Figura 47: Secuencia de imágenes para la generación del modelo experimental.....	92
Figura 48: Cálculo de volumen del infarto a partir de IRM.	93
Figura 49: Cálculo del edema del infarto a partir de la IRM	95
Figura 50: Zonas de análisis del patrón metabólico por ERM.....	96
Figura 51: Cerebro de rata sacrificado por el método de perfusión transcardíaca.....	99
Figura 52: Esquema de la metodología de perfusión transcardíaca.....	100
Figura 53: Sistema de irradiación por microondas focalizadas	102
Figura 54: Cerebro de rata sacrificado por irradiación con microondas focalizadas. .	103
Figura 55: Cortes en el cerebro de rata para la obtención de las muestras.....	104
Figura 56: Diseño experimental del estudio longitudinal.	120
Figura 57: Diseño experimental del estudio d <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	121
Figura 58: Animales incluidos y excluidos en el protocolo experimental	122
Figura 59: Análisis del infarto mediante IRM.....	125
Figura 60: Estabilidad del patrón metabólico de ERM <i>in vivo</i> a 1 día post-isquemia..	128
Figura 61: Esquema de colocación de los vóxeles	129
Figura 62: Espectros promedio \pm SD de ERM <i>in vivo</i>	133

Figura 63: Gráficas de las resonancias de ERM <i>in vivo</i> de la zona de la ACM.....	134
Figura 64: Espectros de ERM <i>in vivo</i> de la evolución de la zona del infarto.....	138
Figura 65: Gráficas de las resonancias de la evolución de la zona de infarto.....	139
Figura 66: Valoración de la detención del metabolismo en biopsias de tejido	144
Figura 67: Espectros de HRMAS <i>ex vivo</i> de la zona de la ACM	146
Figura 68: Disolución de ácido aspártico con creatina.....	149
Figura 69: Ampliación de la región de los LMap (2,80 ppm)	151
Figura 70: Gráficas de la resonancia de LMap (2,80 ppm).....	152
Figura 71: Ampliación de la región Lac+LM2 (1,30 ppm)	154
Figura 72: Gráficas promedio \pm SD para la resonancia de Lac+LM2 (1,30 ppm) d.	155
Figura 73: Ampliación de la región e de los ChCCp (3,19-3,25 ppm).....	158
Figura 74: Gráficas de los ChCCp.....	159
Figura 75: Inmunohistoquímica de la apoptosis en la zona de la ACM	162
Figura 76: Clasificador para el análisis del infarto.....	165
Figura 77: Clasificación realizada por el sistema SpectraClassifier.....	167
Figura 78: Sistema de reconocimiento de patrones no supervisado.....	169
Figura 79: Inmunohistoquímico de la proliferación de las CPNs en la ZSV	184
Figura 80: Inmunohistoquímica de la apoptosis basal en rata sana.....	186
Figura 81: Análisis inmunohistoquímico de la apoptosis en las ZSVs a	187
Figura 82: Colocación de los vóxeles de análisis de la ZSVi.	189
Figura 83: Análisis de la estabilidad del patrón metabólico de ERM <i>in vivo</i>	190
Figura 84: Espectros de ERM <i>in vivo</i> de las ZSVs.....	194
Figura 85: Gráficas de las resonancias de ERM <i>in vivo</i> de las ZSVs.....	193
Figura 86: Espectros de ERM <i>in vivo</i> de la evolución de las ZSVs	196
Figura 87: Gráficas de las resonancias de ERM <i>in vivo</i> de la evolución de las ZSVs ...	197
Figura 88: Espectros de HRMAS <i>ex vivo</i> de las ZSVs	200
Figura 89: Ampliación de la región Lac (1,33-1,35 ppm) con HRMAS.....	203
Figura 90: Gráfica para la resonancia de Lac+LM2 (1,30 ppm).....	204
Figura 91: Ampliación de la región de los ChCCp	206
Figura 92: Gráficas de los ChCCp (3,19-3,25 ppm) HRMAS <i>ex vivo</i>	207
Figura 93: Proliferación (Ki67/mm ²) en las ZSVs.....	209
Figura 94: Correlación de Pearson de la proliferación (Ki67+/mm ²)	211

Figura 95: Clasificador de H.contralateral, ZSVc, ZSVi e Infarto.....	212
Figura 96: Clasificación realizada por Spectra Classifier	214
Figura 97: Clasificador de H.contralateral, ZSVc+ ZSVi e Infarto.....	215
Figura 98: Clasificación realizada por el sistema Spectra Classifier	216
Figura 99: Clasificador desarrollado para diferenciar: H.contralateral, ZSVc y ZSVi...	218
Figura 100: Clasificación realizada por SpectraClassifier	220
Figura 101: Características por IRM de los animales tratados con Citicolina.	232
Figura 102: Inmunohistoquímica en las ZSVs	235
Figura 103: Espectro de las ZSVs para los animales no tratados y tratados	238
Figura 104: Gráficas de las ZSVs para los animales no tratados y tratados.....	239
Figura 105: Gráfica de los resultados de apoptosis	243
Figura 106: Espectros e las zonas de la ACM para animales no tratados y tratados...	245
Figura 107: Gráficas de la zona de la ACM para animales no tratados y tratados	246

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de los principales átomos con momento magnético	27
Tabla 2: Tabla de las principales metabolitos del patrón espectroscópico de rata.....	59
Tabla 3: Tabla de las referencias de proliferación en la ZSV post-infarto.....	118
Tabla 4: Tabla de los volúmenes de infarto	126
Tabla 5: Tabla de los volúmenes de infarto obtenidos de la bibliografía.	127
Tabla 6: Valores de cambio resonancias analizadas para cada grupo.	135
Tabla 7: Valores de cambio entre referencia a 1 día y punto final	140
Tabla 8: Resumen artículos que han determinado los valores de PCr y Cr	142
Tabla 9: Valores de cambio de LMap (2,80 ppm) en infarto	152
Tabla 10: Valores de cambio de Lac+LM2 (1,30 ppm) en infarto	156
Tabla 11: Valores de cambio para TCho (3,21 ppm) en infarto.	160
Tabla 12: Valores de apoptosis en infarto p	163
Tabla 13: Valores de correlación de Pearson (r) para apoptosis.	164
Tabla 14: Características utilizadas para la generación del clasificador de infarto	166
Tabla 15: Valores de proliferación por inmunohistoquímica en las ZSVs.....	185
Tabla 16: Valores de apoptosis por inmunohistoquímica en las ZSVs.....	188
Tabla 17: Valor de cambio o de las alturas normalizadas a UL2 _c	194
Tabla 18: Valor de cambio entre referencia a 1 día y punto final de las ZSVs.	198
Tabla 19: Valor de cambio para Lac+LM2 (1,30 ppm) en las ZSVs t.	205
Tabla 20: Valor de cambio para los ChCCp (3,19-3,25 ppm) t.	208
Tabla 21: Valores de correlación de Pearson para proliferación y apoptosis ZSV.....	210
Tabla 22: Selección de las 6 características utilizadas para clasificador ZSV.....	213
Tabla 23: Selección de las 3 características utilizadas para clasificador ZSV	216
Tabla 24: Selección de las 7 características utilizadas para clasificadorla ZSV	219
Tabla 25: Tabla resumen de las características diferenciales	221
Tabla 26: Tabla comparativa dede IRM en animales tratados con Citicolina.....	233
Tabla 27: Inmunohistoquímicos de las ZSVs de animales tratados con Citicolina e....	236
Tabla 28: Valores promedio de las ZSVs para animales tratados con Citicolina	240
Tabla 29: Valores de cambio metabolitos en las ZSVs para animales tratados.....	241
Tabla 30: Valores de apoptosis promedio \pm SD (TUNEL+/mm ²) en la ACM.	244

Tabla 31: Valores de cocientes entre animales tratados con Citicolina	247
Tabla 32: Valores de cambio del infarto para animales tratados.	249
Tabla 33: Cambios de metabolitos por ERM y HRMAS en la zona de infarto y ZSV	257

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Frecuencia de precesión de Larmor.....	29
Ecuación 2: Diferencia energética entre niveles de energía.....	30
Ecuación 3: Relajación T_1	33
Ecuación 4: Relajación T_2	35
Ecuación 5: Cálculo del valor de b en las imágenes DWI	42
Ecuación 6: Cálculo de la intensidad de la señal (S).....	42
Ecuación 7: Campo magnético efectivo (B_{ef}) para un núcleo	46
Ecuación 8: Frecuencia real de precesión ω	47
Ecuación 9: Desplazamiento químico.	48
Ecuación 10: Señal (S) a ruido (N)	53
Ecuación 11: Factores que influyen el campo magnético local	56
Ecuación 12: Cálculo del volumen de infarto a partir de imágenes 2D).....	94
Ecuación 13: Cálculo del porcentaje de edema cerebral.....	95
Ecuación 14: Cálculo de las alturas normalizadas a UL_2	108
Ecuación 15: Cálculo de las alturas normalizadas a contralateral (UL_{2c}).	108
Ecuación 16: Cálculo del BER.....	115
Ecuación 17: Cálculo de la puntuación de z en el test de Grubbs.	117

ABREVIATURAS

1 d, 6 d, 7 d, 8 d: 1,6,7,8 días

ACM: Arteria cerebral media

ADC: Coeficiente de difusión aparente (del inglés: *Apparent Diffusion Coefficient*)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de la varianza (del inglés: *Analysis of variance*)

ASCII: Fichero *American Standard Code for Information Interchange*

Asp: Aspartato

BrdU: Bromodeoxiuridina

BER: *Balanced Error Rate*

B₀: Campo magnético externo

ChCCp: Compuestos que contienen colina (del inglés: *Choline Containing Compounds*)

Cho: Colina libre

CK: Creatina quinasa

CPN: Célula progenitora neural

Cr: Creatina

CSI: Espectroscopía multivóxel (del inglés: *Chemical Shift Imaging*)

d: doblete

dd= doble doblete

ddd= doble doblete

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

DS: Distancia de la sección

DSS: 2,2-Dimetil-2-silapentano-5-sulfonato sódico

DWI: Imagen ponderada en difusión (del inglés: *Diffusion Weighted Imaging*)

EC: esteres de colesterol

ECV: Enfermedades Cerebrovasculares

ERM: Espectroscopía de resonancia magnética

ESC: Célula madre embrionaria (del inglés: *Embryonic Stem Cell*)

FID: *Free Induction Decay*

FLASH: Secuencia *Fast, Low-Angle Shot*

FMW: Irradiación con microondas focalizadas (del inglés, *Focused Microwave Irradiation*)

FOV: campo de vista (del inglés: *field of view*)

GABRMN: Grupo de Aplicaciones Biomédicas de la Resonancia Magnética Nuclear

GPC: Glicerofosfolina

GS: grosor de la sección

h= constante de Planck

HRMAS: *High resolution magic angle spinning*

I = Espín nuclear

i.p: intraperitoneal

J: constante de acoplamiento

Lac: Lactato

LDA: Análisis lineal discriminante (del inglés, *Lineal Discriminant Analysis*)

LM2: Lípidos móviles 2

LM1: Lípidos móviles 1

LMap: Lípidos móviles apoptóticos

M: concentracions molares (moles/l).

ml: mioinositol

MCAO: Modelo animal de isquemia de oclusión de la arteria cerebral media de forma permanente

mg: milígramo

ml: mililitro

MTX: matriz

m: multiplete

min: minuto

ms: milisegundo

NA: número de promedios (del inglés: *number of averages*)

NAA: N-acetilaspártato

NaCl: Cloruro sódico

N-CH₃: grupo trimetilamina

NSC: Célula madre neuronal(*del inglés: Neural Stem Cell*)

pág: página

PB: tampón fosfato (del inglés, *Phosphate Buffer*)

PCho: Fosfocolina

PCr: fosfocreatina

PFA: paraformaldehído

Pi: fosfato inorgánico

PtdCho: Fosfatidilcolina

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

q: cuadruplete (*del inglés: quartet*)

RARE: secuencia de adquisición rápida con realce de la relajación (*del inglés: rapid acquisition with relaxation enhancement*)

RESO: Resonancia

RMS: corriente migratoria rostral (*del inglés: rostral migratory stream*).

ROI: región de interés (*del inglés: region of interest*)

RP: Reconocimiento de patrones

SC: Spectra Classifier

SD: Desviación estándar

seg: segundo

SeRMN: Servi de Ressonància Magnètica de la Universitat Autònoma de Barcelona

Sig: Significación

SNR: Cociente Señal a ruido (*del inglés: signal to noise ratio*)

TC: Tomografía computerizada

TAG: triacilgliceroles

TAT: Tiempo total de adquisición (*del inglés: Total acquisition time*)

t: triplete

tCho: Colina total

tCr: Creatina total

TE: tiempo de eco

tMCAO: Modelo animal de isquemia de oclusión de la arteria cerebral media de forma transitoria (del inglés: *transient Medium Cerebral Artery Occlusion*)

3D-TOF= tiempo de vuelo (del inglés: *time of flight*)

TR: tiempo de repetición

TSP: ácido 3-(Trimetilsilil)- Propiónico-D4

TUNEL: *Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling*

UAB: Universitat Autònoma de Barcelona

UL2: Normalización *Unit length*

UL2_c: Normalización Unit length respecto al hemisferio contralateral

VC: valor de cambio

VCT: valor de cambio temporal

ZSG: Zona subgranular de hipocampo

ZSV: Zonas subventriculares

ZSV_c: Zona subventricular contralateral

ZSV_i: Zona subventricular ipsilateral

γ = constante giromagnética

$\vec{\mu}$ = momento magnético

\vec{M}_0 = equilibrio térmico

\mathbf{v}_0 = precesión de Larmor

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Concepto de Ictus, epidemiología y clasificación

Las enfermedades cerebrovasculares (ECV) son las alteraciones encefálicas secundarias a una alteración del flujo sanguíneo que afecta a una o varias zonas del parénquima cerebral. El término ictus, que en latín significa “golpe” es el más comúnmente usado en la actualidad para denominar a estas enfermedades y se utiliza como análogo del término “*stroke*” en inglés.

El ictus es la segunda causa de muerte más frecuente en las personas mayores de 60 años y la primera causa de discapacidad permanente en los países desarrollados. A nivel mundial, cada año 15 millones de personas sufren un ictus, de las que aproximadamente 5 millones fallecen y 5 millones quedan discapacitadas.

En España se puso en marcha una campaña de sensibilización sobre las ECV denominada “1 de cada 6”, que es la proporción de españoles que según las cifras actuales se prevé que sufrirán un ictus a lo largo de su vida. La incidencia es mayor en hombres (183-364/100.000 habitantes) que en mujeres (169/100.000 habitantes) y se multiplica por 10 en la población de más de 70 años de edad (Medrano MJ 2006).

Ya que detectar un ictus a tiempo es fundamental, la concienciación social sobre la enfermedad y la mejora asistencial están permitiendo avances en la disminución de las tasas de mortalidad debidas a las ECV aunque consiguientemente están aumentando las tasas de discapacidad con el correspondiente coste social y humano para las familias y la sociedad (Martí-Vilalta 2012).

El ictus engloba dos tipos de eventos:

- Isquémico: la falta de aporte sanguíneo debida a la oclusión de un vaso, normalmente por la presencia de un trombo o una placa aterosclerótica, que impide el paso del flujo sanguíneo.
- Hemorrágico: Ruptura de un vaso sanguíneo con la consecuente extravasación de sangre en el tejido (hemorragia).

Así, se diferencia entre el ictus isquémico y hemorrágico. Los ictus isquémicos representan entre el 80 y el 85 % de todos los ictus, mientras que el 15-20% restante corresponden a una hemorragia.

En los ictus isquémicos cuando los síntomas remiten sin causar una lesión cerebral permanente detectable mediante técnicas de neuroimagen, éste se denomina ataque isquémico transitorio (AIT). En caso de producirse una lesión irreversible, se denomina infarto cerebral (independientemente de la duración de los síntomas) (Albers et al. 2002).

La clasificación de los subtipos etiológicos se muestra en la Figura 1.

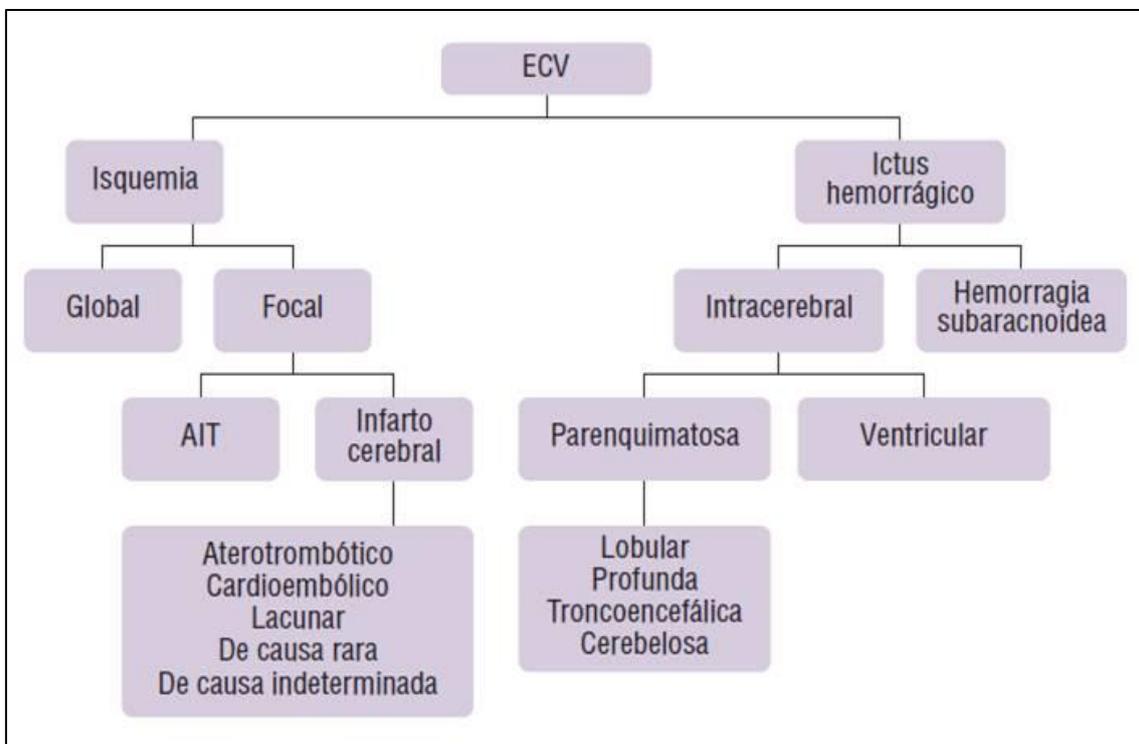


Figura 1: Clasificación del infarto según su naturaleza. Abreviaturas: ECV = Enfermedades Vasculares Cerebrales, AIT = Ataque Isquémico transitorio. Imagen obtenida de (Díez-Tejedor E 1999).

1.2. Fisiopatología del Ictus

A pesar de la variabilidad intrínseca propia de la enfermedad, a partir de los años 80 con la introducción por parte de Astrup y colaboradores (Astrup et al. 1977) del concepto de penumbra isquémica se determinó que la región isquémica, independientemente de su causa, presentaba 3 zonas (Figura 2):

- El núcleo del infarto: zona en la que se produce el fallo energético, la muerte celular se produce de forma rápida y fulminante en pocos minutos de forma que los cambios son irreversibles (Ljunggren et al. 1974).

- La zona de penumbra: es el denominado “tejido en riesgo” que es una zona de isquemia cerebral incompleta en la cual las neuronas están funcionalmente inactivas (fallo eléctrico), pero todavía son viables si se restaura el flujo sanguíneo (Furlan et al. 1996) mediante técnicas de recanalización (Cohen et al.), en caso contrario, en humanos aproximadamente entre 6 y 8 horas desde el inicio de los síntomas evoluciona a tejido infartado (Heiss 2012)

- Zona de oligoemia benigna: donde el flujo se encuentra reducido pero las neuronas son funcionalmente activas. Esta zona se confundía clásicamente con la penumbra, aunque la principal diferencia es que en la zona de oligoemia las neuronas no están en riesgo (Kamalian et al. 2012).

La clasificación de las zonas se establece en base a la circulación sanguínea en cada región. Así se considera que en el núcleo del infarto el flujo sanguíneo es de <10 ml/100g/min, en la zona de penumbra de 10 a 17 ml/100g/min y en la zona de oligoemia benigna de > 17 ml/100g/min (Astrup et al. 1981).

Sin embargo, la penumbra no es un concepto rígido, ya que evoluciona a lo largo del tiempo dependiendo del nivel de circulación arterial colateral (que es distinta entre los pacientes), la duración de la isquemia y el estado metabólico y funcional de las células (Bandera et al. 2006).

Sin una intervención adecuada, de forma dependiente de la duración del tiempo de isquemia, el parénquima cerebral afectado se acaba destruyendo progresivamente e irreversiblemente. Esta destrucción progresiva es uno de los mecanismos responsables del deterioro neurológico que experimentan una tercera parte de los pacientes con ictus isquémico durante las primeras 48 horas (Castillo and Noya 1999; Castillo and Leira 2001).

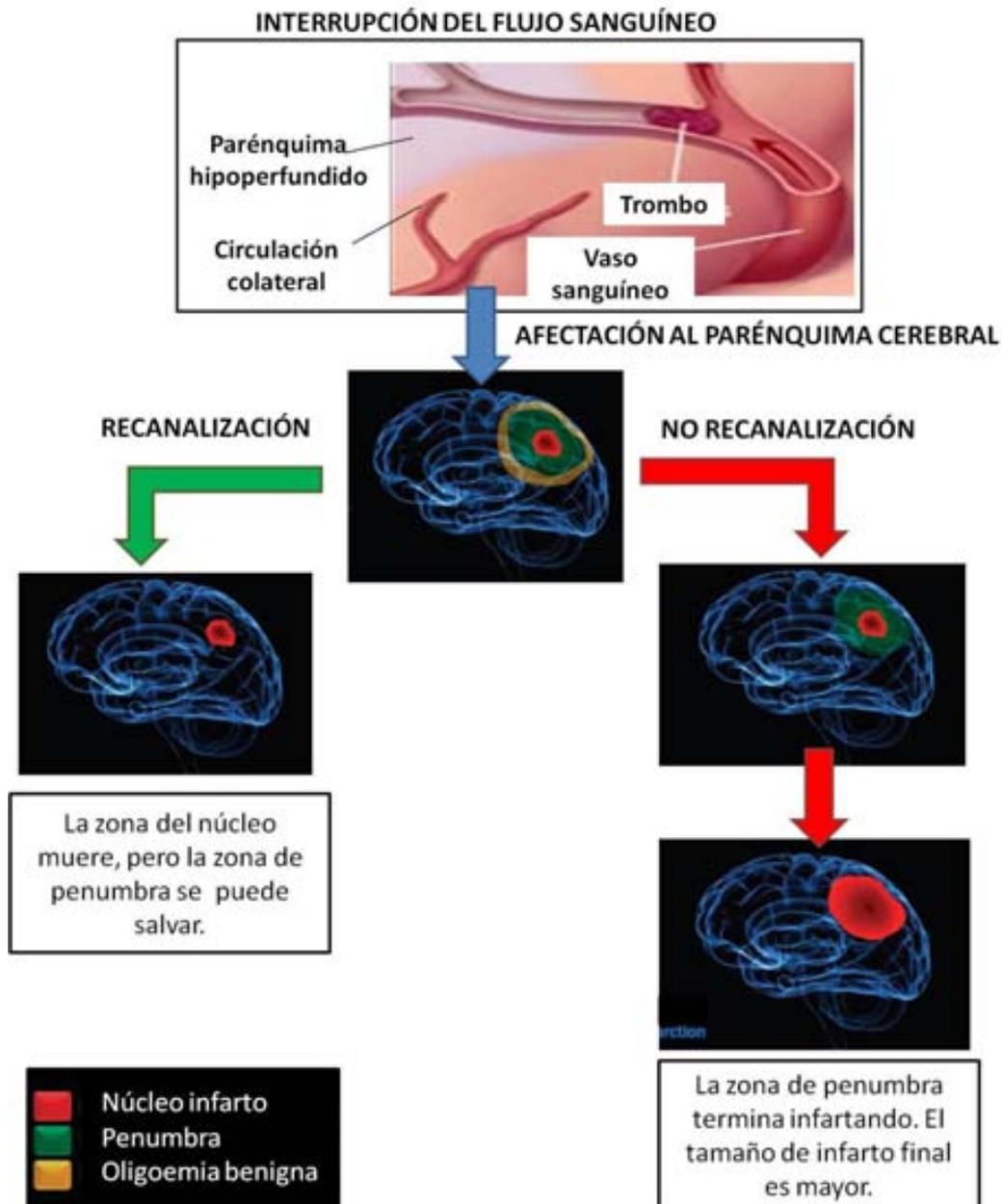


Figura 2: Esquema de las regiones del infarto cerebral: núcleo del infarto, zona de penumbra y oligoemia benigna y su evolución en el tiempo dependiendo de la recanalización. Imagen modificada de (Kidwell 2013) y <http://www.webmd.com/stroke/guide/understanding-stroke-basics>.

1.3. Mecanismos moleculares del ictus

A nivel bioquímico el ictus isquémico, tal y como su nombre indica, se produce por una situación de isquemia, es decir, por una falta de aporte de oxígeno y glucosa que afecta al cerebro. La principal consecuencia de este hecho es el fallo energético que se produce en dicho tejido.

El cerebro humano, aunque únicamente representa el 2% del peso corporal consume el 20% de la energía total producida por el organismo (Herculano-Houzel). Por lo tanto, es altamente dependiente del aporte de glucosa y oxígeno para llevar a cabo la fosforilación oxidativa mitocondrial (Hall et al. 2012) debido a la limitada capacidad de las reservas energéticas endógenas de mantener la homeostasis.

La completa interrupción del flujo sanguíneo puede producir la muerte de las neuronas de las regiones más vulnerables en sólo 5 minutos (Astrup et al. 1981), mientras que en otros tipos celulares como miocitos cardíacos o células renales serían necesarios 20-40 minutos para producir dicho tipo de muerte (Lee et al. 2000).

Es por este motivo que en el caso del ictus, al interrumpirse el aporte sanguíneo, se desencadenan rápidamente a nivel celular una serie de cambios bioquímicos que se conocen con el nombre de cascada isquémica y que aparecen resumidos en la Figura 3, cuyo desenlace, si la situación no es revertida, es la muerte celular con la consiguiente lesión permanente en el cerebro (Castillo 2001).

A pesar de que clásicamente la cascada isquémica se ha asociado a procesos deletéreos para las células, muchos de los mediadores activados en este proceso están implicados en la activación de los procesos de neuroreparación celular que siguen a un infarto (Lo 2008).

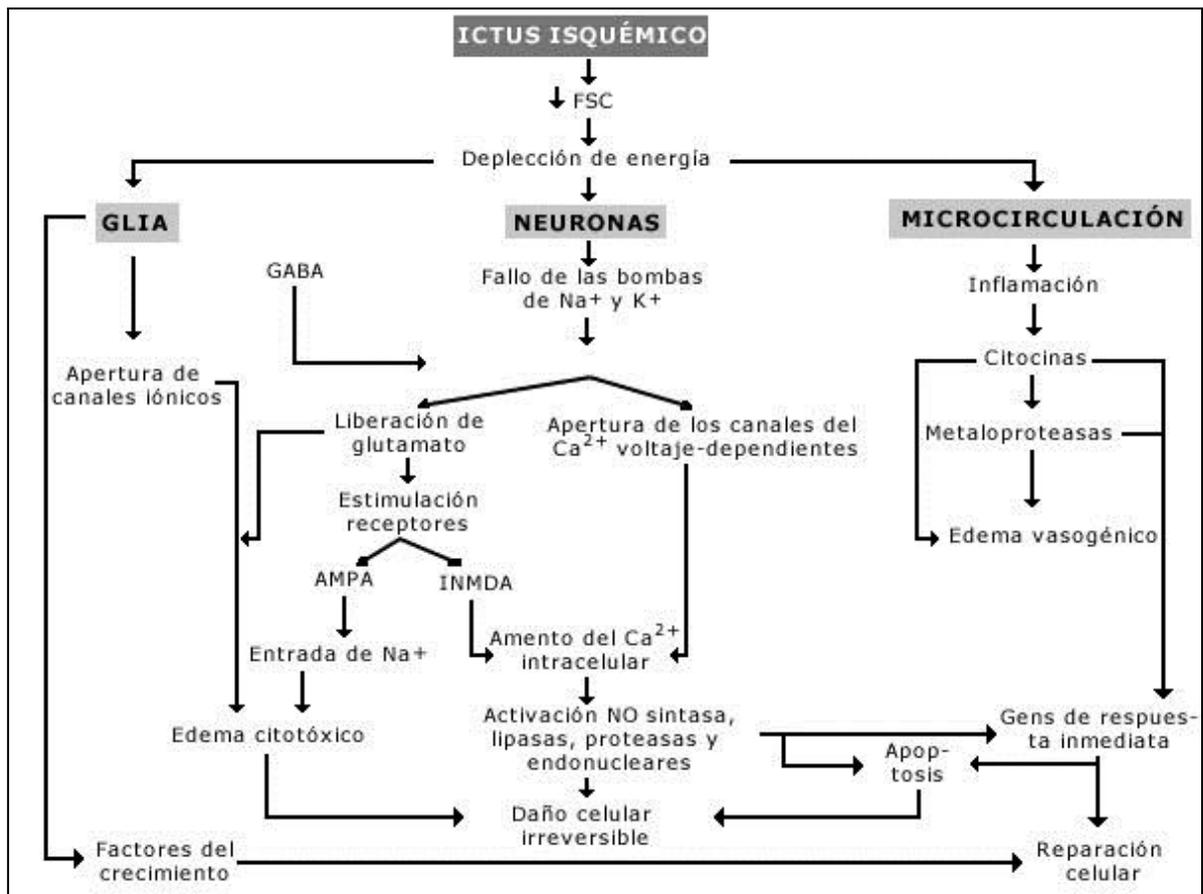


Figura 3: Esquema de la cascada isquémica que se activa tras un ictus. Abreviaturas: FSC= flujo sanguíneo cerebral, INMDA= receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato ionotróficos, AMPA= receptores glutamatérgicos del ácido 2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico. Imagen obtenida de (Castillo 2001).

A pesar de la rapidez con la que se producen los cambios inicialmente, la cascada isquémica se compone de una serie de etapas establecidas en el tiempo (Figura 4) que se irán detallando a continuación:

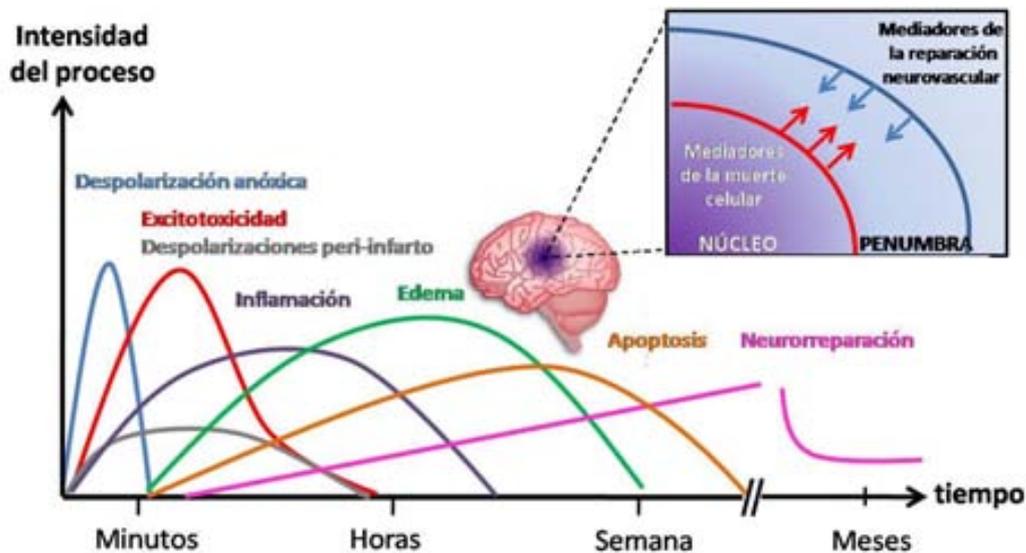


Figura 4: Gráfico temporal donde se representan las etapas sucesivas de la evolución de un infarto y su intensidad. Los procesos activados son mediadores tanto de los procesos que conllevan a la muerte celular como de la activación de los procesos de neurorreparación. Imagen modificada de (Endres et al. 2008) y (Lo 2008).

1.3.1. Fallo en el metabolismo energético

Minutos después de un evento isquémico, al no haber disponibilidad de oxígeno en el cerebro y, por lo tanto, no haber posibilidad de realizar la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, empiezan a decaer los niveles de adenosín trifosfato (ATP) en el tejido (Nowicki et al. 1988; Takeo et al. 1992; Foo et al. 2012).

Este fallo mitocondrial producido por la isquemia afecta de forma contundente a las neuronas que no pueden compensar de forma autónoma este déficit. En cambio los astrocitos tienen la capacidad de movilizar sus reservas internas de glucógeno y activan la glicólisis anaeróbica (Pellerin et al. 2007). El paso de glucógeno a piruvato produce energía en sí mismo, y el piruvato en ausencia de oxígeno no es transportado a la mitocondria para la fosforilación oxidativa sino que se convierte en lactato mediante la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La acumulación de lactato tras un ictus se ha descrito tanto en modelos animales (Alf et al. 2012) como en humanos (Karaszewski et al. 2009).

Otras fuentes de mantenimiento de la homeostasis energética cerebral son las que provienen de las reservas de fosfatos de alta energía de las células (Ljunggren et al. 1974; Takeo et al. 1992). En el citosol de las neuronas se encuentra la fosfocreatina (PCr) en que el fosfato se encuentra unido a creatina (Cr) (Wyss and Kaddurah-Daouk 2000). Mediante la reacción de la creatinquinasa (CK) (Figura 5) la PCr cede el fosfato para la producción de ATP a partir del adenosíndifosfato (ADP) en caso de demanda energética (Iwata et al. 2008), con la característica de que esta reacción, se puede producir en condiciones anaeróbicas (Perasso et al. 2011). La pérdida total de ATP no se produce hasta el momento en que se agotan las reservas de PCr (Hoehn et al. 2001). Esta pérdida de ATP tiene consecuencias irreversibles para el cerebro.

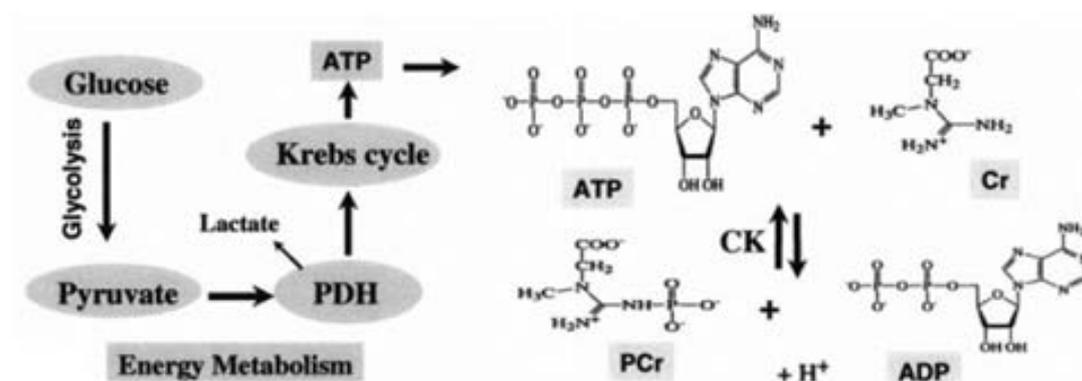


Figura 5: Esquema del metabolismo energético de la célula y reacción mediada por la enzima Creatinquinasa (CK) para la producción de ATP a partir del ADP (o viceversa). Abreviaturas: PDH = piruvato deshidrogenasa (es la enzima que cataliza la entrada del piruvato al ciclo de Krebs para las reacciones de fosforilación oxidativa). Imagen obtenida de (Mandal 2007)

1.3.2. Despolarización anóxica

Con la pérdida de la carga energética por la disminución de la concentración de ATP se inactiva el transporte activo a través de la membrana por parte de la bomba Na^+/K^+ . Esto produce cambios en la homeostasis iónica ya que se incrementa el K^+ extracelular, a la vez que se produce la entrada de Na^+ y Ca^{2+} al interior neuronal.

Este intercambio iónico hace que la membrana se despolarice perdiendo el potencial de membrana de reposo (Katsura et al. 1994). La entrada de Ca^{2+} al interior de la neurona permite que la vesícula sináptica se fusione con la membrana para liberar neurotransmisores excitadores al espacio sináptico (Meyer 1989). Esta hiperexcitabilidad neuronal que tiene efectos neurotóxicos sobre el cerebro se desencadena de forma masiva en el cerebro isquémico (Choi 1988; Siesjo and Bengtsson 1989).

Se cree que este proceso es el causante de la extensión del infarto en la zona de penumbra en los días posteriores a la isquemia hasta alcanzar el tamaño de lesión final en lo que se conoce como despolarización anóxica peri-infarto (Kempinski et al. 2000).

Una de las complicaciones secundarias de este proceso es que para compensar la entrada de iones también entra agua al interior de neuronas y astrocitos. Esta entrada es la causante del edema citotóxico (Ito et al. 1979) que es una de las principales causas de la muerte celular en fase aguda (Douglas et al. 2011) ya que puede comprimir estructuras sanas del cerebro (Simard et al. 2007). El edema se considera máximo entre las 13-48 horas post-isquemia (Gotoh et al. 1985).

1.3.3. Excitotoxicidad

La excitotoxicidad, como su nombre indica, hace referencia a los efectos dañinos que tiene para el cerebro una sobreactivación debida a neurotransmisores excitadores, en especial el neurotransmisor excitador más liberado en el cerebro, el glutamato. (Olney and Sharpe 1969)

Debido a la falta de ATP suficiente, el glutamato no es recapturado por los astrocitos con lo que se acumula de forma extracelular (Longuemare et al. 1994) produciendo la sobreactivación de los receptores postsinápticos glutamatérgicos de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) ionotróficos y metabotróficos, y de los receptores glutamatérgicos de tipo ácido 2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA),

tanto de neuronas como de astrocitos, que a su vez producen una despolarización con un efecto amplificador(Figura 6).

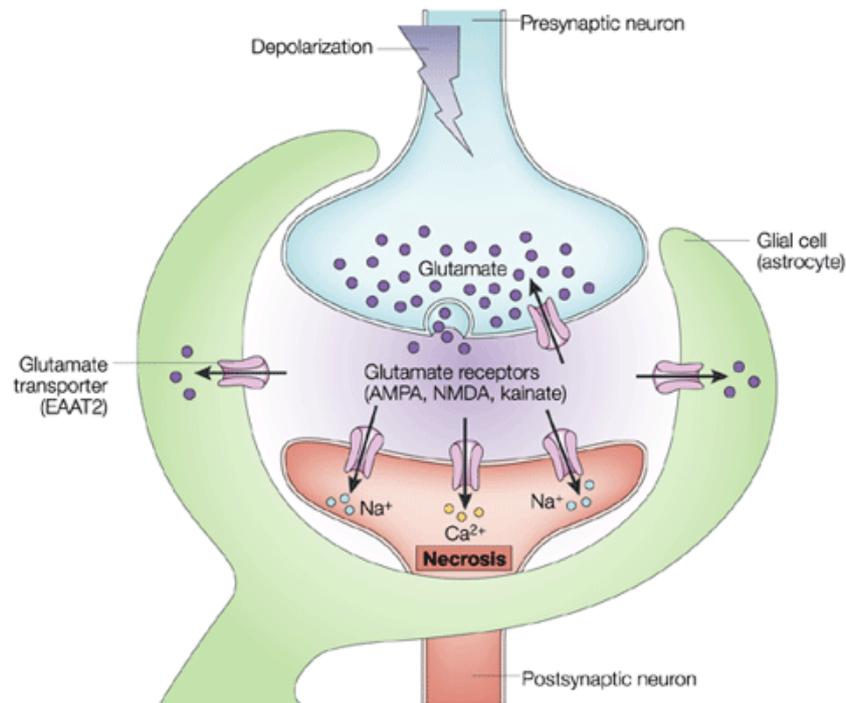


Figura 6: Esquema del mecanismo de liberación y recaptura del glutamato en el cerebro. La acumulación de glutamato en el espacio extracelular induce a la excitotoxicidad en el ictus. La entrada de Na^+ y Ca^{2+} en la neurona post-sináptica induce a que ésta a su vez se despolarice creando un proceso en cadena que conlleva a la muerte celular de muchas neuronas. Imagen obtenida de(Syntichaki and Tavernarakis 2003)

1.3.4. Estrés oxidativo

Los radicales libres o formas parcialmente reducidas de oxígeno son moléculas inestables que se unen a otros componentes para ser estables. Pueden ser productos secundarios de la fosforilación oxidativa en la mitocondria (Manzanero et al. 2012) o de la reacción de enzimas como la sintetasa de óxido nítrico (NOS), responsable de la síntesis de óxido nítrico (NO) (Grandati et al. 1997).

Estas especies son neutralizadas en el cerebro sano por enzimas antioxidantes, pero en un ambiente isquémico estos mecanismos no son suficientes y los radicales libres se acumulan en exceso produciendo lo que se denomina estrés oxidativo.

Hay 2 puntos temporales críticos en la formación de radicales libres que son al inicio de la isquemia y, especialmente, durante la reperfusión ya que el oxígeno es el sustrato para estas reacciones (Chan 1996) (Figura 7).

Existen 2 especies de radicales libres altamente reactivas que serían el hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) que se forma en presencia de hierro mediante la reacción de Fenton (Lipscomb et al. 1998) y el peroxinitrito (ONOO^-). Estos radicales libres oxidan proteínas, fragmentan el ácido desoxiribonucleico (ADN) y dañan las membranas nucleares mediante peroxidación lipídica (Olmez and Ozyurt 2012)

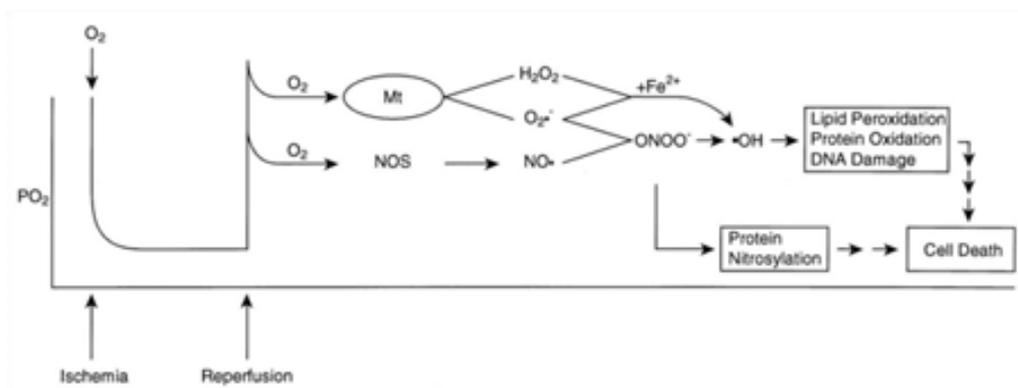


Figura 7: Radicales libres de oxígeno en la isquemia cerebral. Abreviaturas: $p\text{O}_2$ = Presión parcial de oxígeno, Mt= mitocondria, NOS= sintetasa del óxido nítrico, H_2O_2 = peróxido de hidrógeno, $\text{O}_2\bullet^-$ = radical superóxido, $\text{NO}\bullet$ = radical óxido nítrico, Fe^{2+} = ion hierro, ONOO^- = anión peroxinitrito, $\bullet\text{OH}$ = radical hidroxilo. Imagen obtenida de (Chan 1996)

1.3.5. La respuesta inmunitaria

El cerebro es un órgano que por sus características de aislamiento que le confiere la barrera hematoencefálica (BHE) tiene células inflamatorias propias como la microglía, que al ser activada actúa como un macrófago con capacidad fagocítica.

Sin embargo tras un ictus, al dañarse las uniones estrechas entre las células endoteliales, se produce lo que se denomina rotura de la barrera hematoencefálica y en caso de reperfusión, se produce una extravasación de células inmunitarias circulantes al parénquima cerebral (del Zoppo 2010), como los fagocitos periféricos, los linfocitos T, las células *natural killer* (NK) y los leucocitos polimorfonucleares (Figura 8).

Aunque se considera que la inflamación inicial exacerba el daño celular, con el tiempo finalmente se soluciona y permite la activación de los sistemas de neovascularización y neurorreparación.

Se considera que todos los tipos celulares presentes en el cerebro (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales), no únicamente la microglía, son partícipes de la respuesta inmunitaria mediante la expresión de mediadores inflamatorios, especialmente citoquinas (Iadecola and Anrather 2011).

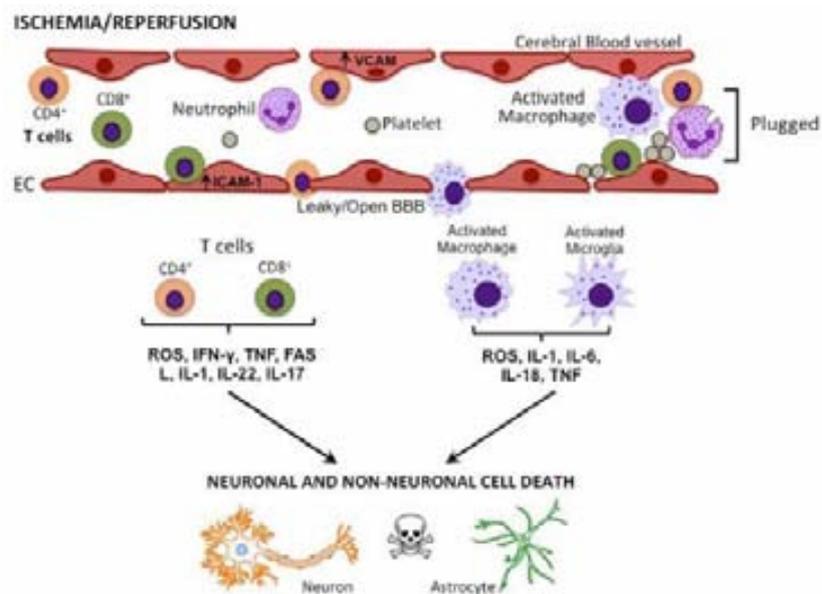


Figura 8: La respuesta inmunitaria en el infarto cerebral. El incremento de las moléculas de adhesión (ICAM y VCAM) atrae a las células T y los macrófagos circulantes que se extravasan al parénquima cerebral e inducen la inflamación que contribuye a la muerte de las células del cerebro mediante la expresión de mediadores inflamatorios. Abreviaturas: BBB= Barrera hematoencefálica (del inglés: *Blood Brain Barrier*), $CD4/8^+$ =células T, VCAM = molécula de adhesión vascular, ICAM-1=molécula de adhesión intracelular-1, ROS= radicales libres de oxígeno, $IFN-\gamma$ = interferón- γ , TNF= factor de necrosis tumoral, FAS-L= ligando de Fas, IL-1/6/17/18/22=interleuquina. Imagen obtenida de: (Broughton et al. 2012)

Una de las complicaciones asociadas al proceso inflamatorio es el edema vasogénico (distinto al edema citotóxico mencionado anteriormente) y que es debido a la entrada de líquido en el cerebro que hace que este edema se extienda (Unterberg et al. 2004).

1.3.6. Tipos de muerte celular

La muerte celular en isquemia estaba asociada clásicamente a necrosis pero estudios desarrollados a partir de los años 90 pusieron en relevancia que la apoptosis tenía un papel clave en el proceso de la muerte isquémica. Estos dos tipos de muerte no son excluyentes ya que en una misma área de tejido infartado se pueden encontrar ambas formas de muerte (Northington et al. 2011) (Figura 9) e incluso se describen otras formas de muerte como la autofagia (Rami and Kogel 2008).

- Muerte necrótica: Este tipo de muerte se caracteriza porque las células no pueden mantener su integridad estructural, normalmente a causa de un influjo de iones y agua al interior celular (ver apartado 1.3.2), hecho que provoca edema citotóxico de las células, la disolución nuclear (*karyolisis*) y finalmente la lisis celular (Trump and Berezsky 1996). Este tipo de muerte causa daño en la mitocondria y el colapso energético. Se considera que es el tipo de muerte que sucede en cuestión de minutos inicialmente en el núcleo isquémico (Pamenter et al. 2012)

- Apoptosis: La apoptosis es un tipo de muerte celular programada. La apoptosis clásica está mediada por la activación de caspasas desde la vía intrínseca (la mitocondria libera el citocromo C) o la vía extrínseca (a través de la activación de los receptores de muerte de la membrana) (Broughton et al. 2009). Este tipo de muerte es dependiente de energía ya que requiere el consumo de NAD, para procesos de poli-ADP-ribosilación y un nivel mínimo de concentración de ATP/dATP para la formación del apoptosoma (Kim et al. 2005) y por eso se produce en etapas más avanzadas post-infarto, cuando el flujo sanguíneo ha sido restablecido (reperfusión) (Sims and Muyderman). En este tipo de muerte la célula mantiene su morfología pero en su interior tienen lugar cambios

morfológicamente característicos: cambios en la composición de la membrana celular, la contracción del citoplasma celular, la fragmentación del ADN, la condensación de la cromatina del núcleo y finalmente la formación de los cuerpos apoptóticos que son retirados por los macrófagos. En el caso del infarto se considera que este tipo de muerte influencia el tamaño final del infarto por su prevalencia como forma de muerte de la zona de penumbra. En experimentos con ratones transgénicos que sobreexpresan Bcl-2, un inhibidor de la muerte apoptótica, se ha demostrado que tienen infartos menores(Chopp et al. 1996) y en humanos los niveles plasmáticos de caspasa-3 se han relacionado con un mayor tamaño de la lesión (Rosell et al. 2008).

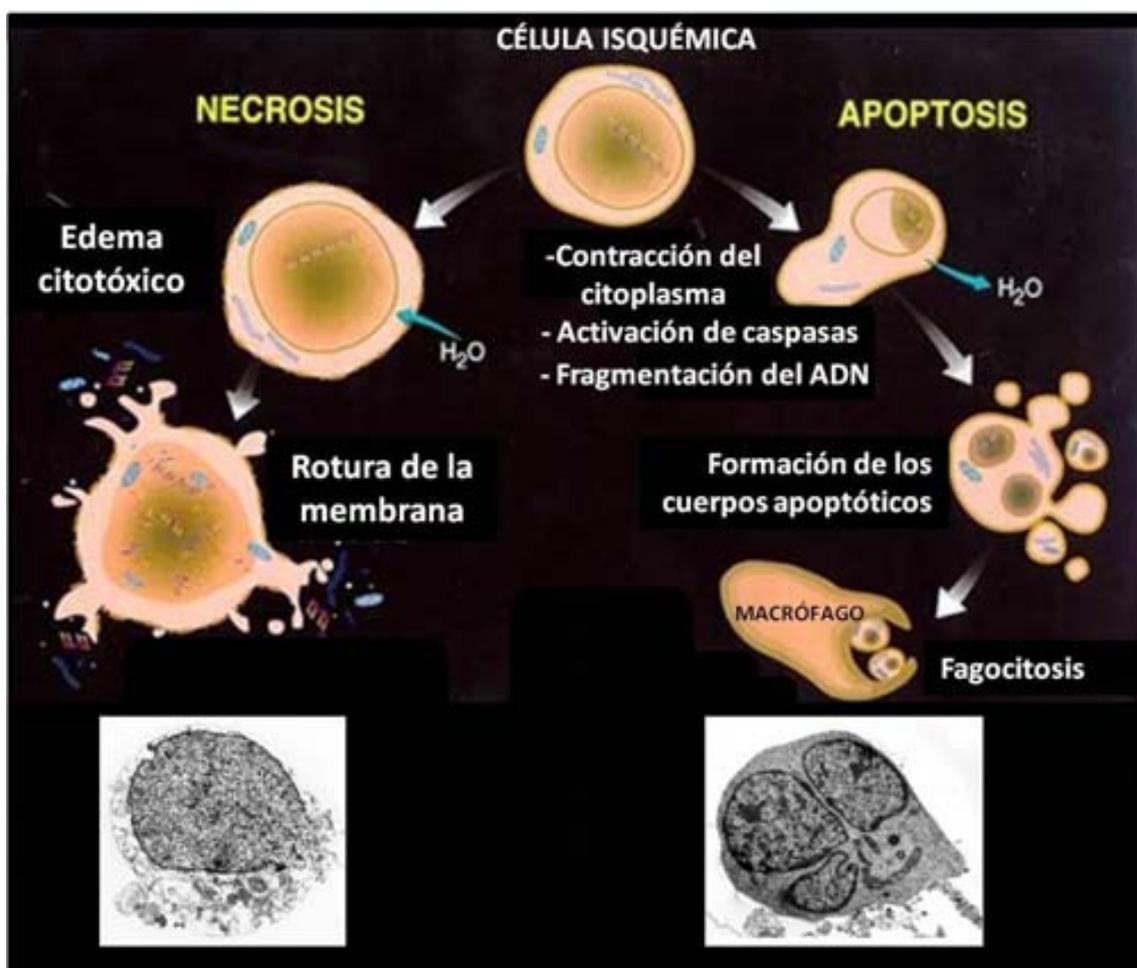


Figura 9: Esquema de los procesos de muerte neuronal vía necrosis y apoptosis. Las imágenes de la parte inferior corresponden a imágenes de microscopía electrónica de transmisión de neuronas corticales de rata en cultivo (Ueda et al. 2007). Imagen modificada de <http://medicinembbs.blogspot.com.es/2011/03/programmed-cell-death-apoptosis.html>.

1.4. La neuroreparación cerebral

El infarto cerebral no sólo estimula mecanismos de lesión que conducen a la muerte celular de los componentes de la unidad neurovascular (neuronas, vasos y glía) sino que también estimula mecanismos de reparación espontánea para su posterior recuperación. Estos mecanismos de reparación están basados en la formación de nuevas células y conexiones neuronales. Los mecanismos de neuroreparación nombrados según el tipo de células que recuperan son: la neurogénesis (neuronas), la gliagénesis (células gliales), la oligodendrogénesis (oligodendrocitos), la sinaptogénesis (espinas neuronales) o la angiogénesis (vasos sanguíneos) (Zhang and Chopp 2009)(Figura 10).

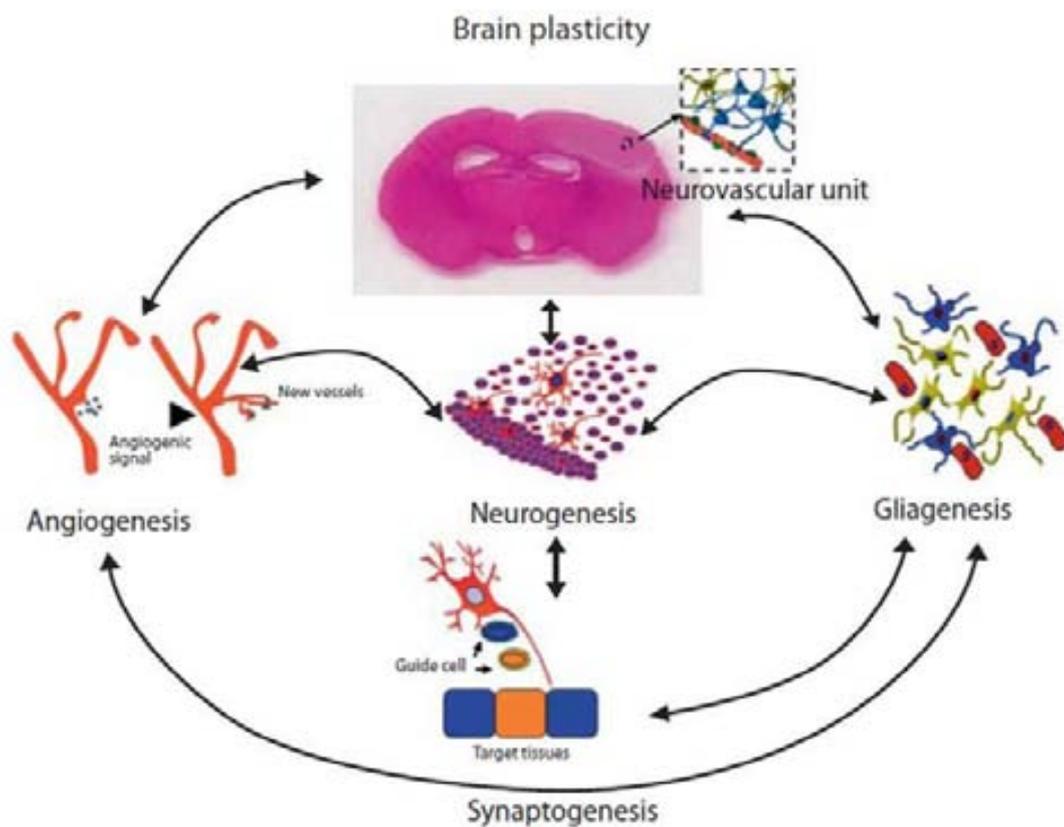


Figura 10: Esquema de los procesos de neuroreparación. Imagen obtenida de : (Gutierrez et al. 2009)

Estos eventos en conjunto permiten la mejora neurológica funcional que se produce después del infarto en la mayoría de pacientes. En el primer mes después del infarto se muestran mejoras en el sistema límbico y también en el lenguaje y otros dominios cognitivos aunque estas mejoras se pueden producir incluso de forma más extendida (durante el primer año). (Dobkin 2003)

Dentro de este conjunto de procesos que conforman la neuroreparación, por su interés en esta Tesis, se analizará más detalladamente el proceso de neurogénesis.

1.4.1. La neurogénesis

1.4.1.1. La neurogénesis en el cerebro sano

Clásicamente se creía que más allá de la etapa embrionaria el cerebro de los mamíferos era incapaz de generar nuevas neuronas y, por lo tanto, en el cerebro adulto se daba un proceso continuo de declive inevitable a lo largo del tiempo incluso en el cerebro sano (Gould and Gross 2002). Sin embargo, esta concepción cambió a partir de los trabajos de Joseph Altman (Altman 1963; Altman and Das 1965) en los que demostró que en el cerebro post-natal en rata existían regiones en las que había células en división detectadas mediante la incorporación de timidina tritiada. Esta generación de nuevas neuronas actualmente se ha caracterizado en diversos modelos animales (Lois and Alvarez-Buylla 1994; Doetsch 2003) y en humanos (Eriksson et al. 1998; Sanai et al. 2004; Curtis et al. 2007).

La neurogénesis engloba el proceso en el que se generan nuevas neuronas a partir de la proliferación de células madre localizadas en zonas específicas del cerebro que tienen capacidad para generar nuevas células las cuales migran a otras regiones cerebrales, se diferencian a distintos tipos de células maduras y son capaces de integrarse en nuevos circuitos funcionales (Gage 2000).

1.4.1.1.1. *Los nichos neurogénicos*

La proliferación celular se da principalmente en dos zonas delimitadas del cerebro: la zona subventricular de los ventrículos laterales (ZSV) (Figura 11a) y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (ZSG). Estas zonas se conocen con el nombre de nichos neurogénicos (Alvarez-Buylla and Lim 2004; Lie et al. 2004). En esta tesis nos centraremos únicamente en el nicho neurogénico de la ZSV ya que es un reservorio de células madre mucho mayor que la ZSG (Lois and Alvarez-Buylla 1994; Morshead et al. 1994)

Algunos autores han apuntado la posibilidad de que haya otras regiones neurogénicas intraparenquimatosas (Gu et al. 2000) que pueden ser activadas después de un infarto aunque aún no hay consenso sobre este tema (Lichtenwalner and Parent 2006; Shimada et al. 2010).

En el caso de la ZSV hay diversos tipos celulares que son los responsables de la generación de nuevas células neuronales o gliales como se muestran en la Figura 11b ordenados progresivamente según van restringiendo su capacidad de diferenciación (McKay 1997).

- Células madre neuronales o de tipo B: tienen características de tipo astrocitario (Doetsch et al. 1999; Alvarez-Buylla and Lim 2004) ya que tienen la morfología, ultraestructura y marcadores de astrocitos. Probablemente comparten origen con la glía radial embrionaria (Merkle et al. 2004). Son consideradas células multipotentes. Se dividen lentamente y su capacidad de división es ilimitada a lo largo de la vida del organismo mediante divisiones simétricas (las 2 células descendientes son idénticas). Dan lugar a células progenitoras neuronales (CPNs) mediante divisiones asimétricas (una célula descendiente es igual a la célula de la que provienen y la otra es distinta, en este caso una CPN).

- Células progenitoras neuronales o de tipo C: Son células progenitoras amplificativas que se producen a partir de las células B. Estas células tienen la propiedad de dividirse rápidamente aunque su capacidad de división es limitada. Habitualmente son uni o bipotentes. Mediante divisiones asimétricas dan lugar a los neuroblastos migradores.

- Neuroblastos migradores o de tipo A: Son las células con capacidad de migración que salen de la ZSV y migran hacia su destino final. Solo tienen divisiones simétricas (Chenn and McConnell 1995; Gotz and Huttner 2005). Son células unipotentes ya que son específicas de linaje. En su lugar de destino se produce la maduración y según su linaje se pueden convertir en neuronas, glía u oligodendrocitos.

A parte de las células madre y progenitoras hay otros tipos celulares que confieren un microambiente muy específico al nicho que son:

- astrocitos: promueven la proliferación, migración y diferenciación de las células progenitoras (Lim and Alvarez-Buylla 1999; Song et al. 2002)

- capilares sanguíneos: son una fuente de moléculas señaladoras que afectan a la proliferación en la ZSV (Alvarez-Buylla and Lim 2004; Tavazoie et al. 2008)

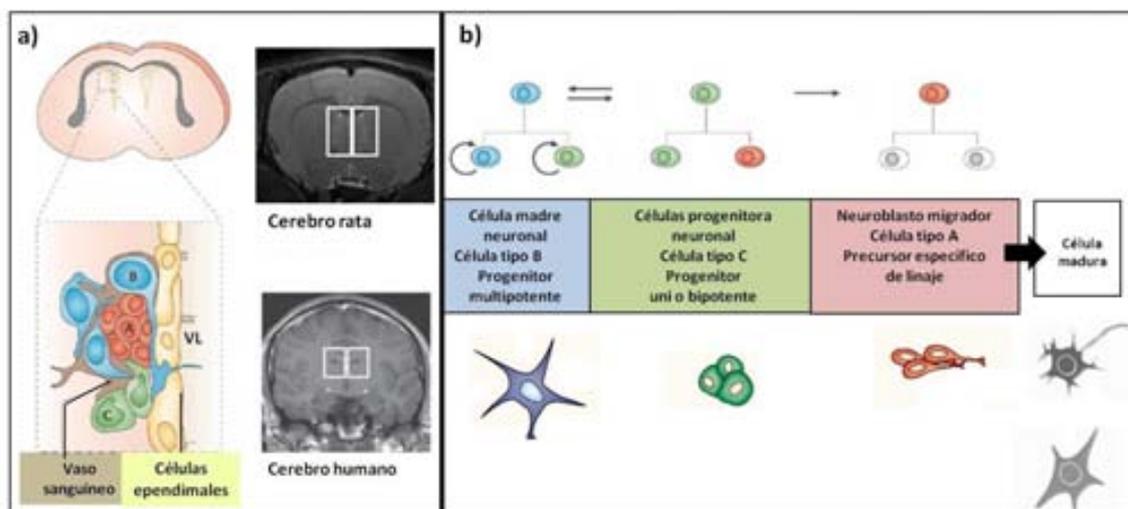


Figura 11: Neurogénesis en las zonas subventriculares laterales. **a)** Esquema representativo de la localización de la ZSV gráficamente y en imágenes de resonancia de cerebro de rata y humano. También se muestra gráficamente una amplificación de la ZSV donde se muestra la distribución de los distintos tipos celulares (A, B y C) en la región. **b)** Esquema de la generación de los distintos tipos celulares y sus características. Abreviaturas: VL=ventrículo lateral. Imagen modificada de (Martino and Pluchino 2006; Alvarez-Buylla et al. 2001; Arias-Carrion et al. 2007)

1.4.1.1.2. Migración de las células

Uno de los factores claves para la integración de las nuevas células en circuitos funcionales es la capacidad migratoria que tienen los neuroblastos. Sin embargo esta migración es distinta en la ZSV o la ZSG del hipocampo (Cayre et al. 2009).

En el cerebro sano de mamíferos se ha demostrado como las células que se producen en la ZSV migran largas distancias de forma continua y tangencial hacia la zona del bulbo olfatorio (Luskin 1993; Lois and Alvarez-Buylla 1994) en un trayecto definido que se denomina corriente migratoria rostral (del inglés, *rostral migratory stream* (RMS)) (Figura 12a) en el que los neuroblastos migran formando cadenas rodeados por estructuras tubulares formadas por astrocitos (Lois and Alvarez-Buylla 1994; Thomas et al. 1996; Peretto et al. 1997) hacia el bulbo olfatorio (BO) donde maduran y se integran para reemplazar a las interneuronas.

1.4.1.2. Neurogénesis post-isquemia

La isquemia cerebral altera el patrón de neurogénesis de 2 maneras (Figura 12b):

- Aumenta la proliferación celular en la ZSV, especialmente en la ZSV ipsilateral tanto en animales (Arvidsson et al. 2002) como en humanos (Marti-Fabregas et al. 2010).
- Los neuroblastos de la ZSV, principalmente de la ZSV ipsilateral, migran de forma lateral a las áreas afectadas por el infarto (Jin et al. 2003; Thored et al. 2006; Zhang et al. 2007)



Figura 12: Representación gráfica de la proliferación de las CPNs en la ZSV y migración en **a)** el cerebro de un roedor sano y **b)** en roedor con infarto focal donde se puede observar las células migran en la dirección del infarto. Abreviaturas: LV= Ventrículo lateral, ZSV= Zona subventricular, BO= Bulbo olfatorio, CC= cuerpo calloso, CPN= célula progenitora. Imagen modificada de: (Ming and Song 2005; Zhang et al. 2005).

1.4.1.2.1. Proliferación en las Zonas Subventriculares

El aumento de la proliferación en la ZSVs es debido a que se producen cambios en la cinética y características de la proliferación de las CPNs:

- En la ZSV de roedores con infarto se ha detectado que aumenta la división simétrica en lugar de la asimétrica (Zhang et al. 2004b) para aumentar el número de CPNs y se expande el área de la ZSV (Parent et al. 2002).
- Se reduce la duración del ciclo celular y más células reentran el ciclo celular después de la mitosis. (Zhang et al. 2006; Zhang et al. 2008b)
- Las CPNs en la ZSV aumentan de 1,5-3 veces después del infarto y se detecta un máximo de proliferación entre 7-10 días post-infarto (Lichtenwalner and Parent 2006).
- Aunque se creía que la neurogénesis post-isquemia era transitoria hay evidencia de que se alarga aproximadamente 1 año como mínimo (Thored et al. 2007)

Se han descrito factores debidos al infarto que pueden intervenir en los cambios del patrón de proliferación en estas zonas como serían cambios en el flujo sanguíneo en los nichos neurogénicos, que puede inducir neurogénesis(Shimada et al. 2010), la microglía activada que en el caso de la ZSG correlaciona negativamente con el número de células progenitoras (Lichtenwalner and Parent 2006) y la inflamación que también actúa como inhibidora de la neurogénesis en el hipocampo (Monje et al. 2003).

1.4.1.2.2. Migración

La migración de los neuroblastos fuera de la ZSV después de un infarto se produce de forma lateral. De forma más discreta pero similar a como lo hacen en el RMS, migran formando cadenas, en estrecha asociación con las vasos sanguíneos (Ohab et al. 2006; Thored et al. 2007). El patrón de migración se ha descrito que es en oleadas, es decir, con concentración en periodos concretos de tiempo a lo largo de la recuperación post-infarto. La migración de los neuroblastos empieza 3 ó 4 días después del infarto y continúa durante semanas manteniéndose hasta los 4 meses después del infarto(Thored et al. 2007)

La velocidad de migración de los neuroblastos es elevada en el estriado. Zhang y colaboradores (Zhang et al. 2009) determinaron en cultivos organotípicos de cerebro de ratón con oclusión permanente de la arteria cerebral media, que a los 7 días post-infarto la velocidad de migración de los neuroblastos era aproximadamente de 30µm/hora. También se determinó que los neuroblastos migran preferentemente a la zona del estriado en lugar del neocortex (Zhang et al. 2005). Esta migración se produce a expensas de la que se produce en el cerebro sano y que va de la ZSV al BO (Kernie and Parent 2010).

Muchos estudios en la actualidad se están dirigiendo a elucidar los factores que dirigen y modulan la proliferación y la consiguiente migración de los neuroblastos a la zona peri-infarto. Son de interés los factores de crecimiento que estimulan la proliferación en la ZSV como por ejemplo el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Wang et al. 2007)

También se han descrito varios factores moleculares que se secretan en el infarto durante el proceso inflamatorio y que actúan como quimiotróficos dirigiendo la migración de las células a la zona peri-infarto. Un ejemplo sería el factor derivado del estroma 1α (SDF- 1α) que secreta la glía reactiva en la región de infarto y los neuroblastos que expresan su correspondiente receptor CXCR4. Así, los neuroblastos son atraídos hacia la zona lesionada (Cui et al. 2009).

1.4.1.3. Supervivencia y diferenciación

Se ha demostrado que algunas de las nuevas células que migran desde la ZSV sobreviven en el área peri-infarto y maduran (Yamashita et al. 2006) expresando marcadores del fenotipo de las neuronas que han muerto debido al infarto (Arvidsson et al. 2002; Parent et al. 2002).

A pesar de la detección de estas células integradas en la zona peri-infarto, muchas de las nuevas células no sobreviven en el ambiente de esta zona, de hecho, el 80% de las nuevas neuronas mueren entre 2 y 5 semanas después del infarto (Nadareishvili and Hallenbeck 2003) por procesos apoptóticos mediados por caspasas (Kokaia et al. 2006). Arvidsson y colaboradores (Arvidsson et al. 2002) demostraron que en ratas a las 6 semanas sólo un 0,2% de las neuronas que mueren debido a un infarto son reemplazadas por el proceso de neurogénesis.

Estos datos hacen suponer que la neurogénesis, en los niveles en los que se da (sin intervención externa) en el cerebro tanto de humanos como de animales, reemplaza pocas neuronas en el área de infarto, con lo que tal vez su función no sea el propio reemplazo de neuronas sino el aporte de moléculas tróficas que minimicen el daño y ayuden a la recuperación de la zona afectada (Ohab et al. 2006).

Hay que tener en cuenta que el periodo en el que la neurogénesis está activa es concomitante con la recuperación motora espontánea tanto en animales como en humanos (Ward and Cohen 2004) y cognitiva, como se ha visto por trasplantes celulares en humanos (Stilley et al. 2004), aunque asociar estas mejoras

exclusivamente a la acción de la neurogénesis post-isquemia podría ser exagerado (Kernie and Parent 2010).

1.5. Terapia con Citicolina

La Citidina-5'-difosfocolina o CDP-Colina está compuesta por una citidina (un nucleósido) y una colina unidas por un enlace difosfato (Figura 13). A nivel de fármaco este compuesto se conoce con el nombre de Citicolina (Secades 2011).

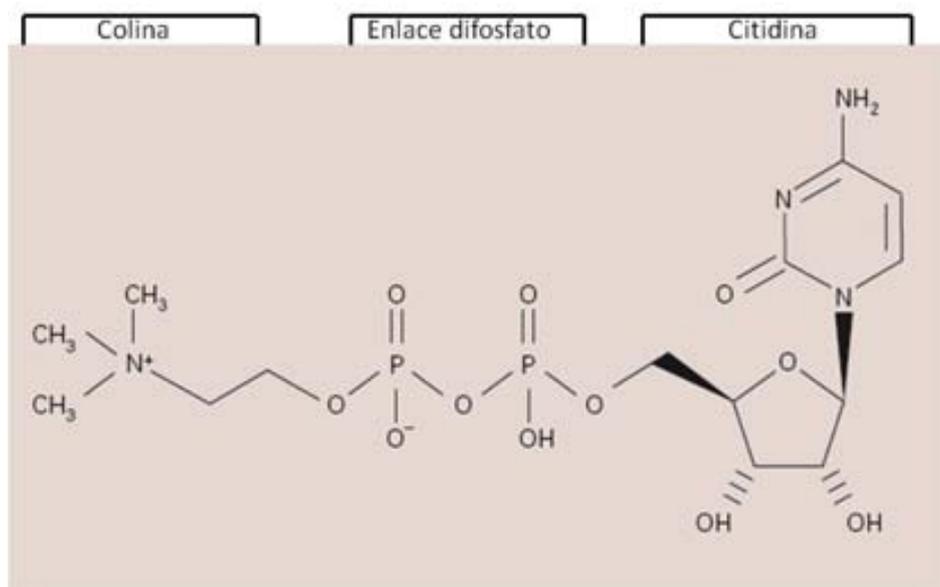


Figura 13: Estructura química de la CDP-colina o citicolina. En la parte superior de la figura se indica el nombre de los grupos funcionales que la componen. Imagen modificada de: (Secades 2011)

La CDP-colina Es un intermediario de la síntesis de la fosfatidilcolina (PtdCho) (Figura 14), que es uno de los principales fosfolípidos de las membranas celulares en las células eucariotas junto con la fosfatidiletanolamina, el fosfatidilinositol y la esfingomiélin.

Sin embargo, la Citicolina administrada como fármaco no es incorporada al cerebro como CDP-colina ya que una vez administrado, en sangre es rápidamente hidrolizada en sus dos componentes principales: la citidina y la colina(Lopez-Coviella et al. 1995). Los componentes suministrados son los que permitirán resintetizar la CDP-colina de forma endógena a partir de la colina.

Por lo tanto, la utilización de la Citicolina puede contribuir a una aceleración o a un aumento de la síntesis de estos fosfolípidos o de sus precursores(Hurtado et al.).

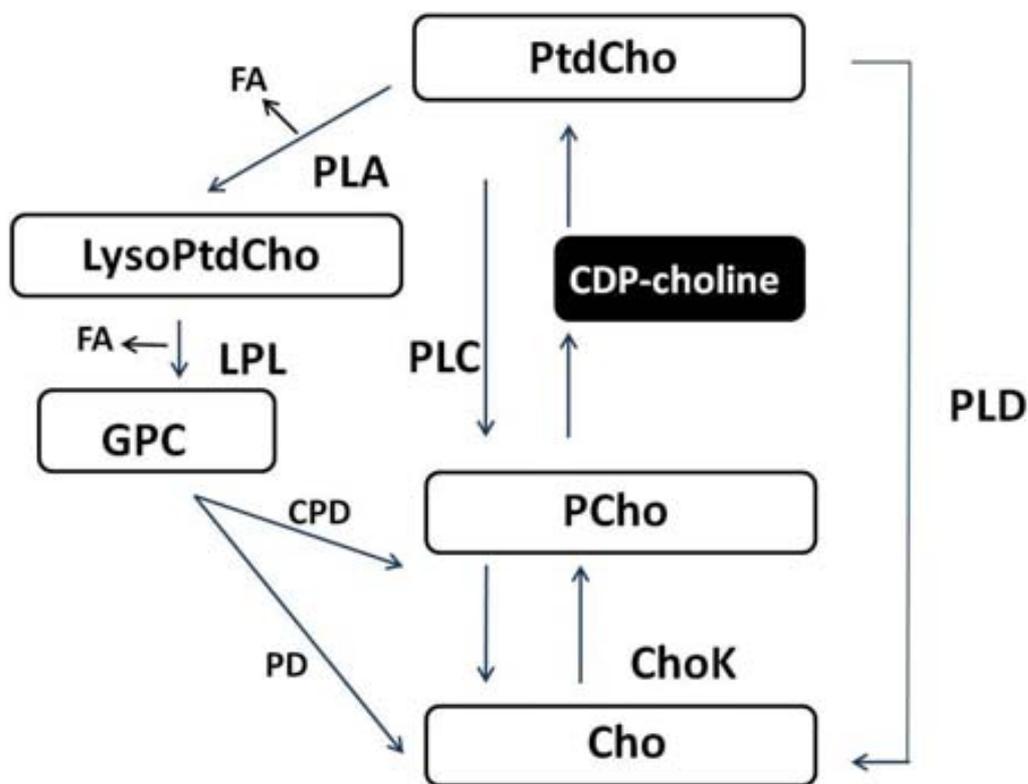


Figura 14: Diagrama de la síntesis de fosfatidilcolina a partir de la colina. Abreviaturas: Cho=colina, PCho= Fosfocolina, CDP-choline = Citidina-5'-difosfocolina. PtdCho= Fosfatidilcolina, LysoPtdCho = Lisofosfatidilcolina, GPC = Glicerofosfocolina, ChoK = Colina quinasa, PLA/PLC/PLD = fofolipasas A/C /D, LPL = lisofosfolipasa, CPD=colina fosfodiesterasa, PD= fosfodiesterasa, FA= ácidos grasos. Imagen modificada de: (Mandal 2007)

La Citicolina, por su acción sobre las membranas puede actuar a varios niveles tanto en la fase aguda como en la fase crónica del infarto (Secades 2011)(Figura 15).

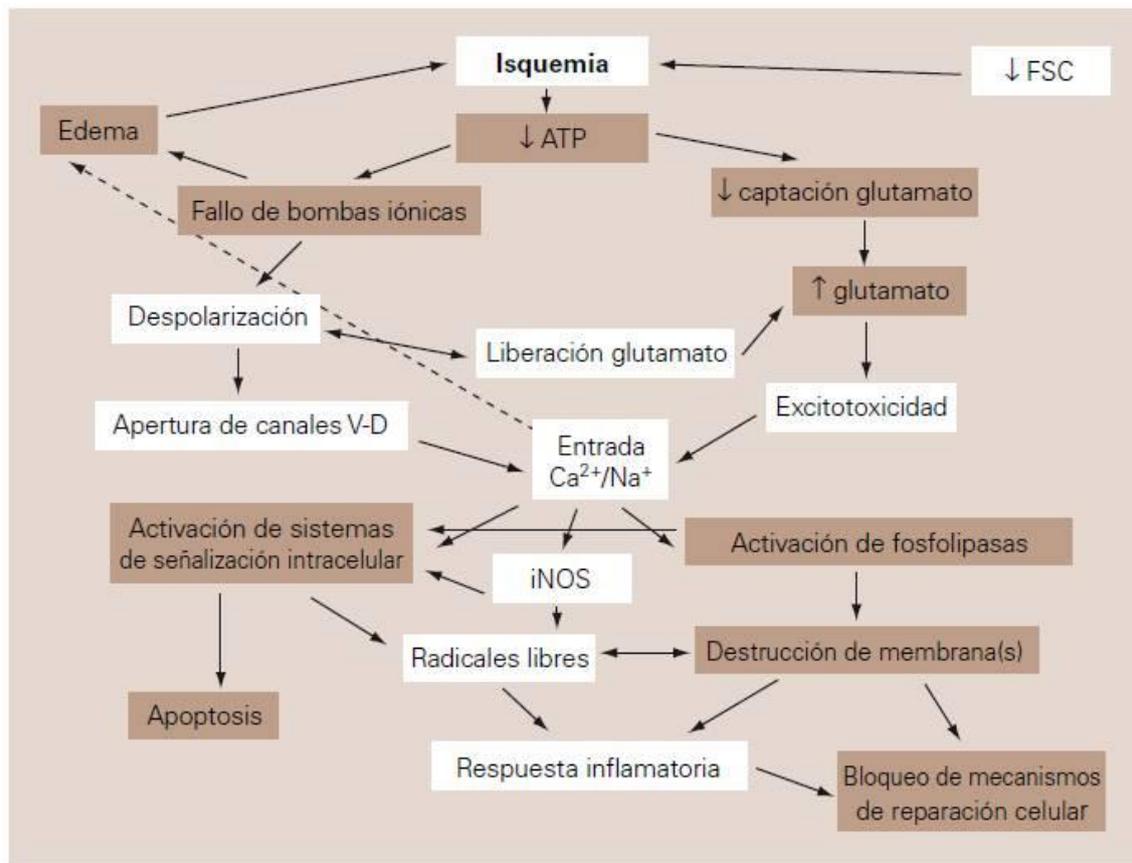


Figura 15: Esquema de la cascada isquémica en el que se muestra las etapas en las que la Citicolina ha demostrado tener algún efecto farmacológico (indicadas en los recuadros más oscuros). Abreviaturas: FSC= flujo sanguíneo cerebral, canales V-D= canales dependiente de voltaje , iNOS=sintasa de óxido nítrico inducible. Imagen obtenida de: (Secades 2011)

La Citicolina actúa en fase aguda sobre el metabolismo lipídico celular, previene la liberación de ácidos grasos, preserva los niveles de cardiolipina y esfingomielina, estimula la síntesis de la fosfatidilcolina (PtdCho), reduce el ácido araquidónico que es responsable de la inhibición de la bomba Na^+/K^+ (reducción del edema citotóxico), tiene efectos antiglutamatérgicos y actúa sobre la peroxidación lipídica debida a los radicales libres a través del incremento de la síntesis de glutatión que es antioxidante (Adibhatla et al. 2001). La mayoría de sus efectos se pueden deber a la inactivación de la fosfolipasa A_2 (Adibhatla and Hatcher 2003). En última instancia, esta protección se traduce en una disminución de la muerte celular (Krupinski et al. 2002; Lee et al. 2009).

A nivel de neuroprotección los ensayos preclínico con Citicolina han sido muchos y muy extensos y ofrecían buenos indicadores de mejor recuperación funcional. Una revisión detallada actualizada a 2010 se puede encontrar en (Secades 2011).

La Citicolina también puede tener efectos sobre los procesos de neurorreparación. En este campo no hay tantos trabajos publicados y los mecanismos por los cuales el fármaco puede mejorar la neurorreparación aún no están establecidos claramente. Sin embargo se han detectado efectos positivos sobre la neurogénesis post-isquemia en la ZSV y la ZSG del hipocampo (Hurtado et al. 2007; Diederich et al. 2012) y la angiogénesis (Secades 2012).

1.6. Bases fundamentales de la resonancia magnética

La resonancia magnética nuclear (RMN) más conocida en la práctica clínica como Resonancia Magnética (RM) para diferenciarla de otras técnicas que pertenecen al campo de la medicina nuclear y que se basan en la utilización de radioisótopos, se basa en la interacción de un campo magnético con los átomos de la materia. Esta interacción sólo es posible si los átomos tienen unas propiedades concretas.

1.6.1. Las propiedades físicas del átomo

Los átomos con números impares de protones o neutrones presentan un cierto desequilibrio de carga en su núcleo lo que les confiere un momento magnético ($\vec{\mu}$) distinto de cero. Esto les dota de una propiedad que en química cuántica se denomina espín, es decir, la capacidad de girar dicho momento magnético (un vector) sobre su

propio eje. El momento magnético (Figura 16) tiene una magnitud y una dirección concretas para cada tipo de núcleo.

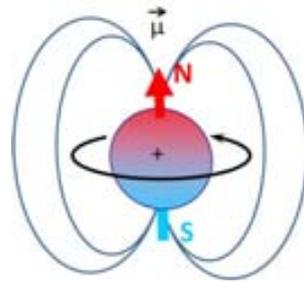


Figura 16: Diagrama representativo del momento magnético ($\vec{\mu}$) causado por el giro de un núcleo con espín nuclear distinto de cero como analogía de un pequeño imán con polo norte (N)-sur (S). Las líneas circulares indicarían las líneas de campo magnético.

Algunos de los átomos más destacados en el campo de la investigación biomédica son el protón (^1H), el carbono (^{13}C) y el fósforo (^{31}P) por sus características apropiadas de espín $I = \frac{1}{2}$ y su abundancia natural (Tabla 1).

Núcleos con interés biológico en RMN					
Elemento	Composición nuclear		Espín nuclear (I)	Cte. giromagnética (γ) ($\text{MHz} \cdot \text{T}^{-1}$)	Abundancia (%)
	Protones	Neutrones			
^1H	1	0	$1/2$	42,5774	99,985
^{13}C	6	7	$1/2$	10,784	1,10
^{31}P	15	16	$1/2$	17,2514	100

Tabla 1: Resumen de los principales átomos con momento magnético utilizados para estudios de RMN, con sus principales características para seleccionar el más adecuado para cada tipo de estudio. Fuente consultada: *MRI Basic principles and applications* (4th edition). (Mark A. Brown 2010)

Los $\vec{\mu}$ de los átomos con espín se orientan en todas las direcciones en ausencia de un campo magnético externo (B_0). Como consecuencia se anulan unos a otros y no

hay magnetización neta. En cambio, en presencia de B_0 los átomos con $I=1/2$ se alinean en dos direcciones: paralela o antiparalela con respecto a B_0 (Figura 17).

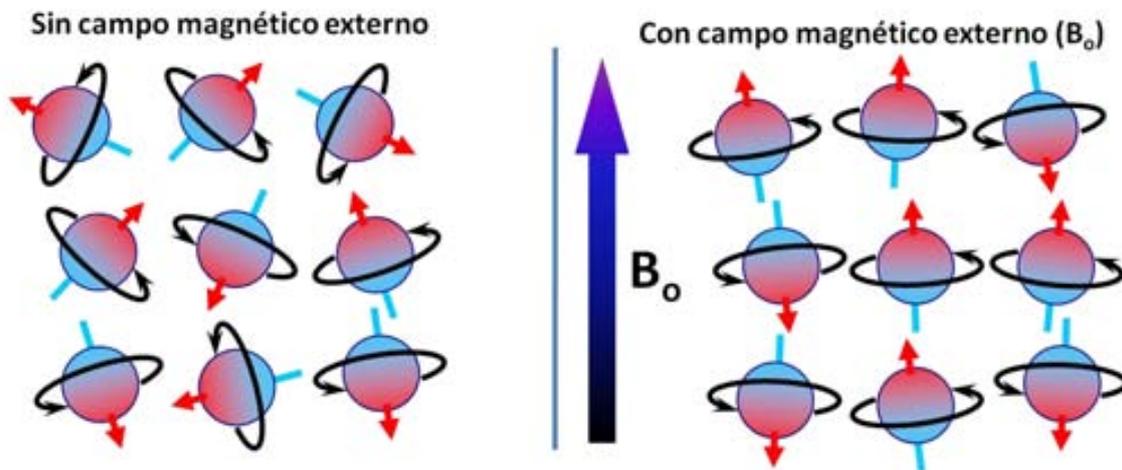


Figura 17: El efecto del campo magnético sobre los momentos magnéticos nucleares. La población de núcleos se orienta en todas las direcciones posibles por el movimiento Browniano y al aplicar un campo magnético B_0 se orientan en dos direcciones diferentes: paralela o antiparalela al campo.

Sin embargo debido a la interacción de cada $\vec{\mu}$ con B_0 su alineación no es perfectamente paralela o antiparalela (aunque para simplificar se denomine así), sino que se forma un ángulo con lo que los 2 vectores producen un par de fuerzas que llevan a cada $\vec{\mu}$ a girar alrededor del vector B_0 en un movimiento denominado precesión de Larmor (Figura 18).

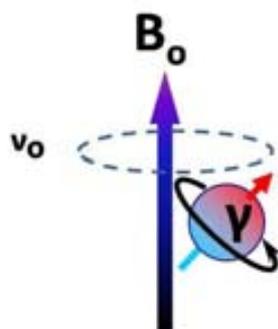


Figura 18: Representación gráfica de la precesión de Larmor. Los $\vec{\mu}$ de los átomos de la muestra giran alrededor de B_0 con una velocidad (v_0) dependiente de la constante giromagnética (γ) y el valor de B_0 .

La ecuación de la precesión de Larmor que describe la interacción entre estos átomos y el campo magnético se describe en la Ecuación 1 :

$$\nu_0 = -\frac{\gamma}{2\pi} \cdot B_0$$

Ecuación 1: Ecuación de la frecuencia de precesión de Larmor donde ν_0 = Frecuencia de precesión de Larmor (Hz), γ = constante giromagnética propia de cada átomo y B_0 = campo magnético externo.

Las dos orientaciones del $\vec{\mu}$ del átomo suponen dos niveles de energía. En presencia de B_0 la posición paralela es la de baja energía y la posición antiparalela es la de alta energía. Los núcleos se reparten de forma bastante equitativa entre los 2 niveles de energía aunque el nivel de baja energía siempre resulta favorecido en condiciones de equilibrio térmico dinámico. Los átomos con espines contrarios (paralelo y antiparalelo) anulan su magnetización. Por lo tanto, los átomos que quedan desaparejados en el nivel bajo de energía son los que crean la magnetización neta en el equilibrio térmico (\vec{M}_0), que será paralela a B_0 (Figura 19a).

El campo magnético B_0 influye en la diferencia de energía entre los dos estados (Figura 19b). Esto es importante para el fenómeno de la resonancia magnética: a mayor campo magnético más átomos se quedan alineados en el nivel de baja energía por la imposibilidad de alcanzar el nivel de alta energía, esto resultará en una mayor magnetización neta que permitirá una mayor captación de la señal durante el fenómeno de la resonancia.

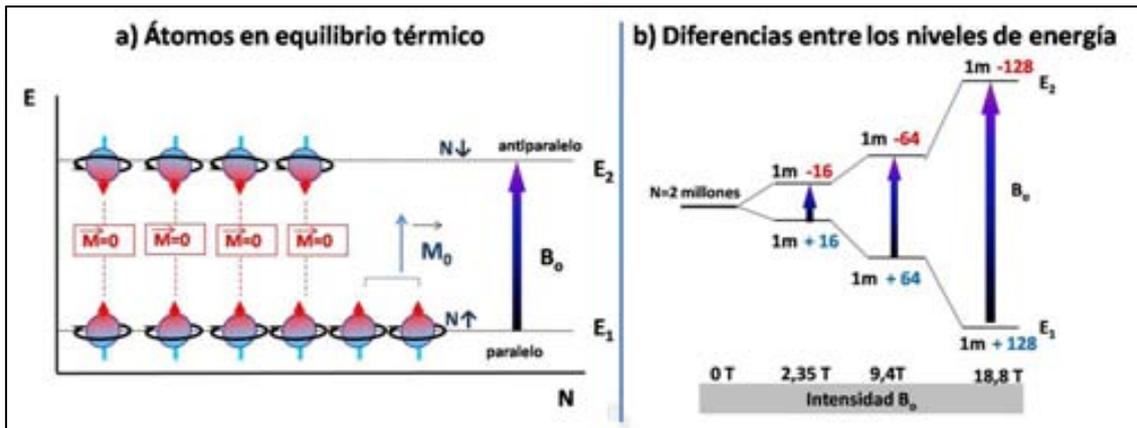


Figura 19: Representación gráfica de los átomos en equilibrio térmico. **a)** Distribución de los $\vec{\mu}$ entre el nivel de baja energía (E_1) y el de alta energía (E_2) donde se ve que está favorecido el nivel de baja energía con una magnetización neta ($\overline{M_0}$) paralela al campo magnético externo (B_0). **b)** Diferencias en los niveles de energía según la intensidad de B_0 (de 0 a 18,8T) donde se aprecia que a mayor B_0 más núcleos están desaparejados con lo que la magnetización neta será superior. Abreviaturas: $N \uparrow$ = núcleos con orientación paralela, $N \downarrow$ = núcleos con orientación antiparalela, m = millón., T = Tesla.

La diferencia energética entre los niveles de energía se determina por la Ecuación 2:

$$\Delta E = h \cdot \gamma \cdot B_0$$

Ecuación 2: Ecuación de la diferencia energética ΔE entre niveles de energía donde h = constante de Planck que correlaciona la energía con la frecuencia de giro y su valor es $h = 6,6262 \times 10^{-34}$ J·s, γ = constante giromagnética propia de cada átomo y B_0 = campo magnético externo

El fenómeno de la resonancia se basa en la capacidad de los átomos de cambiar de nivel de energía. Esto es posible aplicando campos magnéticos adicionales (B_1) en forma de pulsos de radiofrecuencia. Los pulsos de radiofrecuencia son de una potencia y duración determinada. Mientras se aplica energía se produce una excitación de los átomos que llegan al nivel alto de energía y cuando se acaba el pulso, los átomos vuelven a su estado de equilibrio térmico produciendo mientras tanto una señal eléctrica que es recogida por la bobina de recepción (Figura 20).

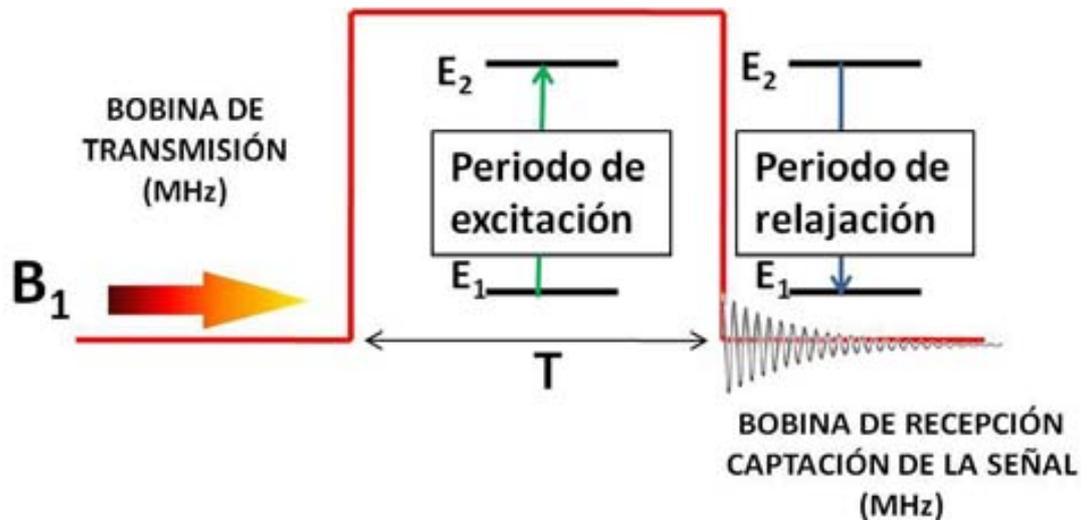


Figura 20: Efecto de un campo magnético adicional (B_1) sobre los átomos de un nivel de energía. Fenómeno de excitación/relajación. Captación de la señal mediante la bobina de recepción durante el período de relajación. E_1 = nivel de baja energía, E_2 = nivel de alta energía, T = tiempo.

Esta captación de la señal de RMN por la bobina de recepción se produce cambiando la orientación de la magnetización neta (\vec{M}) de los átomos del equilibrio térmico ($\vec{M}_0 = M_z$) al plano transversal (M_{xy}) (Figura 21).

Al aplicar B_1 en la dirección del plano xy , se produce el cambio en la orientación de la magnetización neta de un determinado ángulo (θ) y además se hace que todos los átomos tengan coherencia de fase, es decir, estén en el mismo punto en el ciclo precesional.

La componente en el plano transversal de la magnetización neta (M_{xy}) será la captada por la bobina de recepción. Esta señal es variable ya que al dejar de aplicar B_1 la magnetización volverá al estado de equilibrio térmico donde la componente de la magnetización se encuentra en la dirección del campo B_0 (M_z) y además los átomos estarán precesionando a la frecuencia de Larmor en el plano transversal solamente durante un tiempo muy corto y no siempre emitirán señal que pueda ser captada por la bobina de recepción. Este fenómeno se conoce como relajación.

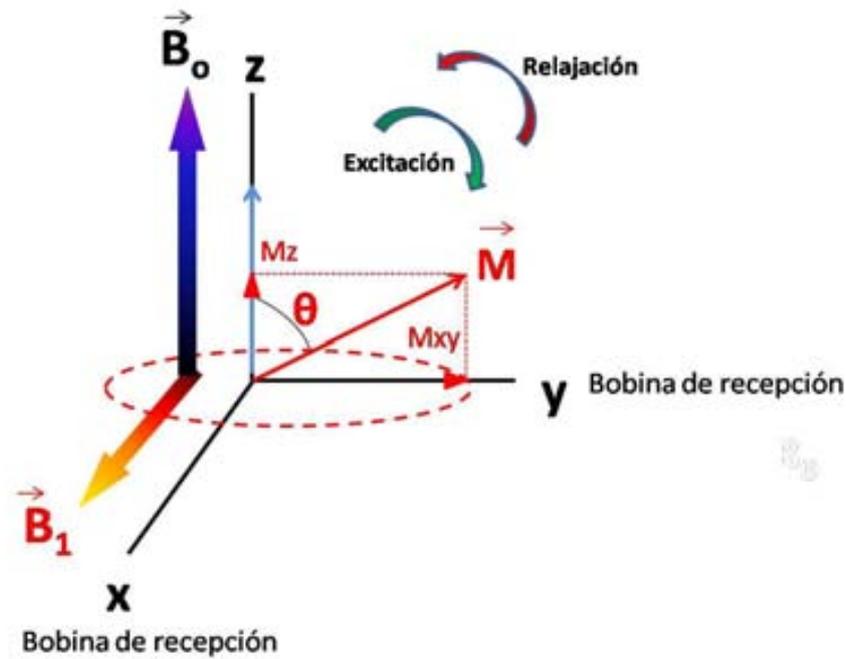


Figura 21: Representación de la perturbación de la magnetización macroscópica de una muestra en un sistema de coordenadas. La aplicación de un campo magnético adicional (B_1) perpendicular a B_0 produce que la magnetización neta se desplace un ángulo θ y se divida en sus componentes longitudinal (M_z) y transversal (M_{xy}) (Excitación). La componente M_{xy} será la señal captada por las bobinas de recepción como corriente eléctrica alterna. Al dejar de aplicar B_1 el sistema vuelve al estado de equilibrio térmico inicial (relajación).

1.6.1.1. Los efectos de la relajación

Los fenómenos que ocurren durante el período de relajación son los que en RMN dan información sobre la composición de la materia estudiada.

1.6.1.1.1. *Tiempo de relajación T_1*

El tiempo de relajación T_1 , también se denomina constante de tiempo de la relajación longitudinal, ya que está centrada en la recuperación de la componente M_z en el sistema de coordenadas mostrado en la Figura 22.

Hace referencia al tiempo en que tarda la magnetización macroscópica de la muestra en volver al estado de equilibrio térmico (M_{z_0}). La componente M_z del vector

\vec{M} va aumentando cada vez a lo largo del período de relajación por lo que la gráfica es una exponencial creciente. El tiempo que tarda en recuperar el 63% de la magnetización inicial se le denomina Constante T_1 y es propia de cada tipo de núcleo en un campo magnético determinado (Figura 22).

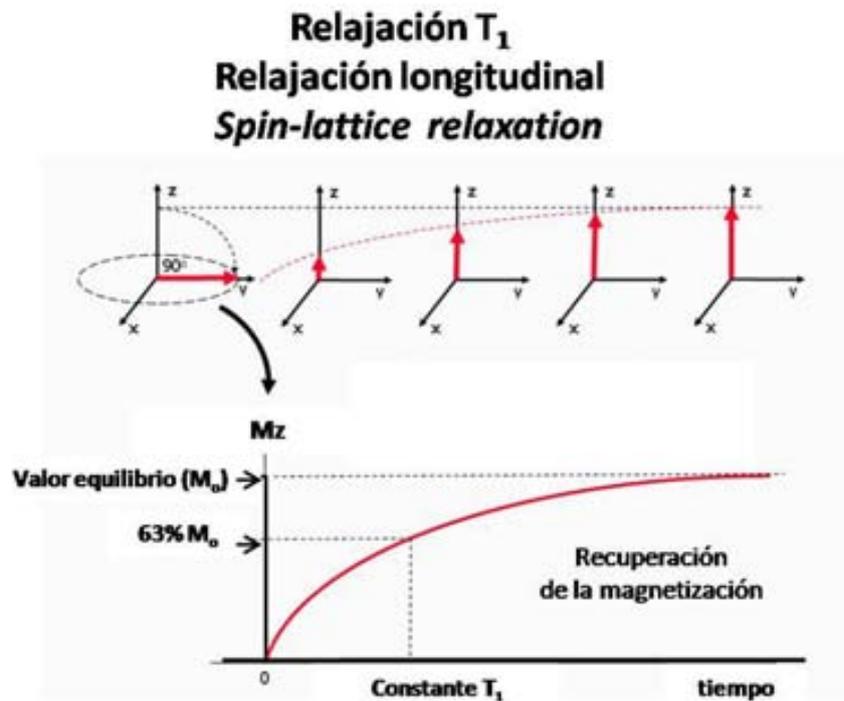


Figura 22: Representación gráfica de la recuperación de la magnetización longitudinal de una sustancia a lo largo del tiempo. Imagen modificada de (Ridgway 2010)

La ecuación que describe el fenómeno de la relajación T_1 es la Ecuación 3:

$$M_z = M_0 \cdot (1 - e^{-t})$$

Ecuación 3: Ecuación de la relajación T_1 donde M_z = componente de la magnetización en la dirección del campo B_0 , M_0 =valor de la M_z en equilibrio y t = tiempo transcurridos después de la excitación de la muestra.

1.6.1.1.2. Tiempo de relajación T_2

El tiempo de relajación T_2 o transversal se centra en la componente transversal (M_{xy}) del vector de magnetización, y por lo tanto, en la señal que es captada por la

bobina receptora. Al aplicar el pulso de radiofrecuencia todos los espines tienen coherencia de fase. Sin embargo durante el proceso de relajación esta coherencia se va perdiendo y los espines precesan a distintas velocidades. Este tipo de relajación también se denomina espín-espín ya que suele ser debido a las interacciones de los núcleos con espines que tienen alrededor.

El tiempo que tarda el sistema en perder el 37% de la coherencia de fase inicial (M_{xy}) se denomina la constante de relajación T_2 . Sin embargo la pérdida de coherencia global suele ser más rápida ya que también está afectada por posibles inhomogeneidades ya sean del campo magnético del imán o de la muestra. Al tiempo real en que el sistema tarda en perder el 37% de la magnetización inicial se le denomina constante de relajación T_2^* (Figura 23). En todos los casos T_2 es inferior o igual a T_1 ($T_2 \leq T_1$).

Relajación T_2 Relajación transversal *Spin-Spin relaxation*

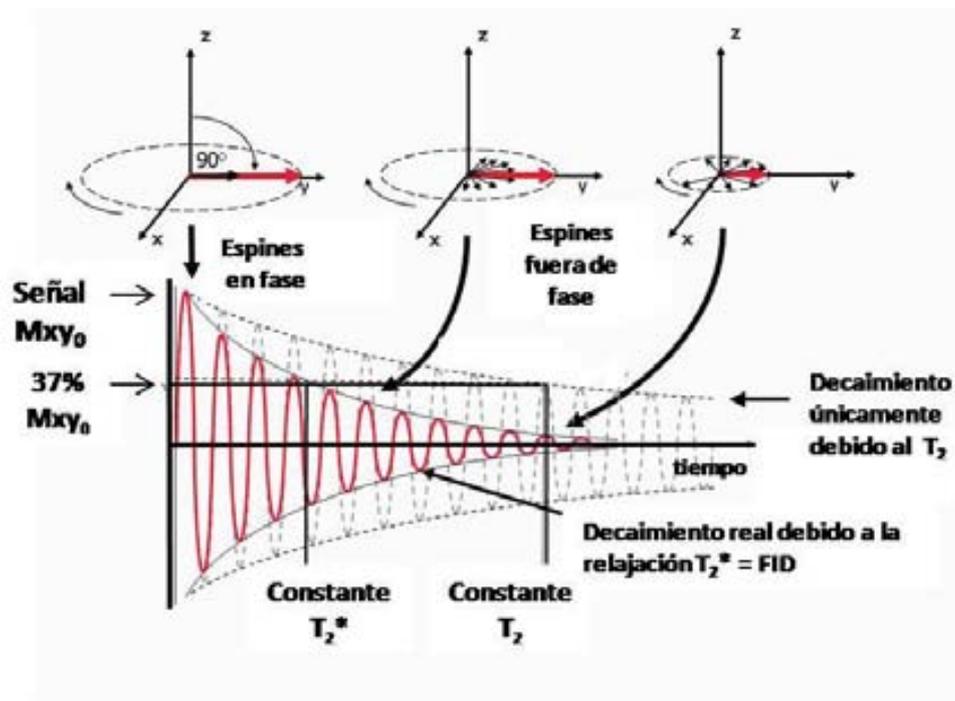


Figura 23 Representación gráfica de pérdida de la magnetización transversal de una sustancia a lo largo del tiempo. Abreviaturas: M_{xy0} = magnetización transversal inicial, FID= *Free Induction decay*= Decaimiento real debido a la relajación T_2^* . Imagen modificada de (Ridgway 2010)

La ecuación que describe el fenómeno de la relajación T_2 es la Ecuación 4:

$$M_{xy} = M_{xy_0} \cdot e^{-t/T_2}$$

Ecuación 4: Ecuación de la relajación T_2 donde M_{xy} es la magnetización perpendicular al campo (generada por un pulso de radiofrecuencia). M_{xy_0} = el valor de la magnetización xy inicial, y t = tiempo de excitación de la muestra.

1.6.1.2. Procesamiento de la señal de RMN

La señal de RMN es captada en forma de FID (*Free Induction Decay*) en función del tiempo. Aplicando el procesamiento matemático de la Transformada de Fourier a la FID se obtiene un registro en forma de frecuencias en lugar de tiempo (Figura 24) que es lo que da lugar al espectro y esto es lo que permite el desarrollo de la Imagen y la Espectroscopía.

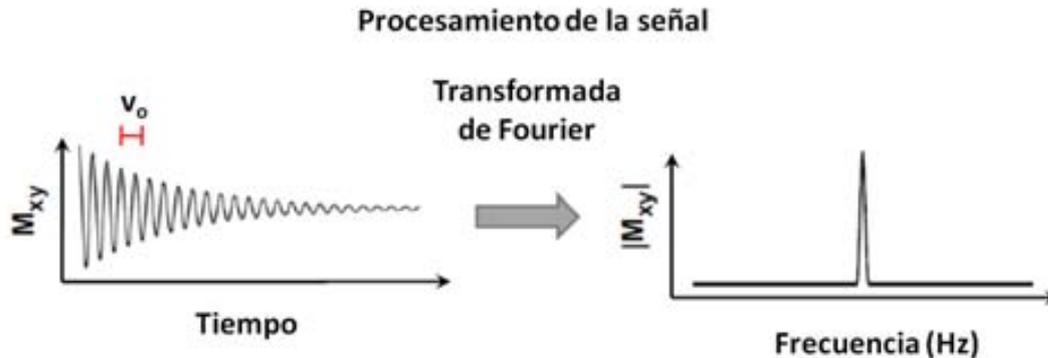


Figura 24: Esquema de la transformación de la FID (la magnetización transversal representada respecto al dominio del tiempo) registrada en un experimento de RMN, en un espectro (dominio de la frecuencia) tras la aplicación de la transformada de Fourier. Abreviaturas: M_{xy} = magnetización transversal, ν_0 = frecuencia de precesión de Larmor.

1.6.1.3. Los pulsos de radiofrecuencia

La principal función de los pulsos de radiofrecuencia es la excitación de todos los núcleos de una muestra. La idea básica es aplicar un campo eléctrico de baja intensidad según el eje x, pero de una frecuencia que corresponda con la frecuencia de Larmor de la muestra para que todos los núcleos de un cierto tipo (por ejemplo, ^1H) sean excitados.

Hasta ahora se han descrito los efectos que tendría el aplicar un pulso que dirigiera la magnetización al plano xy y captar la señal que estos produjeran. Sin embargo, los pulsos de radiofrecuencia con los que se trabaja en la actualidad se diseñan en base a parámetros como el tiempo de eco, el tiempo de repetición y el ángulo de giro para intentar maximizar las diferencias entre los diversos componentes que pueda haber en una muestra (distintas frecuencias de Larmor).

El tiempo de eco (TE) es el tiempo entre la aplicación del pulso de radiofrecuencia y la captación de la señal (fuerza electromotriz inducida). Se mide en milisegundos (ms). Tiene en cuenta los procesos de relajación T_2 ya que se basa en la duración del periodo de relajación longitudinal desde que termina el pulso de excitación hasta la detección del eco generado por la bobina de recepción.

El tiempo de repetición (TR) es el tiempo entre la aplicación de un pulso de radiofrecuencia y la aplicación del siguiente pulso. Se mide en milisegundos (ms). Tiene en cuenta los procesos de relajación T_1 ya que se basa en la duración de la relajación longitudinal entre un pulso de excitación y el siguiente.

El ángulo de giro (θ) es el ángulo que se le da al vector de magnetización con la excitación. Normalmente se trabaja con ángulos de 90° (vector de magnetización en el plano xy) y de 180° (vector de magnetización invertido en el eje z).

1.6.1.4. Los gradientes

Aparte de los pulsos de radiofrecuencia, actualmente los equipos de RMN están dotados con gradientes de campo magnético que se superponen a B_0 en las tres direcciones del espacio $G(x)$, $G(y)$ y $G(z)$. Esto modifica el campo magnético efectivo en cada punto, con lo cual cada protón resonará a una frecuencia distinta según su posición espacial, esto permite la codificación 3D que se aplica en imagen pero también la localización del vóxel en espectroscopía *in vivo* (ERM).

Para la obtención de una imagen de RMN (IRM) en un determinado plano en los ciclos de adquisición-excitación se aplican gradientes en las tres direcciones ortogonales en el espacio (Figura 25):

- Codificación espacial (*slice-selection*): la orientación del primer gradiente determina la orientación del corte.

- Codificación en frecuencia (*frequency encoding*): utiliza el gradiente de lectura (*readout gradient*). Es un gradiente de amplitud fija que generalmente se activa durante el tiempo de adquisición de la información.

- Codificación en la fase (*phase encoding*): se activa el tercer gradiente que es perpendicular al gradiente de codificación en frecuencia y se aplica entre los 2 gradientes anteriores. Este gradiente no tiene una amplitud fija y tiene efectos sobre la magnetización transversal de los espines.

La imagen 2D obtenida se basa en un conjunto de elementos digitales de imagen (*pixels*) (Figura 25b) que en realidad representan elementos de volumen del tejido (*vóxels*).

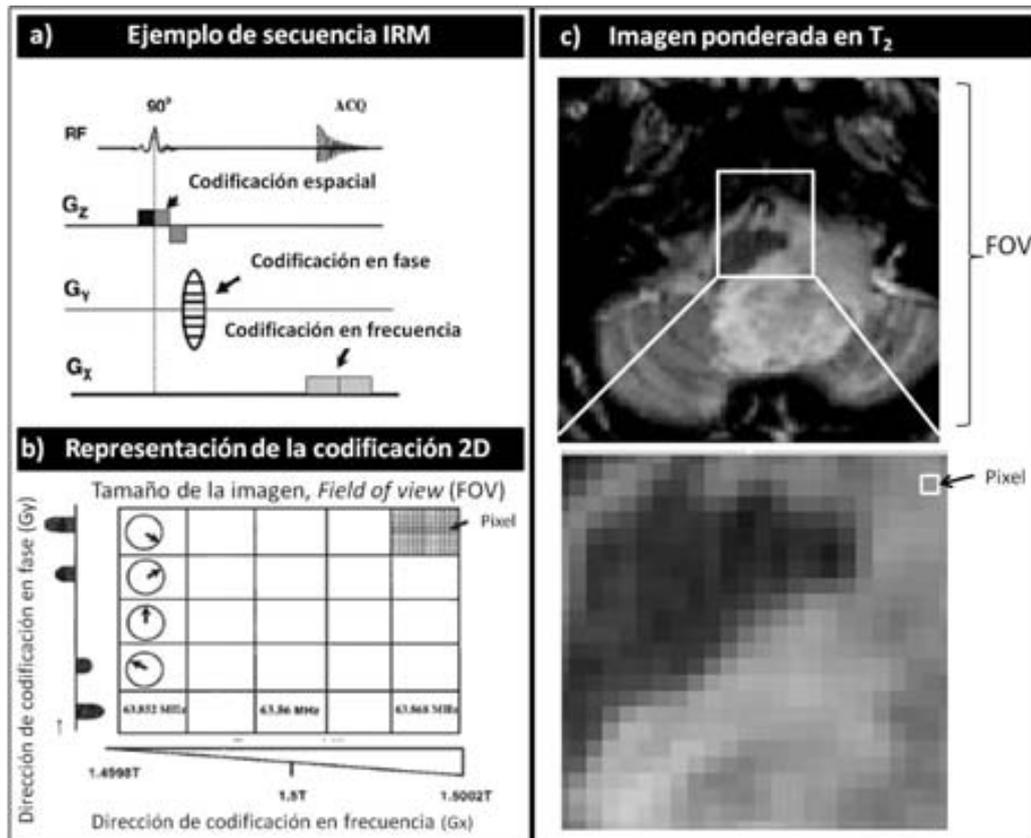


Figura 25: Secuencia de imágenes donde se muestra como se obtiene una imagen 2D **a)** Representación gráfica de la aplicación de gradientes (G_x, G_y, G_z) junto con el pulso de radiofrecuencia (RF). **a)** Secuencia de gradientes, **b)** Codificación de los gradientes en un plano 2D (en frecuencia y en fase), **c)** Imagen ponderada en T_2 de un tumor en la región del cerebro (hiperintensidad). En la parte inferior se muestra la zona delimitada por el cuadro blanco expandida de forma que se pueden apreciar los elementos digitales de la imagen (píxeles). Imagen modificada de (Mandal 2007) y <http://www.fonar.com/nobel.htm>.

1.6.2. Imagen de resonancia magnética

Actualmente la imagen por resonancia magnética (IRM) es una de las técnicas más utilizadas en la práctica clínica para el diagnóstico, ya que permite imágenes de una resolución y contraste muy elevados.

La técnica de imagen de resonancia magnética se basa en el análisis de los protones del agua (H_2O). El cuerpo humano está formado en un 80% por agua, con lo cual la señal del 1H detectable es extremadamente abundante.

El principal reto a la hora de producir imágenes por RMN útiles en clínica es el contraste. Si las moléculas de agua no tienen propiedades físicas o químicas diferentes, independientemente de la resolución, no se podrían diferenciar bien por imagen las distintas zonas de un tejido entre ellas.

En el caso del cerebro, distintas zonas (materia blanca, materia gris, líquido cefalorraquídeo...) tienen tiempos de relajación T_1 y T_2 distintos como está resumido para cerebro de rata y para varias intensidades de campo magnético en (de Graaf et al. 2006).

Por ese motivo dependiendo de lo que se quiera analizar es preferible utilizar imagen ponderada en T_1 (basada en los valores diferenciales de relajación T_1 del tejido), imagen ponderada en T_2 (basada en los valores diferenciales de relajación T_2 del tejido), imagen de densidad protónica (basada en la concentración de agua) o Imagen de difusión (basada en el coeficiente de difusión de las moléculas de agua) (Figura 26).

Las imágenes ponderadas en densidad protónica, no reciben contribuciones importantes de los efectos de relajación T_1 y T_2 , ya que únicamente se basan en la densidad de protones por zonas (concentración de agua). Para ello se utiliza un TE corto (minimiza los efectos de T_2) y TR largo (minimiza los efectos de T_1). En estas imágenes las zonas hiperintensas son debidas a una mayor concentración de agua.

Las imágenes ponderadas en T_2 se usan cuando hay diferencias en los valores de relajación de T_2 entre los distintos tejidos de interés. Para destacar en imagen esas diferencias se utilizan valores de TE largos (maximiza los efectos de T_2 para que se muestren las diferencias entre las zonas de interés) y valores de TR largos (minimiza los efectos de T_1). En este tipo de imágenes, las zonas de agua libre, como por ejemplo el líquido cefalorraquídeo (constantes de T_2 elevadas en comparación con el agua del tejido) son las que aparecen como zonas hiperintensas.

Las imágenes ponderadas en T_1 se usan cuando hay diferencias en los valores de T_1 entre los tejidos de interés. Para ello se utilizan valores cortos de TE (minimiza los efectos de T_2) y tiempos cortos de TR (maximiza los efectos de T_1 antes de que se produzca la recuperación de la señal debido al tiempo de reciclaje restringido entre pulsos). En estas imágenes las zonas con T_1 largo, como es el caso del líquido cefalorraquídeo, aparecen de forma hipointensa.

A parte del contraste, otra limitación de las imágenes de resonancia magnética, es la resolución. Las moléculas de agua tienen un movimiento térmico intrínseco de difusión, esto contribuye a la pérdida de señal durante la adquisición ya que no se trata de una imagen estática. Los valores de b, se refieren al tiempo entre gradientes para el reenfoque de los espines de las moléculas de agua. La mayoría de imágenes utilizan valores de b cortos para evitar este efecto de la difusión y aumentar la intensidad la señal detectable. Hay un tipo de imagen, en cambio, que aprovecha esta difusión de las moléculas para obtener información con contraste diferencial: es la imagen ponderada en difusión.

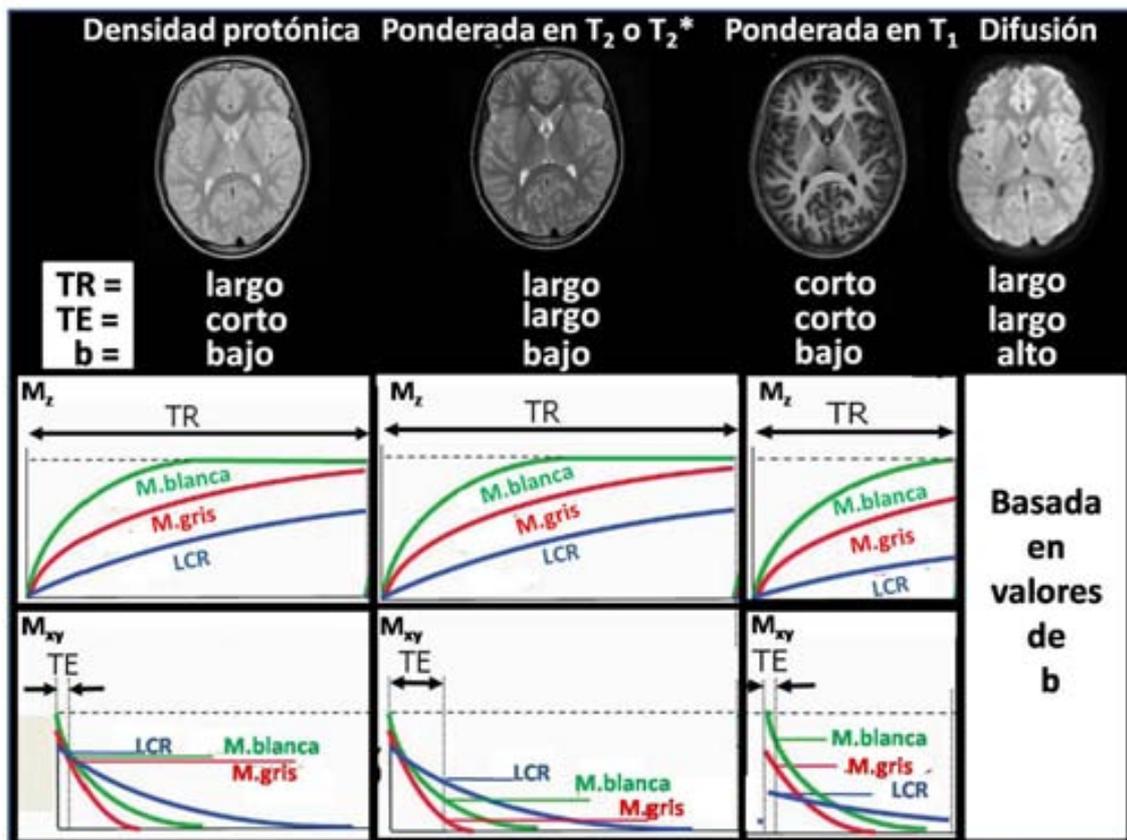


Figura 26: Representación de los distintos tipos de contraste que se pueden conseguir en imagen y los parámetros TE, TR y b que se utilizan para la maximización de las diferencias entre las distintas sustancias que generan diferencias en la intensidad aparente (contraste) de la imagen de cerebro. Imagen modificada de (Mori and Zhang 2006; Ridgway 2010).

1.6.2.1. Imagen de difusión (DWI) y mapas de ADC

La imagen de difusión se basa en la movilidad de las moléculas de agua. Éstas tienen un movimiento térmico que las hace moverse aleatoriamente en el espacio (movimiento Browniano). Este movimiento es isotrópico en el agua libre. Sin embargo, en el cerebro el movimiento del agua está restringido ya que tiene estructuras que lo limitan como las membranas celulares. Entonces el agua tiene un movimiento preferente en la dirección que no presenta barrera siendo entonces un movimiento anisotrópico.

Existen secuencias específicas de RMN que permiten obtener una imagen de difusión. Estas secuencias incorporan pares de gradientes separados por un pulso y con una duración determinada.

Para la generación de una imagen de difusión los efectos de los gradientes se cancelan el uno al otro si los espines no se mueven, mientras que si se mueven experimentan un cambio de fase. La atenuación de la señal depende de la amplitud y la dirección de los gradientes aplicados que puede ser x, y, z.

La sensibilidad de la difusión se controla por el parámetro b (Ecuación 5) que determina la atenuación de la difusión por la modificación del tiempo de duración y amplitud del gradiente de difusión. El grado de atenuación depende de la magnitud de la traslación molecular y la ponderación en difusión

$$b = (\gamma^2 \cdot g_d^2 \cdot \delta^2) \cdot (\Delta - \frac{\delta}{3})$$

Ecuación 5: Cálculo del valor de b en las imágenes DWI donde γ = constante giromagnética, g_d = amplitud del gradiente aplicado, δ = duración del gradiente y Δ = tiempo entre gradientes.

No se puede obtener el valor del coeficiente de la difusión del agua a partir de una única imagen. Para ello, es necesario adquirir varias imágenes a distintos valores de b, manteniendo constantes el resto de variables experimentales.

La ecuación de la señal obtenida después de un experimento de difusión viene dada por la Ecuación 6:

$$S = S_0 \cdot e^{-b \cdot D}$$

Ecuación 6: Cálculo de la intensidad de la señal (S). S_0 = Intensidad señal en imagen con $b=0 \text{ mm/s}^2$, D = coeficiente de difusión del agua

En un mapa de ADC (*Apparent Diffusion Coefficient*) la intensidad de cada pixel es proporcional a la difusión aparente en el vóxel correspondiente. Las zonas hiperintensas en los mapas de ADC indican mayor coeficiente (velocidad) de difusión,

por lo tanto a mayor valor de D más pérdida de señal se espera en las imágenes ponderadas en difusión.

En el caso de una lesión isquémica, la DWI permite obtener en fase temprana una imagen de la zona afectada por la isquemia, ya que los valores de ADC disminuyen a la mitad aproximadamente en dicha zona. Ello es debido al edema citotóxico que produce un aumento del volumen de las células ya que el agua difunde al interior celular, con lo que el movimiento del agua extracelular restante es más restringido (Figura 27A).

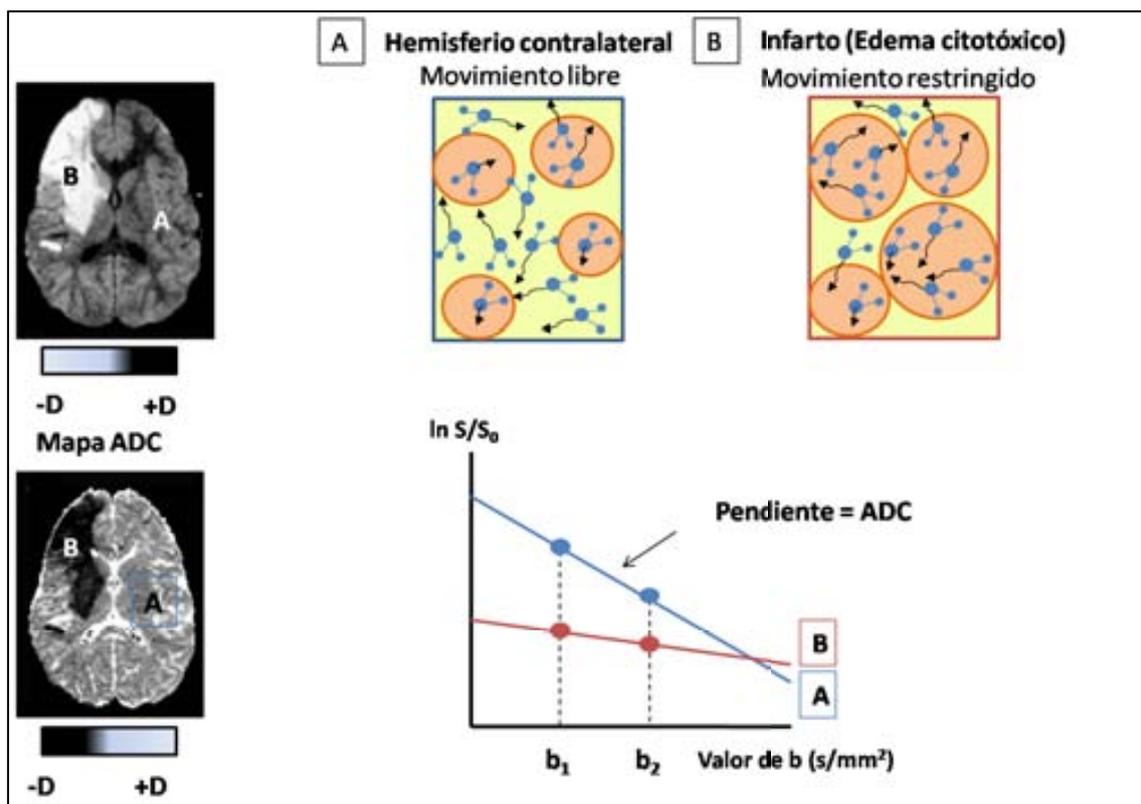


Figura 27: Esquema de imágenes donde se muestra en un cerebro humano las diferencias observables tanto por imagen ponderada en difusión como por mapa de ADC. En la parte inferior de cada imagen se muestra la leyenda de color asociada a menor (-D) o mayor (+D) difusión. En la parte superior derecha se muestra de forma representativa la distribución de las moléculas de agua en tejido sano o con edema. La grafica inferior muestra la pérdida de señal (S) en ambas regiones del cerebro a distintos valores de b . En cada uno de los apartados la letra **A** hace referencia al tejido sano y la letra **B** al tejido infartado. . Imagen modificada de (Roberts and Rowley 2003; Mori and Zhang 2006; Bitar et al. 2006)

1.6.2.2. Angiografía

La angiografía es una técnica que permite una visualización de la estructura cerebrovascular en base al flujo sanguíneo (Bradley 1992) y permite detectar anomalías en éste.

La RMN permite la obtención de angiografía utilizando las técnicas basadas en el tiempo de vuelo (*time-of-flight*, TOF) (Masaryk et al. 1990; Laub 1995).

Esta técnica consiste en la exposición de los espines de la muestra de interés a pulsos repetidos de radiofrecuencia de excitación usando TR inferiores a los T_1 del tejido estático y de la sangre. De este modo, en el tejido estático o la sangre que circula lentamente, los espines son saturados, haciendo que su magnetización longitudinal sea prácticamente nula. En cambio, en la sangre que fluye, los espines del agua no han sido excitados previamente, con lo que la magnetización longitudinal detectable es elevada, lo que resulta en una señal de IRM intensa (Wheaton and Miyazaki 2012) (Figura 28)

Teniendo en cuenta eso las técnicas de angiografía usan un TE corto para evitar la pérdida de fase de los espines y un TR corto para saturar la señal del tejido estático y así maximizar el contraste de la imagen .

Las secuencias de angiografía pueden ser 2D o 3D, es decir, en 2 dimensiones (se excita plano por plano) y 3 dimensiones (se excita un volumen). La angiografía 3D-TOF ofrece una elevada resolución, especialmente en los vasos pequeños, ya que permite realizar cortes más delgados. Sin embargo, como la técnica es sensible al flujo que entra y sale del volumen excitado los vasos con flujo lento pueden quedar saturados y perder contraste la imagen. En casos de flujo lento es más adecuado utilizar la 2D-TOF.

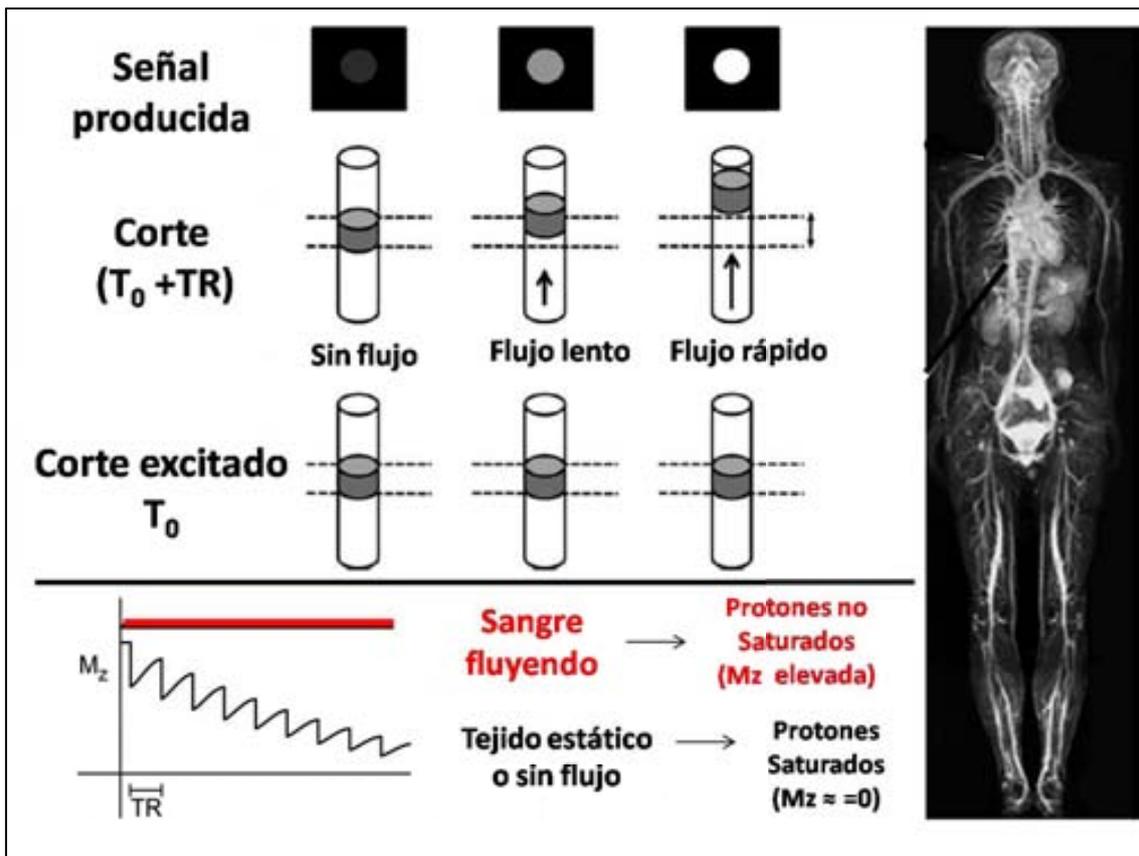


Figura 28: Esquema de imágenes donde se muestra la representación de las bases de la angiografía. Básicamente, la señal por MRI se produce al entrar nuevo flujo (no saturado) al corte o volumen que se analiza. A la derecha se puede ver una angiografía de cuerpo entero sin contraste realizada con la técnica 3D-TOF a 1,5 T. Imagen modificada de (Miyazaki and Lee 2008; Wheaton and Miyazaki 2012)

La angiografía aplicada al estudio del infarto cerebral permite en la práctica clínica detectar la oclusión de la arteria afectada y su posible perfusión posterior. También permite detectar malformaciones en el árbol vascular que pueden ser la causa de un ictus. A nivel preclínico, también es posible la obtención de imágenes de angiografía de roedores (Besselmann et al. 2001).

1.6.3. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (ERM)

En el apartado anterior se ha descrito que la imagen por resonancia magnética se basa en el estudio de la señal más intensa de los núcleos de ^1H en el tejido de estudio, la del agua. Sin embargo, el agua no es el único compuesto formado por ^1H en el cerebro, hay otros compuestos (metabolitos) que se encuentran en menor concentración y que al atenuar la resonancia del agua pasan a ser detectables.

El estudio de las variaciones de los niveles de estos metabolitos en casos de patología da lugar a los estudios metabolómicos o de patrón metabólico que cada vez están adquiriendo más relevancia en el campo del diagnóstico y pronóstico de enfermedades (Holmes et al. 2006).

1.6.3.1. Parámetros básicos de ERM

1.6.3.1.1. *Identificación de las señales del espectro*

El entorno químico de los protones

No todos los protones están afectados de la misma forma por el campo magnético. Las frecuencias de resonancia de cada núcleo en concreto se encuentran influenciadas por su entorno electrónico. Así, este entorno se opone al campo magnético externo B_0 creando un efecto denominado apantallamiento químico (Ecuación 7).

$$B_{ef} = B_0 - \sigma \cdot B_0 = (1 - \sigma)B_0$$

Ecuación 7: Ecuación del campo magnético efectivo (B_{ef}) para un núcleo. B_0 = campo magnético externo, σ = constante de apantallamiento.

Este fenómeno implica que la frecuencia de precesión (Ecuación 8) de cada núcleo no depende únicamente de la constante giromagnética (γ) y del campo magnético (B_0) sino que también hay que tener en cuenta la constante de apantallamiento (σ).

$$\text{Frecuencia real } \nu = \frac{\gamma}{2\pi} \cdot (1 - \sigma) \cdot B_0$$

Ecuación 8: Ecuación de la frecuencia real de precesión del momento magnético del núcleo que será distinta según el apantallamiento al que esté sometido.

Estas diferencias en las frecuencias reales de precesión es lo que se observa en el espectro de frecuencias que se obtiene después de aplicar la transformada de Fourier.

Las constantes de apantallamiento son muy difíciles de medir con precisión. Lo que se hace es considerar las diferencias entre cada resonancia y una resonancia de referencia (ν_{ref}). En el caso de experimentos *in vitro* los compuestos que se han utilizado de referencia con frecuencia son el ácido 3-(Trimetilsilil)- Propiónico (*TSP*) o el Tetrametilsilano (*TMS*) a los que se asignaba la frecuencia de referencia del equipo de resonancia para el campo magnético considerado (por ejemplo 400 MHz para ^1H a 9,4T).

El desplazamiento químico

Representar el espectro por frecuencias, en MHz, tiene un inconveniente y es que dependiendo del campo magnético en que se trabaje estas frecuencias variarán. Por ejemplo, un compuesto que a un cierto campo magnético apareciera a 400 MHz en un campo magnético el doble de intenso aparecería a 800 MHz. Esto puede suponer un problema a la hora de comparar resultados. Por ello, se estableció un nuevo sistema de medida que era independiente del campo magnético utilizado y que se expresaba en partes por millón (ppm). En el sistema de referencia según desplazamiento químico el TSP o TMS pasan a ser el 0 ppm.

La ecuación que se aplica para la normalización de las frecuencias es la Ecuación 9:

$$\delta = \frac{\nu_0 - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \cdot 10^6$$

Ecuación 9: Ecuación del desplazamiento químico. δ = desplazamiento químico, ν_0 = frecuencia de resonancia de un núcleo a un determinado campo magnético y ν_{ref} = frecuencia de la referencia.

En los experimentos *in vivo*, al no ser conveniente utilizar compuestos exógenos, la referencia que se suele utilizar es la frecuencia de resonancia del grupo metilo de la creatina total que es muy estable (3,03 ppm) o del agua (4,75 ppm), aunque en esta última su desplazamiento químico puede verse afectado por la temperatura.

En los espectros por desplazamiento químico el 0 ppm se sitúa a la derecha y los desplazamientos positivos sucesivamente hacia la izquierda. Los espectros de ^1H tienen, aproximadamente un rango de aparición de los metabolitos de interés de 10 ppm. Los compuestos con núcleos más apantallados aparecen a la derecha, resuenan con frecuencias más bajas ya que los campos efectivos son más altos (más oposición al campo magnético B_0) mientras que los compuestos que aparecen a la izquierda son de protones menos apantallados que resuenan a frecuencias más altas ya que los campos magnéticos efectivos son más bajos.

La multiplicidad de la señal

Además de las distintas posiciones relativas en el espectro de los grupos funcionales de una molécula (desplazamiento químico), también hay que tener en cuenta que sólo en el caso de los singuletes, dichos grupos funcionales tienen una única resonancia.

Así, hay otros grupos funcionales en las moléculas que sufren un tipo de acoplamiento espín-espín, entre los diferentes estados de espín a través de los enlaces químicos de la molécula. Este fenómeno se denomina acoplamiento J o acoplamiento escalar. Su resultado es la subdivisión de las señales en varias posiciones de desplazamiento químico distinto (estructura fina).

Si el acoplamiento es homonuclear, es decir, con otro núcleo de espín $\frac{1}{2}$ (como ^1H , ^{13}C o ^{31}P) el número de núcleos equivalentes magnéticamente (n) “divide” a la señal del núcleo acoplado en $n+1$ señales con cocientes de intensidad relativa que siguen el triángulo de Pascal (Figura 29). Entonces dichas señales con estructura fina se denominan dobletes, tripletes, cuartetos o multipletes.

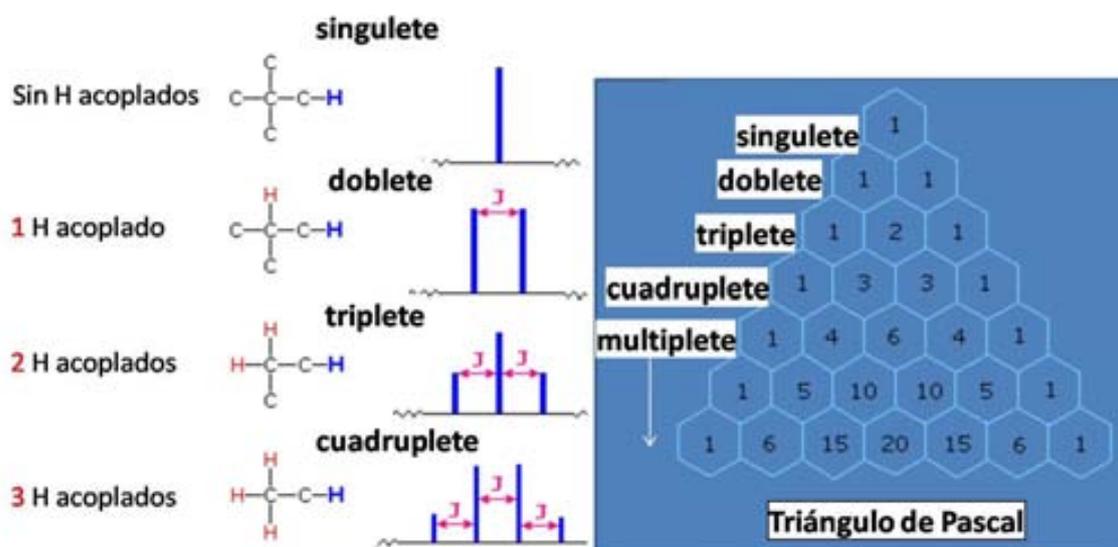


Figura 29: Representación en el espectro de los espines (azul) acoplados a unos núcleos n (rojo) y la relación de intensidades relativas entre ellos expresada por el triángulo de Pascal. Imagen obtenida de: <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/nmr/nmr1.htm>

La constante de acoplamiento (J), expresada en Hz, da información sobre la distancia que separa las distintas señales acopladas en dicha estructura fina. Esto es especialmente importante a la hora de la interpretación de los espectros de alta resolución en el cual se pueden apreciar las distintas señales con su acoplamiento escalar. En los espectros *in vivo*, en cambio, este desdoblamiento no siempre es apreciable ya que las señales se superponen debido a la mayor anchura de las resonancias individuales.

Un ejemplo claro de la multiplicidad de señal se observa en el lactato. El lactato tiene un grupo metilo $-\text{CH}_3$ (1,30 ppm) que es un doblete y también tiene el CH del

grupo metino (4,10 ppm) que es un cuarteto por su acoplamiento escalar entre los dos grupos funcionales (Figura 30).

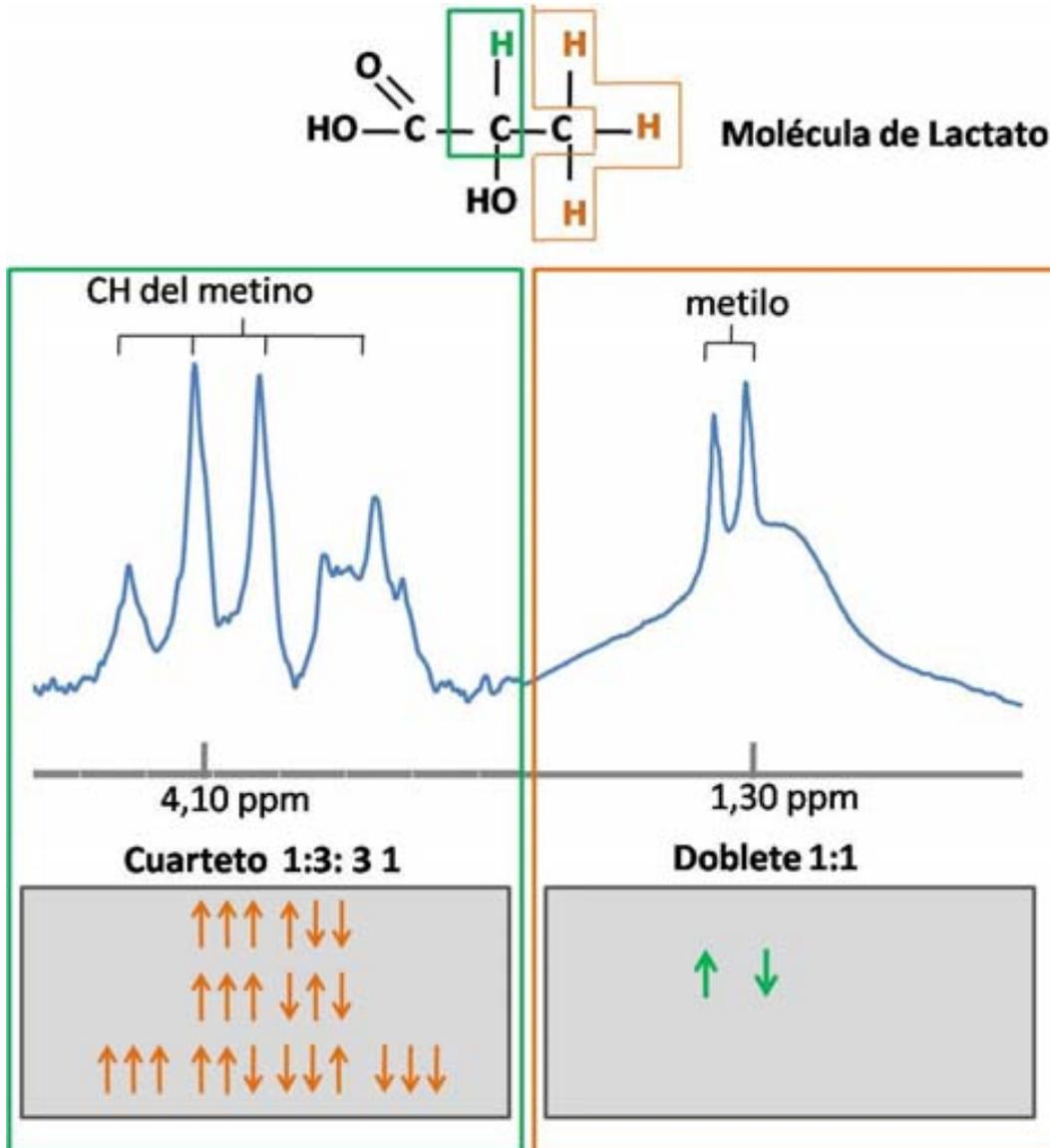


Figura 30: Esquema de una molécula de lactato (arriba) obtenido a 9,4T de una muestra de infarto cerebral en rata. En el espectro se muestran los acoplamientos escalares que se producen y en la parte inferior como las distintas posibles posiciones de los espines vecinos acoplados escalarmente a los protones del grupo funcional observado en el equilibrio dan lugar a las alturas de las señales. En espectroscopía de alto campo se pueden distinguir el doblete (centrado en 1,30 ppm) y el cuarteto (centrado en 4,10 ppm) característicos de esta molécula.

1.6.3.1.2. Características y determinación de la calidad del espectro

Los metabolitos analizados por ERM aparecen como señales que se pueden ajustar a una curva Lorentziana. Los valores que definen este tipo de formas son la altura (h), la anchura a media altura y la posición de su máximo (X_0) (Figura 31).

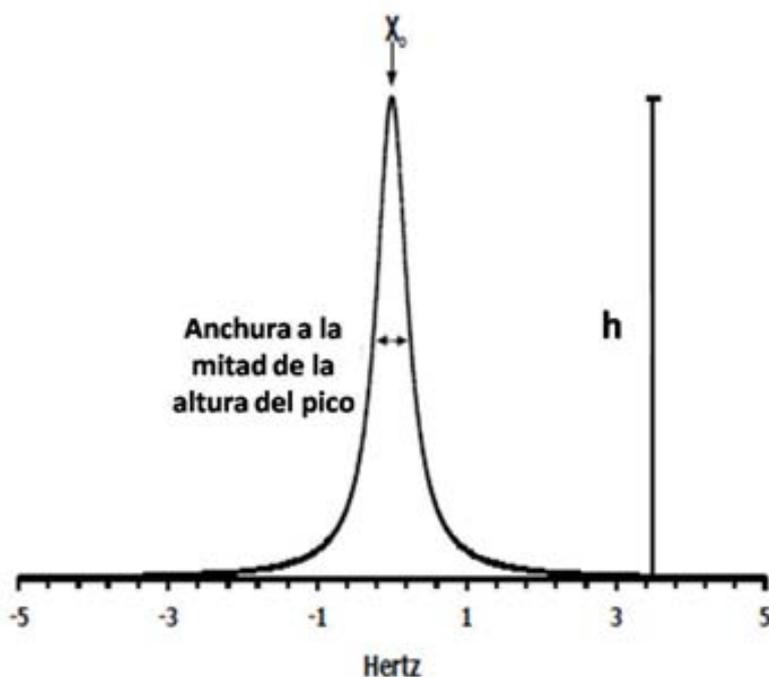


Figura 31: Representación de una curva Lorentziana tipo. Los espectros de ERM se ajustan a este tipo de curva. En el esquema se muestra la anchura a la mitad de la altura de la señal. Abreviaturas: X_0 = posición de la señal en el espectro y h = altura de la señal.

Como se ha comentado anteriormente, la posición de la señal en el espectro (X_0) es característica del grupo funcional concreto del compuesto que se estudia. Por otra parte, la anchura a mitad de la altura es una medida de la resolución del espectro que viene dada por las condiciones instrumentales de adquisición, cuanto más bajo sea el valor (más estrecho sea el pico) más calidad tiene el espectro ya que 2 señales que sean próximas serán distinguibles. Las señales se pueden ensanchar también debido a inhomogeneidades de B_0 , relajación espín-espín (T_2), intercambio químico, anisotropía de desplazamiento químico, interacción dipolar, interacción cuadrupolar (en caso de que $I > 1/2$, por lo tanto no afecta a los espectros de ^1H).

La altura (que también se puede denominar intensidad) es una medida relativa de la concentración de los núcleos que dan lugar a la señal. A igual anchura a la altura media, más altura indica mayor concentración de núcleos.

La integral o área de la señal es directamente proporcional a la concentración molar de los compuestos. Así, la cuantificación de los compuestos se puede hacer sin necesidad de estándares o curvas de calibración para cada compuesto aunque se necesita como mínimo de una referencia de concentración (interna o exógena). Teniendo en cuenta los valores de tiempo de relajación T_1 y T_2 de cada resonancia de interés y la concentración de la referencia interna se puede llegar a tener información sobre la concentración ($\mu\text{moles/g}$ tejido) de los metabolitos presentes en una determinada muestra.

Sin embargo, tal y como se ha comentado, en un espectro real, especialmente *in vivo*, no todas las señales corresponden a un único grupo funcional de una sustancia. Así, la mayoría de señales tienen contribuciones de varios metabolitos y, actualmente, a excepción de las resonancias mejor resueltas es necesario utilizar programas de *fitting* como LC Model (Provencher 1993) o jMRUI (Stefan 2009) para poder cuantificarlas.

Señal a ruido

El cociente entre la señal (altura) obtenida de los protones y el ruido de fondo es importante para cualquier técnica espectroscópica. Más en resonancia magnética, en que el cociente entre la señal y el ruido es baja, especialmente en la espectroscopía *in vivo*, comparado con otros tipos de espectroscopía. Una manera de aumentar este cociente es aumentando el número de registros de una misma muestra (*scans*), aumentando por tanto el tiempo total de adquisición del espectro, factor éste limitante también en el caso de la espectroscopía *in vivo*.

Al aumentar el número de *scans* las señales presentes irán aumentando de manera proporcional al número de registros, mientras que el ruido, por ser de naturaleza aleatoria, no se adicionará de manera coherente y su contribución no

aumentará tanto como la de las señales de interés. Teniendo en cuenta que la intensidad del ruido aumenta proporcionalmente a la raíz cuadrada del número de registros, vemos que el cociente señal/ruido (S/N) mejorará con el número (n) de registros según se muestra en la Ecuación 10:

$$\frac{S}{N} \propto \frac{n}{\sqrt{n}} \propto \sqrt{n}$$

Ecuación 10: Ecuación de la señal (S) a ruido (N) donde se aprecia como el cociente mejora significativamente con el número de *scans* (n). Símbolo \propto = proporcionalidad.

1.6.4. Espectroscopía *in vivo*

1.6.4.1. SINGLE VOXEL (SV)

La espectroscopía *in vivo* es un tipo de espectroscopía localizada del organismo (modelo animal o humano) de interés. En primer lugar se acostumbra a llevar a cabo una imagen de referencia para determinar la localización (el volumen de interés o vóxel) de dónde se obtendrá la información de tipo bioquímico.

Para la localización del vóxel se utilizan secuencias de gradientes para la excitación secuencial de los tres planos ortogonales. Las secuencias clásicas más utilizadas en RMN son las basadas en el eco de espín, descrito por Hahn en los años 50.

Por ejemplo la secuencia *Point Resolved Spectroscopy* (PRESS) utiliza el pulso de 90° para producir la magnetización transversal y hacer que los núcleos precesen de forma coherente en el plano xy, cuando estos empiezan a desfasarse se utilizan dos pulsos de 180° que se aplican en un plano perpendicular al anterior. De esta manera sólo la magnetización que es excitada por los 3 pulsos, que es la que se encuentra en la intersección de los planos de excitación, es reenfocada. Esa zona de excitación constituye el vóxel (Figura 32).

También se utilizan gradientes adicionales para destruir la magnetización de las regiones externas al vóxel de interés y pulsos selectivos a la frecuencia de resonancia del agua *Chemical Shift Selective* (CHESS) previos al resto de la secuencia para atenuar

su señal. Las principales ventajas de la secuencia PRESS respecto a otras secuencias de espectroscopía localizada es que al producir el reenfoque aumenta la señal a ruido de los espectros.

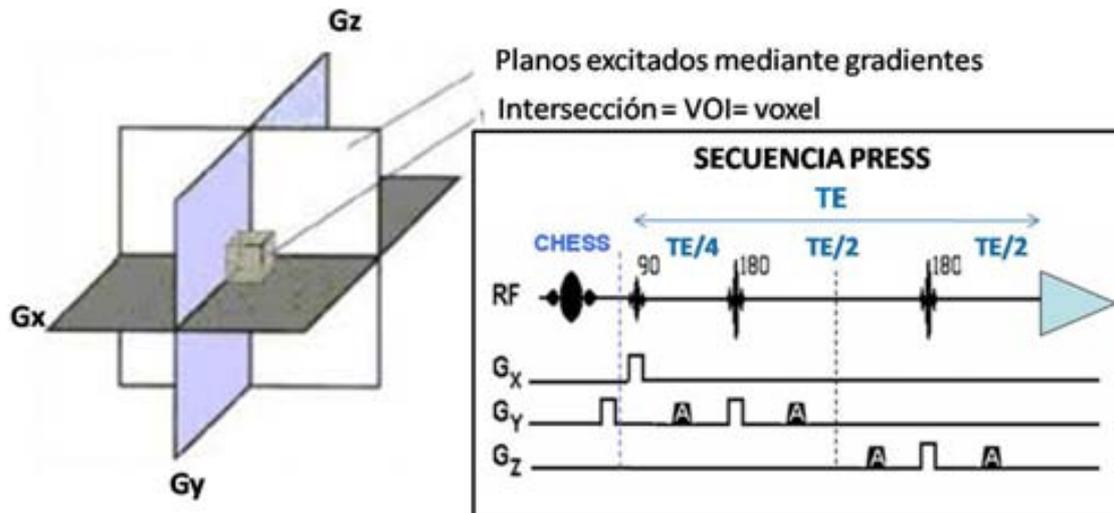


Figura 32: Secuencia Point Resolved Spectroscopy (PRESS) con supresión de agua (CHES). Colocación espacial de los planos ortogonales para la localización del vóxel y esquema de los pulsos y gradientes utilizados para la excitación de cada plano. El símbolo A de la secuencia indica gradientes adicionales para la supresión de señales no deseadas (agua) y el triángulo azul indica el momento de inicio de la adquisición de los datos. Imagen modificada de: www.tsid.net y de experimentos RMN Universidad Santiago de Compostela <http://desoft03.usc.es/rmnweb/mri/CHESspres.html>

Una de las principales limitaciones de la espectroscopía *in vivo* es la baja resolución del espectro, entendiendo como baja resolución la obtención de un espectro con resonancias anchas.

Este efecto se produce cuando el campo magnético local que actúa sobre diferentes grupos de espines no es igual y por tanto procesan a frecuencias distintas. Entonces cada grupo de espines da lugar a una resonancia a una frecuencia ligeramente desplazada y lo que se observa es una envolvente mucho más ancha.

Esos campos locales diferentes pueden ser debidos a múltiples causas, como son: i) inhomogeneidad de la muestra, ii) inhomogeneidades en el campo magnético y iii) interacción dipolar entre espines con diferentes frecuencias de Larmor.

1.6.5. Espectroscopía *ex vivo*

La espectroscopía de alto campo permite mejor resolución espectral que la ERM *in vivo* porque se acostumbra a utilizar campos magnéticos más elevados.

Normalmente, si ello es posible, se trabaja con muestras líquidas, ya que el rápido movimiento isotrópico de las moléculas en disolución promedia las interacciones dipolares causantes del ensanchamiento de las señales. Es por esto que en el campo biomédico se utiliza la ERM de alta resolución para trabajar con muestras líquidas como pueden ser plasma, orina (Jung et al. 2011) o líquido cefalorraquídeo (Wang et al. 2013). La resolución en muestras líquidas sería equivalente a la que se ha mostrado en el apartado 1.6.5.2 para los distintos metabolitos en forma de disoluciones de estándares, obtenido de (Govindaraju et al. 2000)

En caso de trabajar con muestras de tejido, que se consideran sólidas o semi-sólidas, hay 2 opciones:

- Realizar una extracción de metabolitos solubles: Se puede llevar a cabo con ácido perclórico (Valverde et al. 2006) o solventes orgánicos (Yang et al. 2012), que permiten extraer el contenido de los compartimentos acuosos de las células (principalmente citosol) y disolverlo en forma de muestra líquida. Este método tiene diversas limitaciones como la destrucción de la muestra, las posibles pérdidas de metabolitos que se pueden dar en el proceso de extracción o la elevada cantidad de muestra necesaria para la obtención de concentraciones de metabolitos suficientemente altas para el análisis en un tiempo de adquisición razonable.

- Utilizar la técnica de *High Resolution Magic Angle Spinning* (HRMAS): En este caso la muestra/biopsia se incluye directamente en un contenedor (rotor) para la detección por ERM sin necesidad de hacer ningún tipo de pre-procesamiento o extracción.

1.6.5.1. High Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS)

El HRMAS permite trabajar *ex vivo* o *in vitro* con muestras sólidas o semi-sólidas produciendo espectros de alta resolución comparables a las de muestras líquidas.

La causa de la elevada resolución espectral en el caso de muestras líquidas es que las interacciones dipolares se promedian a cero, ya que el movimiento isotrópico de las moléculas del líquido a lo largo del tiempo anulan los posibles efectos de estas interacciones en un momento dado.

En el caso de una muestra sólida o semi sólida el problema de la desviación del campo magnético local debido a los acoplamientos dipolares entre moléculas cercanas de la muestra se resolvió teóricamente tal y como se muestra en la Ecuación 11.

$$\vec{B} = \frac{\mu_r \mu_0}{4\pi} \cdot \frac{3\cos^2 \theta - 1}{r^3}$$

Ecuación 11: Ecuación que muestra los factores que influyen el campo magnético local resultante (B) donde B = campo magnético local resultante; μ_r = la permeabilidad magnética relativa de la muestra y μ_0 = permeabilidad magnética del vacío = $4\pi \cdot 10^{-7} \text{ TmA}^{-1}$, θ = es el ángulo entre el eje de rotación del rotor para HRMAS (ver también Figura 33d) y el campo magnético estático y r = la distancia entre los momentos magnéticos considerados.

La Ecuación 11 es proporcional a $3\cos^2\theta$, si el ángulo θ es el ángulo mágico (θ_m) = $54,7^\circ$ entonces $3\cos^2 54,7^\circ = 1$ con lo que teóricamente se anula y entonces se pueden minimizar las contribuciones del acoplamiento dipolar consiguiendo reducir el ensanchamiento de señales de muestras sólidas o semisólidas.

En HRMAS el ángulo mágico se obtiene girando el rotor respecto a B_0 a $54,7^\circ$ como se muestra en la Figura 33d.

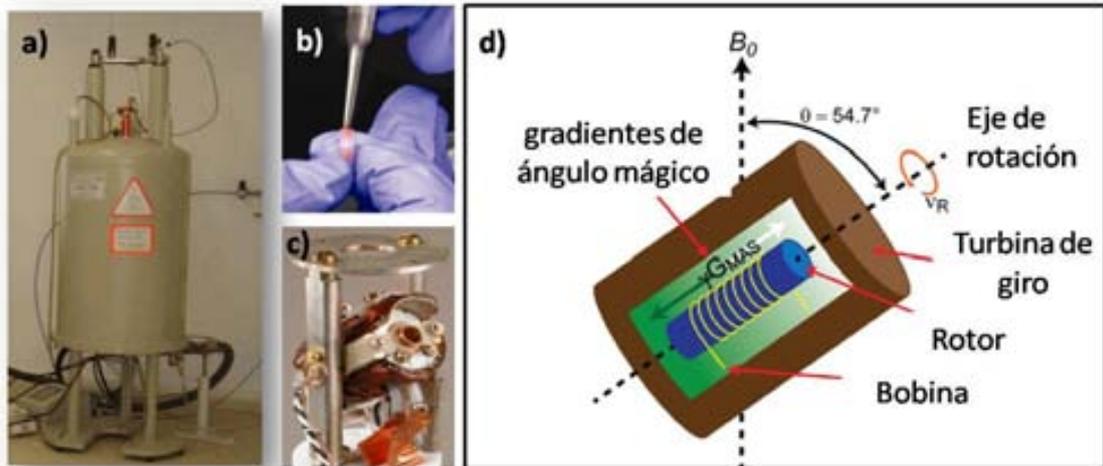


Figura 33: Conjunto de imágenes sobre el equipo y funcionamiento de la resonancia por HRMAS. **a)** Espectrómetro 400 Hz con imán de 9,4T equipado con sonda HRMAS. **b)** Imagen sobre la preparación de la muestra en el rotor. **c)** Turbina de giro en el ángulo mágico. **d)** Esquema de las partes que componen la turbina de giro. Abreviaturas: B_0 = campo magnético estático, v_R = velocidad de rotación, G_{MAS} = gradiente. Imagen modificada de:

<http://www.bruker.com/en/products/mr/nmr/probes/probes/solids/hr-mas/overview.html>,

<http://www.dotynmr.com/solids/HRMASMAG.htm> y www.intechopen.com/download/pdf/38536

Por otro lado, uno de los inconvenientes de la técnica es que provoca la aparición de unas bandas originadas en el agua no suprimida que podrían obstaculizar la correcta detección de las resonancias de interés. Sin embargo si la frecuencia de rotación de la muestra es suficientemente elevada estas bandas desaparecen de la parte de interés del espectro (de 0 a 10 ppm).

Aplicar esta técnica a tejidos es relativamente sencillo ya que el movimiento de los protones dentro de los compartimentos acuosos de las células ya reduce las contribuciones anisotrópicas incluso girando a velocidades relativamente bajas, aunque normalmente se utilizan velocidades altas (de 2000 a 6000 Hz) para asegurar que las bandas de agua no suprimida no aparecen. La principal limitación a la hora de trabajar a velocidades altas es no afectar excesivamente a la integridad tisular.

Las secuencias de excitación y adquisición con las que se trabaja en HRMAS son las que permiten utilizar las diferencias entre sus tiempos de relajación para obtener

información selectiva de las moléculas de interés como pueden ser la secuencia de Pulso y adquisición o la *Standard Hahn spin echo* (Figura 34).

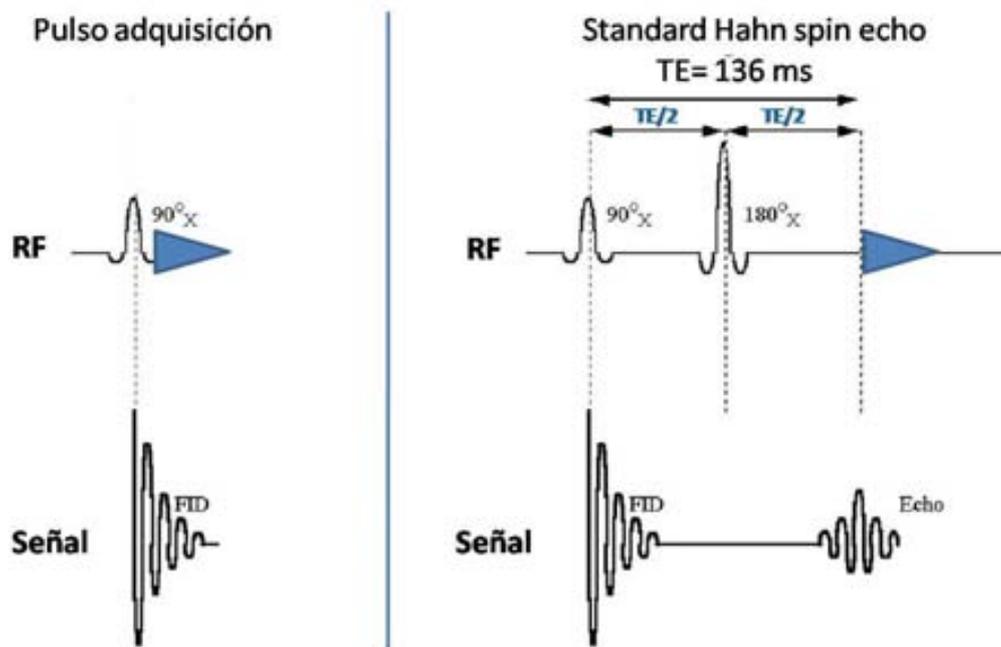


Figura 34: Esquema de las secuencias de pulsos de excitación de la muestra para análisis por HRMAS. Se muestran 2 secuencias: Pulso y adquisición y *Standard Hahn spin echo*. Ambas secuencias contienen pulsos de presaturación de la señal de agua (que no se representan en el esquema). Abreviaturas: RF= radiofrecuencia, TE= tiempo de eco, FID= Free Induction Decay. Modificada de: *Basic M R I Imaging* (www.radiology.georgiahealth.edu).

1.6.5.2. Aspectos bioquímicos y patrón espectral de los metabolitos cerebrales detectables por ERM de ^1H

En la espectroscopía *in vivo*, debido a su baja resolución, se pueden identificar un número relativamente bajo de metabolitos según la posición en la que se encuentran en el espectro. Por otro lado técnicas como el HRMAS permiten obtener mayor resolución. Un ejemplo para tejido de rata sana se muestra en la Figura 35 y una tabla con las principales resonancias y sus asignaciones se muestra en la Tabla 2.

Asignaciones de las principales resonancias detectables mediante ERM in vivo y HRMAS <i>ex vivo</i> en cerebro de rata				
Resonancia	Abreviatura	Desplazamiento químico (ppm)		
Lactato	Lac	1,33-1,35		
Alanina	Ala	1,47		
Ácido aminobutírico y	GABA	1,89		
N-acetilaspartato	NAA	2,02 / 2,49 / 2,67		
N-acetilaspartatoglutamato	NAAG	2,05		
Glutamato	Glu	2,35 / 3,75		
Glutamina	Gln	2,12/ 2,45		
Aspartato	Asp	2,80		
Fosfocreatina	PCr	3,04 / 3,95		
Creatina total	TCr	3,03 / 3,93		
Colina total	TCho	3,21		
Compuestos que contienen colina	Colina libre	Cho	3,19	
	Glicerofosfocolina	ChCCp	GPCho	3,23
	Fosfocolina		PCho	3,21
	Fosfatidilcolina		PtdCho	3,25
Taurina	Tau		3,26 / 3,42	
Mioinositol	mi	3,28 / 3,53 / 3,62 / 4,06		
Glucosa	Glu	3,82		
Fosfoetanolamina	PE	3,98		
Lípidos móviles + macromoléculas	LM	0,97/ 1,33 / 1,61/ 2,06/ 2,28/2,83-2,86/3,29		

Tabla 2: Tabla de las principales metabolitos del patrón espectroscópico de rata con sus principales asignaciones. Datos extraídos de (Pfeuffer et al. 1999; Wright et al. 2010; Davila et al. 2012; Martinez-Bisbal et al. 2004)

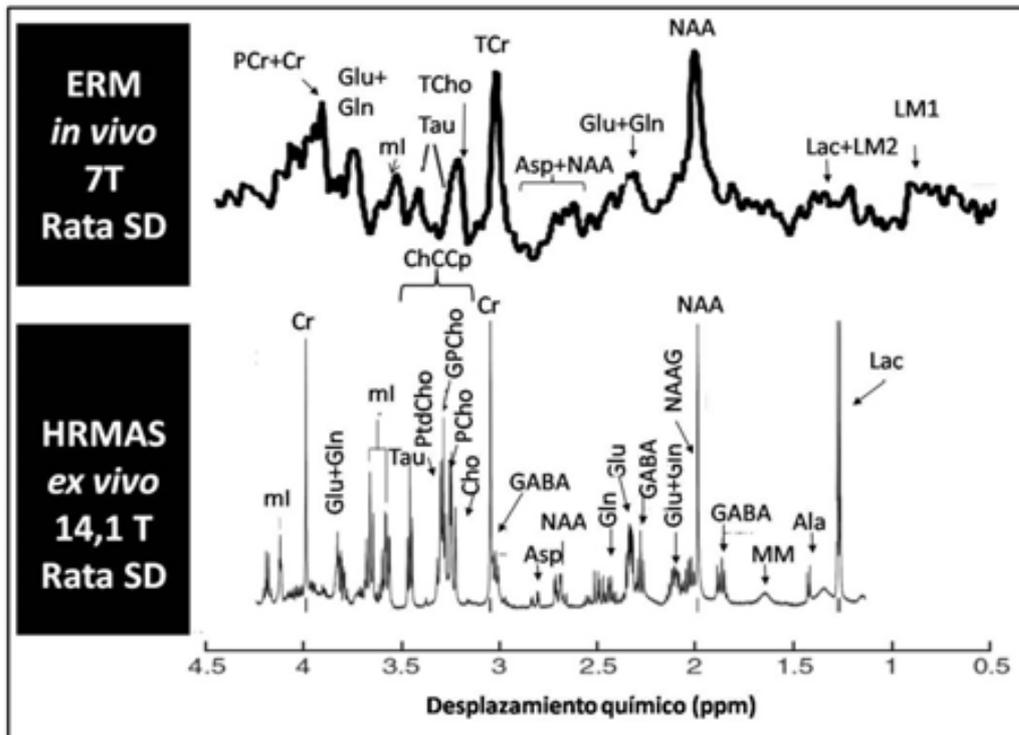


Figura 35: Patrón espectral de rata Sprague Dawley (SD) utilizando ERM *in vivo* a 7T y biopsia de tejido de rata sana mediante HRMAS *ex vivo* a 14,1T. Imágenes modificadas de (Chan et al.; Tsang et al. 2005)

A continuación se presenta un análisis más detallado de algunos de los metabolitos principales detectables por ERM *in vivo* o por HRMAS *ex vivo*.

1.6.5.2.1. Creatina-fosfocreatina

La creatina es un aminoácido no proteínógeno implicado en el metabolismo energético celular que es sintetizado principalmente en el hígado o ingerido en la dieta y transportado a otros tejidos principalmente a músculo (95%) y cerebro. En el citosol celular la PCr actúa como una reserva para la generación de ATP mediante la reacción de la creatina quinasa que refosforila el ADP a ATP (Figura 5).

A nivel de espectro al estar tan próximas las resonancias de la PCr y la Cr, tanto los metilos a 3,03-3,04 ppm como los metilenos a 3,93-3,95 ppm. En la mayoría de casos de espectroscopía *in vivo* la resolución espectral no es suficiente para distinguirlas y aparecen referenciadas como creatina total (TCr) (Figura 36).

La Creatina total se considera bastante estable en el cerebro y es por ese motivo por el que en muchos casos se utiliza como metabolito para referenciar cuantitativamente posibles cambios en los demás metabolitos. Sin embargo hay patologías como es el caso del infarto en el que ésta se encuentra disminuida (Gideon et al. 1992).

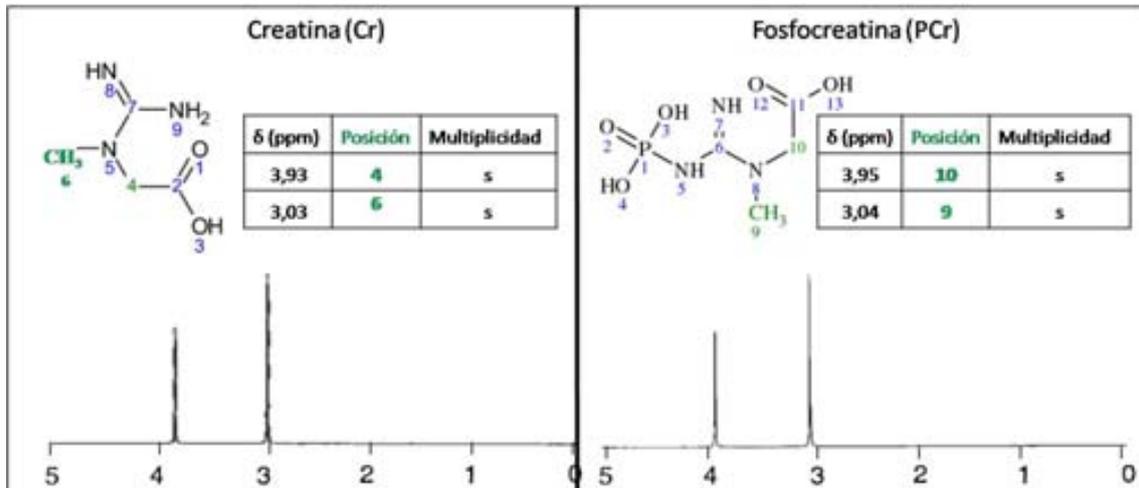


Figura 36: Fórmulas químicas, desplazamientos químicos y espectros de alta resolución de ^1H a 4T de la Cr y PCr. Los desplazamientos químicos están referenciados a la sal sódica 2,2-Dimetil-2-silapentano-5-sulfonato sódico (DSS) que se sitúa a 0 ppm (aunque no aparezca en la imagen). Abreviaturas: s= singulete. Imagen modificada de (Govindaraju et al. 2000; Wishart et al. 2013)

1.6.5.2.2. Aspartato

El aspartato es un aminoácido no esencial. Es sintetizado por las neuronas y transportado a los astrocitos donde es necesario para la síntesis de glutamina (Pardo et al. 2011) que es el componente presente en los astrocitos necesario para la regeneración del glutamato en las neuronas (Hertz 2013). Por otra parte, el glutamato es el principal neurotransmisor excitador del cerebro (Figura 37).

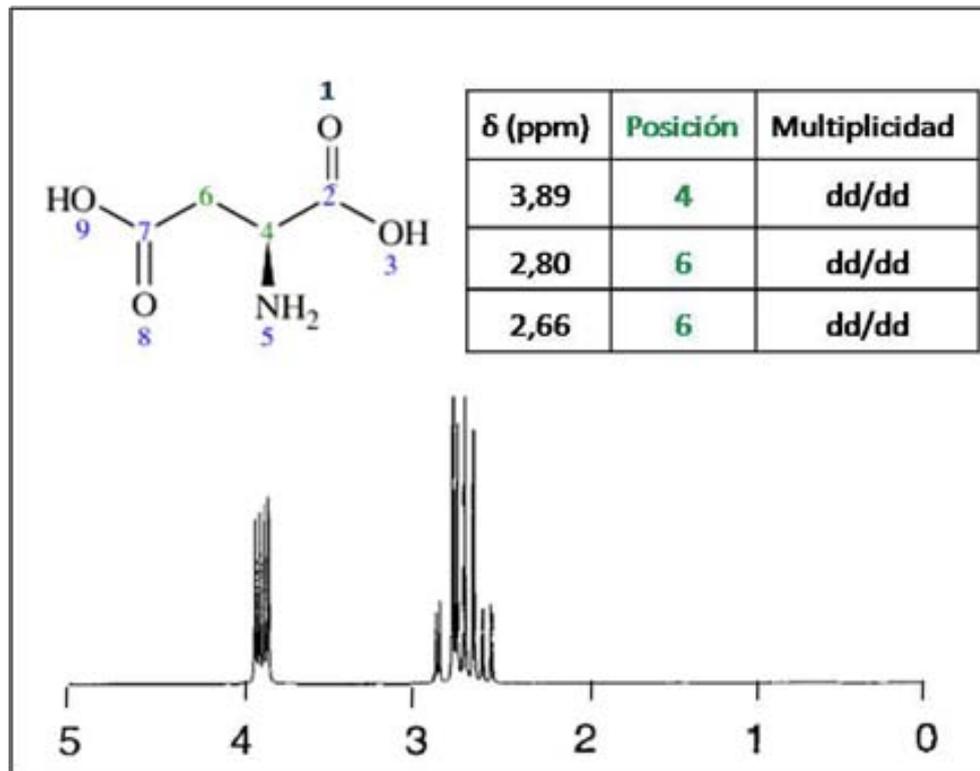


Figura 37 Fórmula química, desplazamientos químicos y espectro de alta resolución de ^1H a 4T del Asp. Los desplazamientos químicos están referenciados a DSS que se sitúa a 0 ppm (aunque no aparezca en la imagen). Abreviaturas: dd= doble doblete .Imagen modificada de (Govindaraju et al. 2000; Wishart et al 2013.)

1.6.5.2.3. *N*-acetilaspártato

El NAA es un aminoácido libre no proteínógeno presente en el cerebro en elevadas concentraciones. Su función bioquímica no ha sido aún determinada con total seguridad (Moffett et al. 2007). Se considera un marcador de densidad neuronal (Birken and Oldendorf 1989) aunque su presencia es distinta según los tipos de neuronas (Simmons et al. 1991) y por lo tanto actualmente se relaciona más con disfunción neuronal que con pérdida (Qian et al. 2013).

A nivel de espectro de protón en el cerebro sano es la resonancia más prominente (los 3 protones del N-acetil CH_3 resuenan a 2,01 ppm) y también tiene otras resonancias que corresponden a los grupos CH_2 y CH del aspartato (Figura 38).

La cuantificación de su resonancia *in vivo* puede verse afectada por la presencia del dipeptido N-acetilaspargatoglutamato (NAAG; singlete a 2,04 ppm).

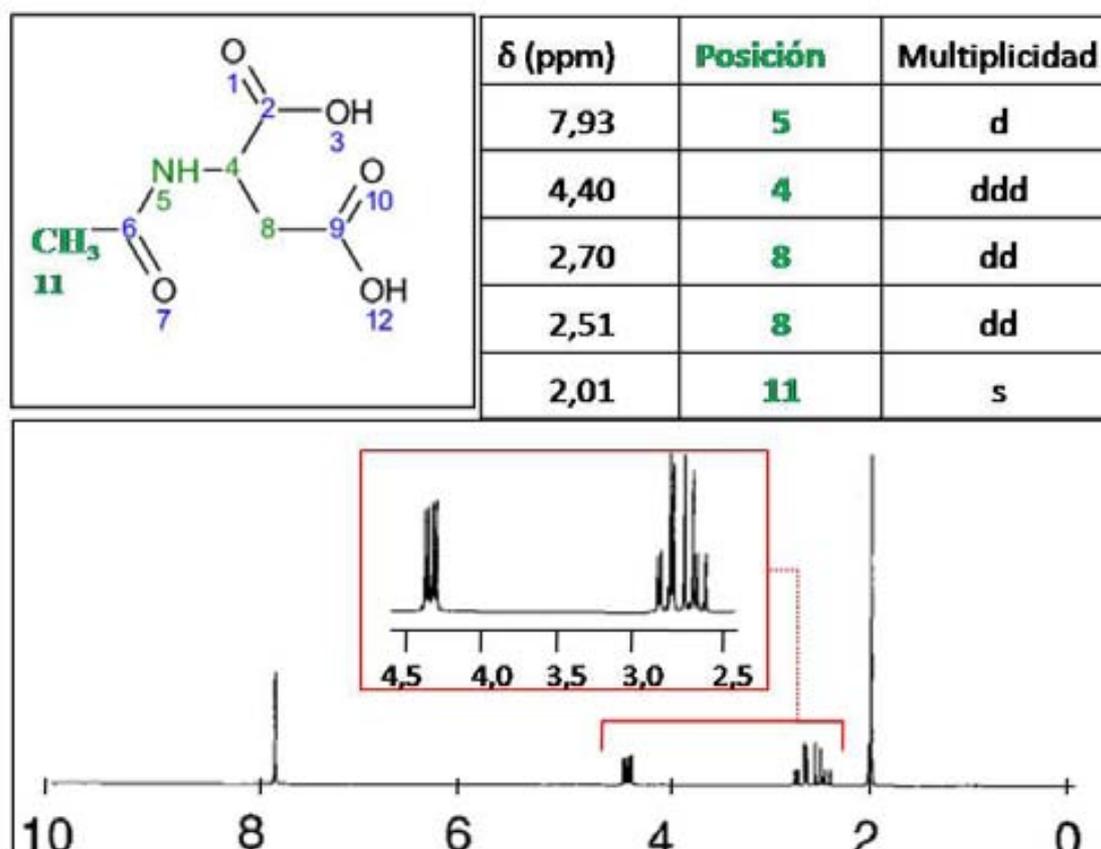


Figura 38 Fórmula química, desplazamientos químicos y espectro de alta resolución de ^1H a 4T del NAA. Los desplazamientos químicos están referenciados a DSS que se sitúa a 0 ppm (aunque no aparezca en la imagen). Abreviaturas: s= singlete, d= doblete, dd= doble doblete, ddd= doble doble doblete. .Imagen modificada de (Govindaraju et al. 2000; Wishart et al 2013.)

1.6.5.2.4. Compuestos que contienen colina

Los llamados compuestos de que contienen colina (ChCCp) son metabolitos nitrogenados importantes del metabolismo lipídico, ya que son imprescindibles para la formación y reciclaje de la fosfatidilcolina (PtdCho), un componente básico de las membranas celulares. La colina libre también se utiliza para la síntesis del neurotransmisor acetilcolina.

Los compuestos que se visualizan por espectroscopía de ERM son la colina libre (Cho), la fosfocolina (PCho) y la glicerofosfocolina (GPC) que son las “colinas” hidrosolubles. Las dos formas moleculares principales de almacenamiento de la “colina” en el citosol son como GPC y PCho. La “colina” no se sintetiza *de novo* en mamíferos sino que proviene de la dieta. Su resonancia más prominente tanto en Cho, GPC como en PCho es la que proviene de los 3 metilos del grupo trimetilamina que resuenan a 3,19 ppm, 3,20 ppm y 3,21 ppm respectivamente (Figura 39). Estas resonancias son singuletes, pero al estar muy cerca las tres señales normalmente no se pueden diferenciar por espectroscopía de baja resolución *in vivo*. Por ello, a la resonancia combinada centrada en 3,21 ppm se le denomina colina total (TCho) siendo la suma de las contribuciones de Cho, PCho y GPC. Los cambios en colina *in vivo* son difíciles de interpretar ya que no se pueden diferenciar sus componentes sin un post-procesamiento cuidadoso del patrón espectral.

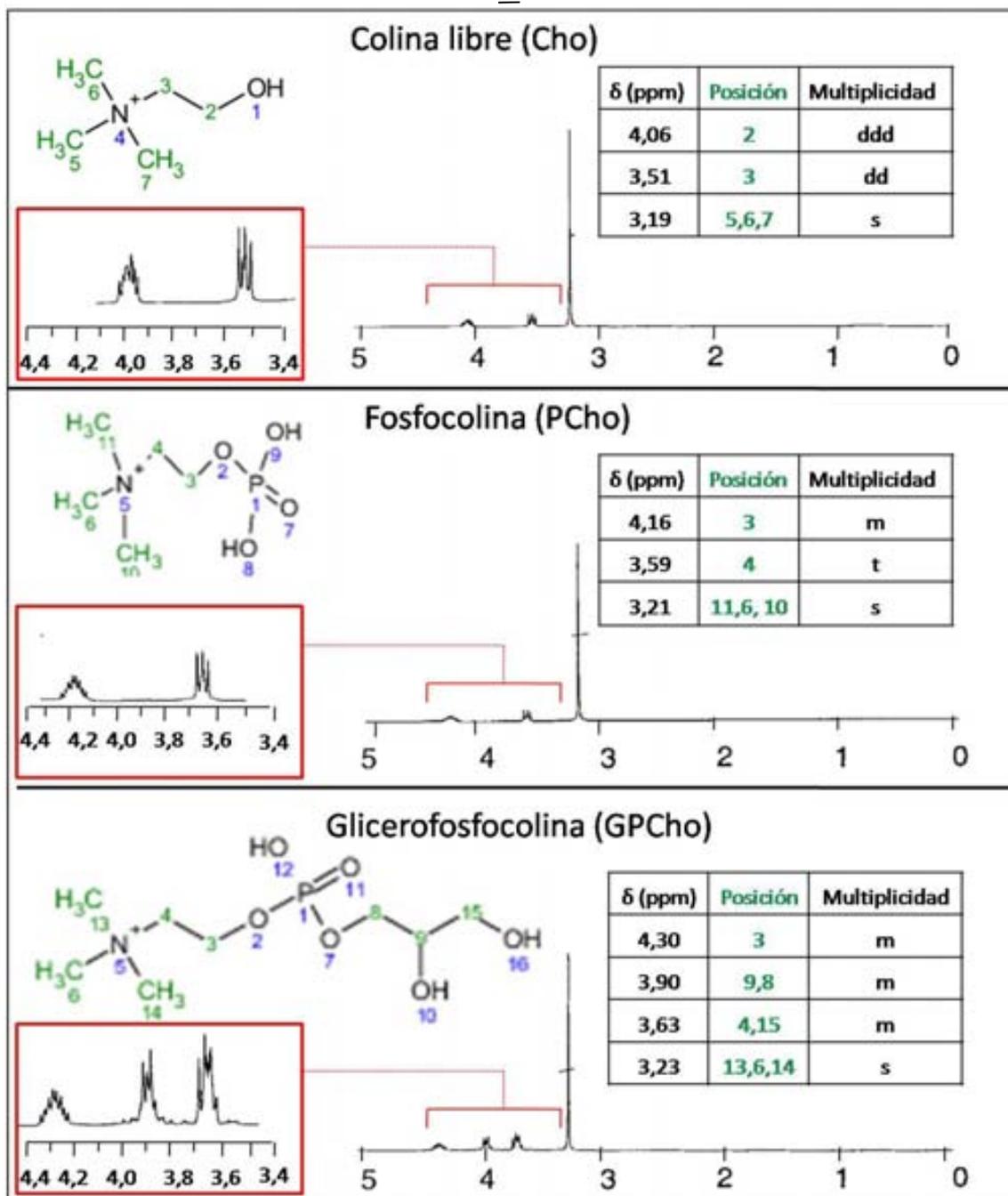


Figura 39 Fórmulas químicas, desplazamientos químicos y espectro de alta resolución de ^1H a 4T de la Cho, PCho y GPCho. Los desplazamientos químicos están referenciados a DSS que se sitúa a 0 ppm (aunque no aparezca en la imagen). Abreviaturas: s= singulete, t= triplete, dd= doble doblete, ddd= doble doblete, m= multiplete. Imagen modificada de (Govindaraju et al. 2000; Wishart et al 2013.).

1.6.5.2.5. *Lactato*

El lactato es un producto de la glicólisis anaeróbica que normalmente se encuentra en bajas concentraciones en el cerebro, pero aumenta de forma rápida en caso de hipoxia. En el espectro de ^1H se encuentra un doblete a 1,31 ppm del grupo metilo y con menor intensidad un cuarteto originado en el grupo metino a 4,10 ppm (Figura 40). Se ha descrito que el lactato se encuentra aumentado en los animales anestesiados (Funfschilling et al. 2012)

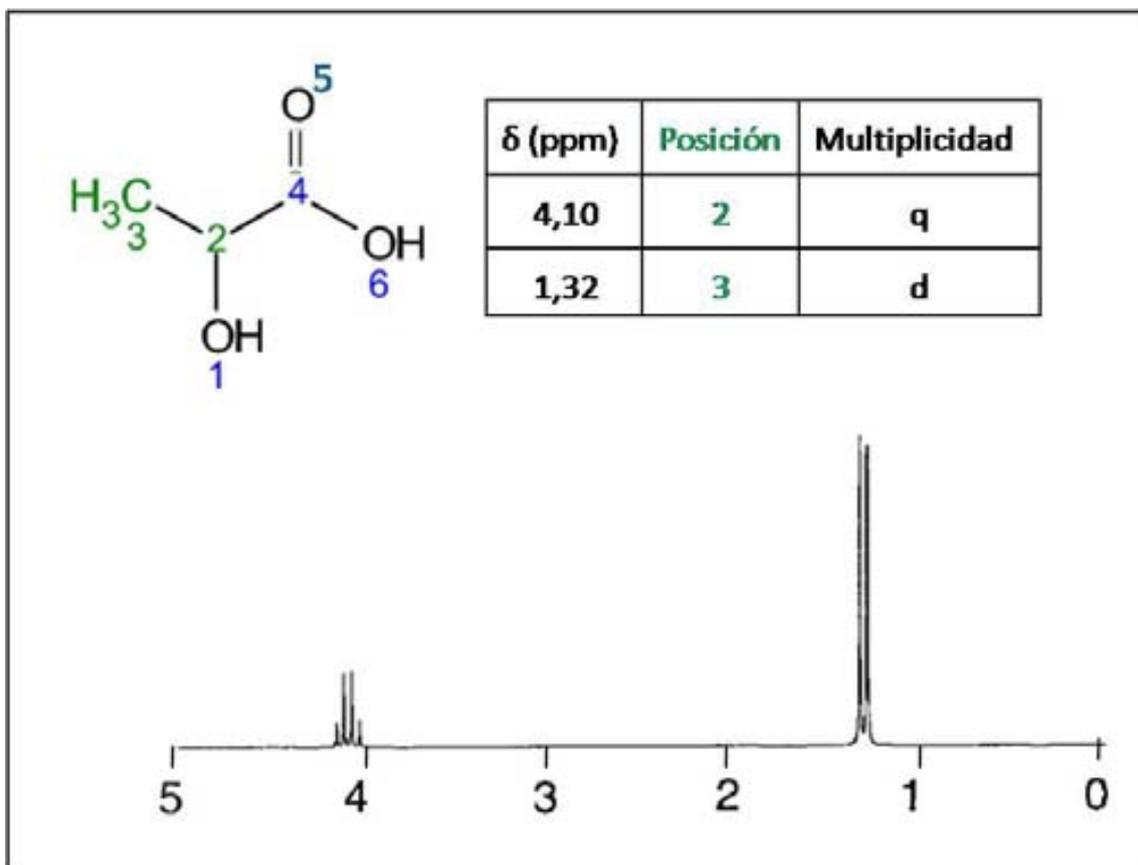


Figura 40 Fórmula química, desplazamientos químicos y espectro de alta resolución de ^1H a 4T del Lac. Los desplazamientos químicos están referenciados a DSS que se sitúa a 0 ppm (aunque no aparezca en la imagen). Abreviaturas: d=doblete, q= cuarteto .Imagen modificada de (Govindaraju et al. 2000; Wishart et al.2013)

1.6.5.2.6. Lípidos móviles

Las células tienen un elevado contenido en lípidos: los fosfolípidos polares que se encuentran formando parte de las membranas, los lípidos neutros como los triacilgliceroles (TAG) y los ésteres de colesterol (EC). Los lípidos que se encuentran formando parte de las membranas, al no tener suficiente movilidad, no son detectables por RMN en las condiciones estándar de adquisición. Los ácidos grasos que provienen de la degradación de los fosfolípidos de membrana o que son obtenidos del medio extracelular pueden ser almacenados transitoriamente en el interior de las células en forma de TAG en gotículas lipídicas (micelas rellenas) intracelulares.

Por lo tanto las señales de lípidos detectables por RMN provienen básicamente de los TAG y en menor medida de los EC que pueden tener un movimiento isotrópico no restringido en el interior de dichas gotículas (Hakumaki and Kauppinen 2000; Boren and Brindle 2012). Las gotículas lipídicas intracelulares pueden ser visualizadas en células intactas mediante tinción con *Nile Red* y consisten en un núcleo de lípidos neutros rodeados por una monocapa fosfolipídica que contiene diversas proteínas con funciones tanto estructurales como asociadas al recambio de membrana (Quintero et al. 2007). En el cerebro sano de rata estas señales son prácticamente indetectables, en cambio aparecen en procesos asociados con la necrosis en procesos tumorales (Zoula et al. 2003), apoptosis en procesos tumorales (Griffin et al. 2003) y también con la ralentización de la proliferación celular en células de glioma en cultivo (Barba et al. 1999). La detección de estas señales de "lípidos móviles" es por tanto dependiente de la acumulación de gotículas lipídicas conteniendo TAGs. Los motivos exactos de esta acumulación no están totalmente esclarecidos pero se relacionan con el recambio en las membranas celulares (Martin and Parton 2006; Quintero et al. 2007) ya que los TAGs son una fuente de ácidos grasos libres para la síntesis de fosfolípidos (Cunnane and Chen 1992). (Figura 41).

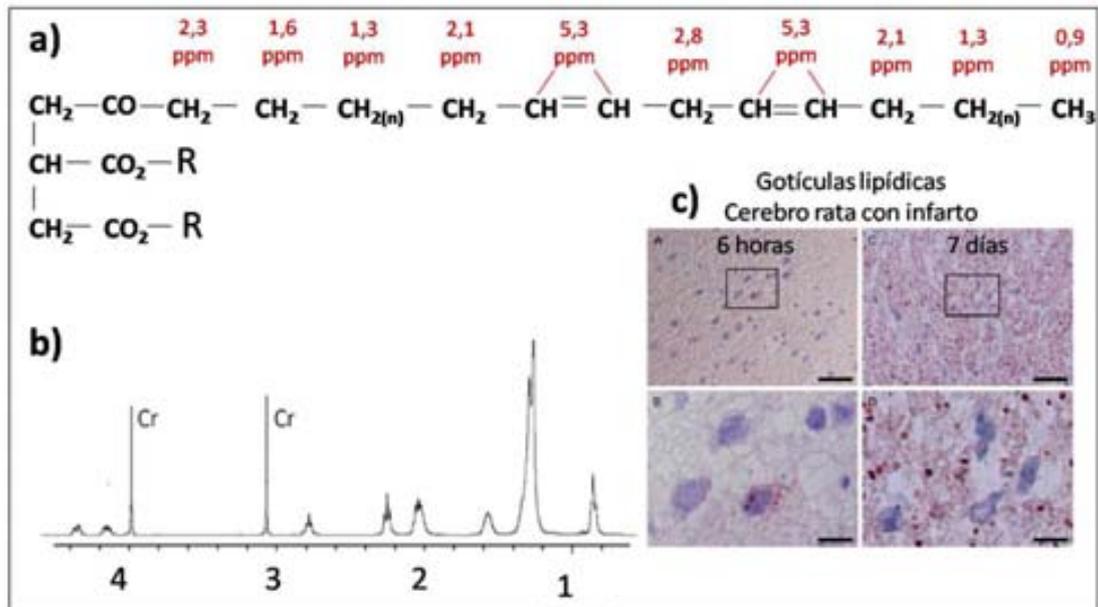


Figura 41: Fórmula química y espectro de ^1H de las resonancias de los lípidos móviles visibles por RMN. **a)** Imagen de la estructura química y asignación de resonancias modificada de (Zancanaro et al. 1994), **b)** Espectro de gotículas lipídicas artificiales de oleosina con TAG en el interior (Martin-Sitjar et al. 2012) en el espectro también se incluye Creatina (Cr). El espectro está referenciado respecto a la Creatina añadida (3,03 y 3,93 ppm). **c)** Imagen inmunohistoquímica de gotículas lipídicas de cerebro de rata post-infarto a las 6 horas hay pocas gotículas y son gotículas intracelulares y a los 7 días hay más y se localizan intracelularmente pero también de manera extracelular (Harada et al. 2007)

1.6.5.3. Estudios de ERM en el campo del infarto cerebral

Los avances en el campo del análisis del infarto por ERM han ido ligados junto con los desarrollos en imagen al avance que ha experimentado la técnica especialmente en las décadas de los 80-90. El aumento del campo magnético y la homogeneidad de campo permitieron realizar IRM y ERM de alta resolución y fueron utilizadas para los estudios de regulación metabólica y bioenergética en modelos animales de isquemia cerebral y en pacientes (Baker et al. 1991).

Los dos tipos de ERM más utilizados fueron la ^{31}P -ERM y la ^1H -ERM. Inicialmente en el estudio del infarto cerebral se utilizó la ^{31}P -ERM ya que permitía determinar la gravedad de la afectación del estado energético. De forma resumida, la ^{31}P -ERM mostró la depleción de los fosfatos de alta energía (ATP y PCr) a la vez que se acumulaban los fosfatos inorgánicos (Pi) del tejido (Thornton et al. 1998; Groenendaal

et al. 1999). El uso de la ^{31}P -ERM también permitió el cálculo del pH comparando la diferencia del desplazamiento químico entre el Pi y la PCr. En el infarto se ha descrito que el pH disminuye debido a la acidosis en el tejido isquémico (Gyulai et al. 1987). El cociente PCr/Pi se considera un indicador sensitivo de condiciones isquémicas hipóxicas con valor pronóstico (Brant-Zawadzki et al. 1987).

La ^1H -ERM tardó más en desarrollarse ya que tenía la limitación adicional de las señales intensas del agua y los lípidos, que impedían determinar señales de menor concentración (Baker et al. 1991). Con la aparición de la ERM localizada y las técnicas de edición esta limitación pudo ser resuelta (Hanstock et al. 1988; Barany et al. 1988). Los metabolitos de interés en el campo del infarto que pudieron ser detectados por ^1H -ERM fue el lactato que se describió que en casos de isquemia se acumulaba progresivamente y de forma concomitante con la depleción de los fosfatos de alta energía (Brant-Zawadzki et al. 1987). Se considera un marcador temprano de la isquemia cerebral ya que en la fase hiperaguda del infarto mostraba cambios que no se podían detectar por IRM, por lo tanto, en fases iniciales la ERM era potencialmente más sensible que la IRM a excepción de las imágenes DWI, en el cual los cambios el lactato están asociados a la disminución de ADC por IRM. (Kohno et al. 1995). El lactato clásicamente se asoció a un marcador de mal pronóstico (Parsons et al. 2000) y se demostró que la probabilidad de recuperación metabólica disminuye con el incremento de lactato antes el inicio de la terapia trombolítica (Franke et al. 2000).

También se analizaron otros metabolitos presentes en el patrón de ^1H -ERM como el NAA que se relacionaron con la pérdida neuronal asociada al infarto (Hugg et al. 1992) aunque otras posibilidades como degradación metabólica o redistribución de éste deberían ser analizadas (Weber et al. 2006). Los compuestos que contienen colina en el infarto cerebral se ha descrito que la TCho disminuye relacionado con cambios en la composición y reciclaje de las membranas celulares (Rudkin and Arnold 1999), las señales de glutamato y glutamina que indicaban actividad del ciclo de los ácidos tricarbóxicos o mionionositol relacionado con la regulación de la homeostasis iónica (Hoehn et al. 2001) aparecen el glutamato y la glutamina que se encuentran disminuidos (van der Zijden et al. 2008) aunque se han descrito aumentos transitorios de la glutamina relacionados con la excitotoxicidad (Lei et al. 2009). También fueron descritos aumentos en las señales lipídicas en zonas de infarto cerebral tanto en

animales de experimentación como en humanos (Gasparovic et al. 2001; Graham et al. 2001).

La mayoría de estudios con ERM se han realizado utilizando la metodología *single voxel* aunque cada vez es más relevante el uso de espectroscopía multivóxel para determinar la heterogeneidad de la distribución de los metabolitos (Norris et al. 1998).

Las funciones que se le otorgaron inicialmente a la ERM ya que además se puede llevar a cabo en el mismo experimento en el cual se obtiene la imagen era una metodología que permitía investigar de forma no invasiva y longitudinal la isquemia aguda (potencialmente reversible), su evolución y el efecto de varias intervenciones terapéuticas en su pronóstico de forma no invasiva (Brant-Zawadzki et al. 1987)

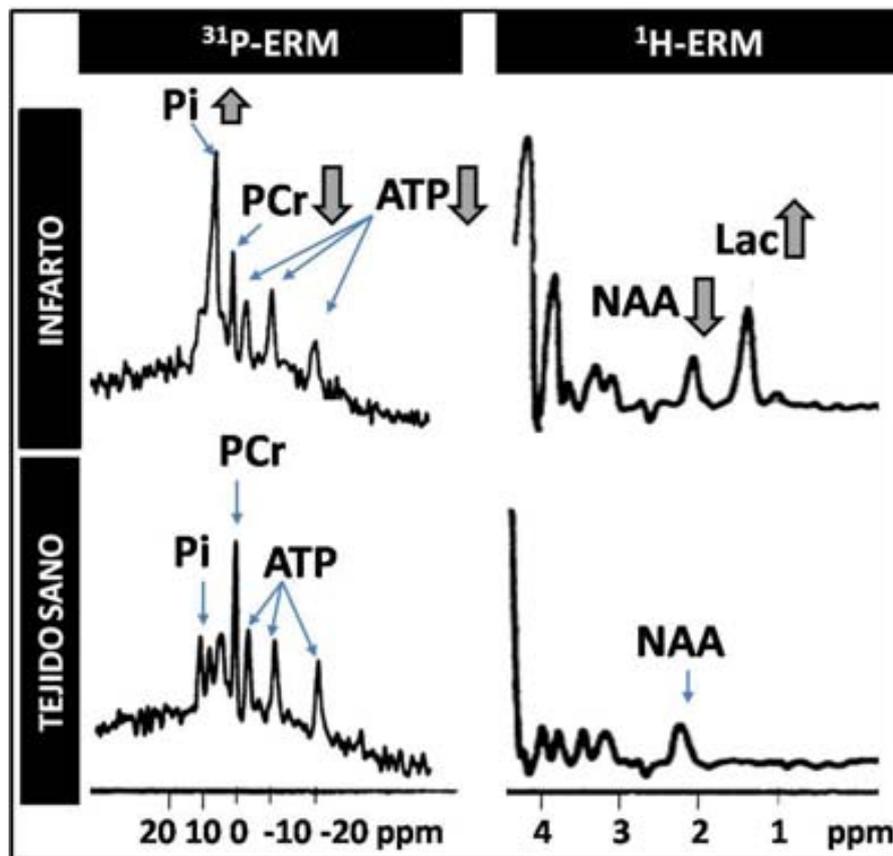


Figura 42: Conjunto de imágenes que muestran uno de los primeros espectros obtenidos simultáneamente para P-ERM y H-ERM de cerebro de gato con oclusión permanente de la arteria cerebral media (ACM). A pesar de la baja resolución de los espectros, se pueden observar diferencias entre la zona de infarto y el tejido sano. La dirección de las flechas grises indica aumento o disminución, las flechas azules indican la asignación de la resonancia. Imagen obtenida de la revisión de (Baker et al. 1991)

1.6.5.4. Detención del metabolismo post-mortem por irradiación con microondas focalizadas (FMW)

En caso de querer trabajar con técnicas de espectroscopía *ex vivo* el mantenimiento del tejido cerebral post-mortem en condiciones de patrón metabólico similares a las que se encuentran *in vivo* es clave para muchos estudios metabólicos. Para ello es necesario que durante el sacrificio se inactive rápidamente el metabolismo intracelular para prevenir los cambios en dicho patrón metabólico debido a la isquemia post-mortem.

Actualmente los sistemas más utilizados con este fin son técnicas basadas en la congelación rápida de los tejidos de interés en nitrógeno líquido como por ejemplo el *freeze-blowing*, *freeze-clamping* o *funnel-freezing*. Sin embargo estos métodos tienen sus limitaciones ya que la congelación no es igual de rápida en el tejido periférico que en su interior. Además, la congelación se produce en cuestión de segundos, con lo que algunos cambios ya han tenido lugar. Finalmente, los enzimas pueden reactivarse si el tejido es descongelado posteriormente (de Graaf et al. 2009).

El FMW, en cambio, se basa en irradiación de la muestra de interés con microondas de alta potencia (5-10 kW), lo que en cuestión de milisegundos (ms) aumenta la temperatura del cerebro entre 75-90°C provocando la inactivación enzimática de forma permanente y por lo tanto la detención del metabolismo post-mortem. Es un método reproducible y permite la extracción del cerebro de forma sencilla y su manipulación a temperatura ambiente sin afectación de su patrón metabólico.

En los artículos en los que se han comparado técnicas de congelación rápida y de FMW con respecto a los niveles de metabolitos estudiados: ATP(Delaney and Geiger 1996), GABA(Miller et al. 1990), glicógeno(Kong et al. 2002; Morgenthaler et al. 2006), fosforilación proteica (O'Callaghan and Sriram 2004) y nucleótidos (Parkin et al. 2005) los resultados son más similares a los de *in vivo* en las muestras irradiadas por FMW que en las preservadas por congelación. Aunque en algún caso se ha descrito cambios en el patrón espectroscópico debido al FMW (Srivastava et al. 2012),

actualmente es una de las técnicas más fiables para la preservación del patrón metabólico del tejido a investigar de manera comparable a la situación *in vivo*.

Un marcador clave para demostrar la detención del metabolismo bioenergético cerebral mediante espectroscopía es la presencia de fosfocreatina (PCr; 3,95 ppm) en el cociente PCr/Cr en el espectro de ^1H , ya que en situaciones de isquemia la PCr se consume rápidamente. En animales sacrificados por FMW y analizados posteriormente por técnicas de RMN se puede observar como aún es detectable la fosfocreatina (PCr)(Figura 43). En la Figura 43a) se muestra que después de irradiar las ratas a una potencia de 4,5 kW durante 1,2 s, se puede apreciar cómo, aparentemente, no hay cambios notables entre los dos espectros e incluso que en el espectro adquirido post-mortem se puede apreciar la presencia de PCr a 3,95 ppm. En la Figura 43b) se muestran los resultados analizados *ex vivo* por HRMAS a 9,4T y a 37°C de tejido cerebral de ratón sacrificado por FMW a 5kW durante 1,2 seg y también por un método que no evita los cambios post-mortem (sobredosis de anestesia). Se puede observar que la presencia de PCr sólo se detecta en los ratones sacrificados por FMW y que el doblete correspondiente a lactato (Lac; 1,35-1,33 ppm), que es representativo del inicio del metabolismo anaeróbico, únicamente se encuentra elevado en los ratones sacrificados por sobredosis de anestesia y no por FMW.

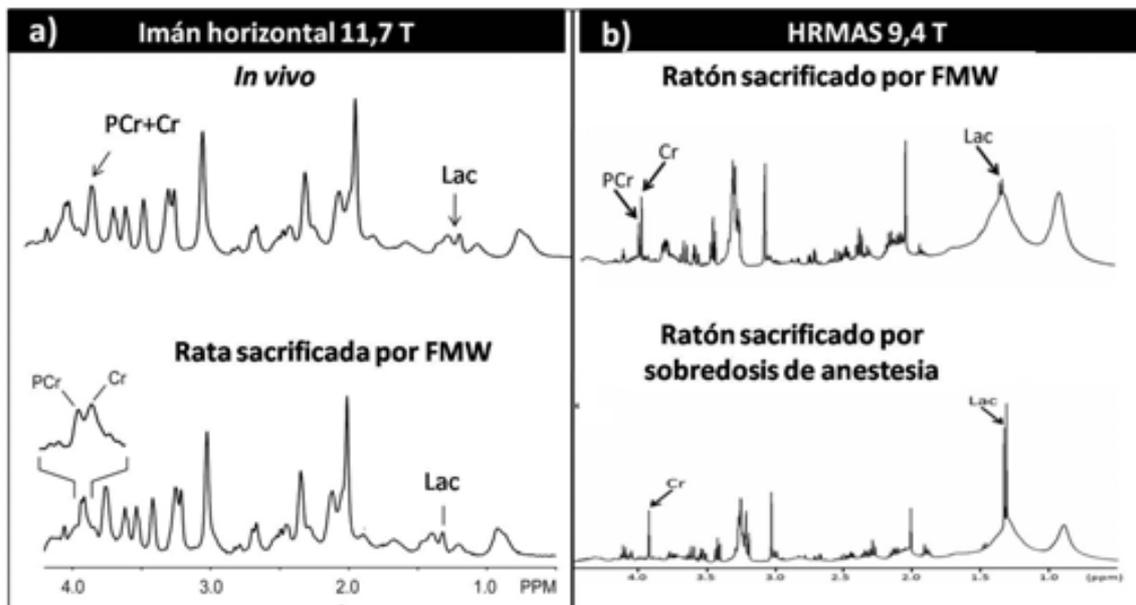


Figura 43: Mantenimiento de la PCr en estudios de tejido cerebral en animales sacrificados por el método de irradiación con microondas focalizadas (FMW). El ejemplo **a)** proviene de datos extraídos de (de Graaf et al. 2009) de rata analizada antes y después del sacrificio en un imán horizontal a 11,7 T. El ejemplo **b)** corresponde a datos adquiridos por HRMAS a 9,4T en ratón sacrificado por FMW y por sobredosis de anestesia (Simões RV 2012).

1.6.5.5. Técnicas de reconocimiento de patrones

El análisis de los metabolitos mediante ERM de forma individual permite obtener información bioquímica sobre los procesos concretos afectados por una patología. Los cambios en un único metabolito (aproximación univariante) son asociados a biomarcadores de procesos, aunque la información que aporta un patrón espectroscópico es adecuada para un análisis multivariante ya que contiene información sobre un elevado número de características (Alusta et al.; Negendank 1992).

En este caso el uso de técnicas matemáticas de reconocimiento de patrones (RP) permite detectar relaciones entre los cambios cuantitativos de distintos metabolitos simultáneamente. Así dichas estrategias de RP pueden ser útiles para una valoración de los cambios del patrón metabólico más precisa en base a regularidades detectadas por el sistema donde cada objeto queda representado por una colección de descriptores (el-Deredy 1997).

Existen 2 modalidades de sistemas de RP: supervisados y no supervisados

- Sistemas de RP supervisados:

En este tipo de clasificador el investigador asigna los espectros a cada clase normalmente por el conocimiento previo sobre el origen del espectro (por su localización sobre MRI o por datos provenientes de histopatología (Tate et al. 1998)

Los métodos supervisados implican el uso de un grupo de entrenamiento de asignación conocida para desarrollar el modelo matemático. Una vez entrenado el clasificador, puede aplicarse el conjunto de fórmulas matemáticas de clasificación al grupo de test independiente para su validación (Mountford et al. 2010)

El análisis de patrones supervisado consta de 3 etapas: 1) reducción de las dimensiones de los datos. Esto permite seleccionar las características del espectro relevantes que representan a una clase, 2) clasificación de los espectros en diferentes clases en base a las características descriptivas diferenciales y 3) evaluación de la robustez de la clasificación en cuanto a sus características descriptivas (que permita discriminar las diferencias entre grupos) y predictivas (que permita asignar un nuevo espectro a una de las clases previamente establecidas) (Simões RV 2012; Altman et al. 2009)

- Sistemas de RP no supervisados:

La principal diferencia con el sistema supervisado es que en este caso el investigador no asigna los casos a una clase concreta sino que las clases son inferidas en base a la similitud de patrones entre diferentes casos

Existen multitud de técnicas no supervisadas, entre las más modernas se encuentran las basadas en "*non-negative matrix factorisation*" (Sajda et al. 2004). Dichas técnicas presentan la ventaja de que cada clase queda representada no por una serie de características sino que se obtiene el patrón espectroscópico completo característico de un determinado "estado metabólico", que se denomina fuente. Desde el punto de vista bioquímico, la extracción de fuentes como técnica para clasificar datos de espectroscopía parte de la asunción que en cada vóxel existe

contribución al patrón de una mezcla de tejidos heterogéneos (Ortega-Martorell 2012).

La principal ventaja respecto a los patrones supervisados reside, para datos de imagen espectroscópica, en que debido a la heterogeneidad del tejido el investigador no sabe de antemano a qué clase asignar un espectro ni se sabe cuántas clases distintas de patrones pueden coexistir en una muestra, pudiendo llegarse a obtener una segmentación metabólica del tejido evaluado mediante esta técnica (Ortega-Martorell 2012).

1.7. Justificación del estudio

El ictus es una patología con una elevada incidencia en la población y los pacientes afectados sufren secuelas que les causan algún tipo de discapacidad.

A nivel terapéutico, la posibilidad de incidir sobre la evolución de la enfermedad es a día de hoy aún escasa. Únicamente la terapia trombolítica con el activador recombinante del plasminógeno tisular (rtPA) se ha demostrado eficaz en el tratamiento del ictus en las primeras 4,5 horas después del inicio de los síntomas (Hacke et al. 2008). Sin embargo, debido a esta limitación temporal únicamente puede ser aplicada a un porcentaje muy reducido de pacientes. Además, muchas de las terapias centradas en la etapa temprana del infarto, denominadas de neuroprotección, han obtenido buenos resultados a nivel preclínico pero han fracasado en los ensayos clínicos (O'Collins et al. 2006).

Ante este panorama, los estudios dedicados a la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos que se dan en etapas más avanzadas de la enfermedad, es decir, sobre la neurorreparación, así como el diseño de terapias que incidan sobre dichos mecanismos pueden ser de interés para la mejora de la calidad de vida de los pacientes tras sufrir un ictus (Zhang and Chopp 2009; Lindvall and Kokaia 2011). Dentro de la neurorreparación, la neurogénesis, la generación de nuevas neuronas, es uno de los campos más prometedores y actualmente se están desarrollando diversas terapias ya sea mediante el trasplante de células madre o mediante la estimulación

farmacológica de la neurogénesis endógena, la mayoría a nivel preclínico (Lindvall and Kokaia 2011).

Una de las necesidades actuales para la realización de ensayos clínicos sobre neurogénesis, sería disponer de biomarcadores que permitieran detectar y monitorizar la neurogénesis de forma no invasiva. Ello nos permitiría conocer las variables asociadas a una mejor o peor capacidad de reparación, observar cómo varía esta capacidad en el tiempo, cómo varía con la administración de diversos tratamientos y cómo se relaciona esta actividad con el resultado funcional a corto y largo plazo tras un infarto cerebral.

No obstante, antes de poder trasladar estos conocimientos al campo clínico, es necesario validar dichos biomarcadores en modelos animales que permitan correlacionarlos con técnicas inmunohistoquímicas o de microscopía, que actualmente son las validadas en el campo científico para determinar la neurogénesis y que implican el sacrificio del animal (Sierra et al. 2011).

Una de las técnicas no invasivas con más potencial actualmente en el campo clínico son las técnicas de imagen, especialmente la IRM (Sztrika et al. 2012). Esta técnica se utiliza en la práctica clínica para la detección temprana de la lesión mediante estudios de difusión y para la determinación de la cantidad de tejido de la zona de penumbra y, por lo tanto, tejido potencialmente salvable mediante el establecimiento de las diferencias entre difusión y perfusión (el denominado *mismatch*) (Macintosh and Graham 2013).

Aplicar IRM al campo de la neurogénesis es posible en el caso de utilizar terapia celular, ya que las células se pueden marcar exógenamente con compuestos ferromagnéticos y así visualizarlas una vez inyectadas (Hoehn et al. 2002; Modo et al. 2004; Daadi et al. 2009). Sin embargo, en el caso de querer visualizar la neurogénesis endógena en pacientes la aproximación es más complicada ya que no se pueden marcar las células. Hasta el momento el único método traslacional que se ha descrito utilizando técnicas de imagen es con tomografía por emisión de positrones (PET) (Rueger et al. 2010; Rueger et al. 2012). Otra aproximación utilizando técnicas de RM pero no de imagen, sino de espectroscopía fue la que Mangano y colaboradores

(Manganas et al. 2007) publicaron en la revista Science en el año 2007. En este artículo en el que concluyeron que mediante esa técnica era posible detectar un biomarcador propio de las CPNs *in vivo* que correspondería a una señal espectroscópica concreta (1,28 ppm). Este biomarcador fue determinado en el hipocampo tanto en animales de experimentación como en humanos sanos.

Dicho artículo tuvo gran impacto en la comunidad científica por las posibilidades que abría para la monitorización no invasiva de la neurogénesis (Miller 2007). Sin embargo, posteriormente varios grupos hicieron patentes sus discrepancias con los resultados y dejaron constancia de las limitaciones que el estudio presentaba en cuanto a la validez del método diseñado para el procesamiento del espectro (Jansen et al. 2008; Friedman 2008; Hoch et al. 2008) y en cuanto a la especificidad de la señal espectroscópica (Ramm et al. 2009) ya que probablemente corresponda a lípidos móviles (LM) que se encuentran presentes en muchos tipos celulares y no sólo en las CPNs (Quintero et al. 2007; Ramm et al. 2009)

Debido a dichas controversias, el biomarcador de CPNs a 1,28ppm no fue validado, pero Manganas puso de relieve la capacidad de la ERM para la determinación de cambios bioquímicos y su utilidad potencial para determinar biomarcadores de procesos de neuroreparación. Por este motivos se decidió seguir investigando en esta Tesis los cambios en el patrón espectroscópico que se producen en la ZSV *in vivo* en animales con infarto cerebral focal.

En un modelo de infarto cerebral hay un mayor número de CPNs en proliferación, el nicho neurogénico de elección para la determinación de la proliferación de las CPNs fueron las zonas subventriculares en lugar del hipocampo (que fue el que utilizó Manganas) ya que es el mayor reservorio de CPNs en el cerebro (Yamashita et al. 2006). Con todas estas variantes los cambios en la proliferación de CPNs deberían ser más fácilmente visualizables por ERM.

Además, para intentar una caracterización más precisa, se decidió aplicar otras técnicas de RMN que podían permitir una mejor resolución espectral. Como podía ser la resonancia magnética *ex vivo* por HRMAS. También se utilizaron técnicas de reconocimiento de patrones para la determinación de los metabolitos con

características diferenciales de las ZSVs, en base al análisis simultáneo de varios metabolitos en lugar de uno solo.

Para verificar si la técnica permitía detectar cambios debidos a una terapia se administró Citicolina a unos animales para determinar cambios en las regiones de interés debido a la administración del fármaco.

Además se centró el análisis metabolómico no únicamente en las ZSVs sino que también se analizó la zona de infarto para detectar biomarcadores que pudieran correlacionar con signos de una mejor o peor recuperación de éste.

Por lo tanto, esta tesis surgió de lo que creemos que es una necesidad hoy en día, especialmente pensando en la monitorización de procesos de larga duración como pueden ser todos los relacionados con la neuroreparación, de encontrar nuevos biomarcadores no invasivos que sean sensibles y específicos. La ERM es una técnica que permite la evaluación bioquímica, *in situ*, del tejido de interés de forma no invasiva, incluso permite la obtención de imágenes moleculares de las distribución de un metabolito en el cerebro. Los avances en la técnica, con equipos cada vez más sofisticados que permiten mayor sensibilidad pueden permitir el hallazgo de nuevos biomarcadores con resultados fácilmente trasladables a la clínica. Las posibilidades que la ERM puede ofrecer al estudio del infarto cerebral y procesos asociados a él aún no han sido del todo explotadas.

2. HIPÓTESIS

En un modelo animal de isquemia cerebral focal el infarto produce cambios bioquímicos en el cerebro no únicamente en el área afectada por la lesión sino también en las zonas subventriculares en donde aumenta la proliferación de las CPNs.

La ERM *in vivo* tiene el potencial de detectar y monitorizar los cambios bioquímicos en las zonas antes mencionadas, ya sea analizando los metabolitos de forma individual o por técnicas matemáticas de reconocimiento de patrones.

La ERM *ex vivo* utilizando la técnica de HRMAS con detención del metabolismo mediante FMW debe permitir una mayor resolución espectral sin que los cambios debidos a la isquemia post-mortem afecten al patrón espectral.

La combinación de ERM *in vivo* y *ex vivo* debe permitir una caracterización de los cambios en el patrón espectroscópico en la ZSV y en la zona de infarto mejor que realizando únicamente análisis *in vivo*.

Los cambios detectados mediante ERM se correlacionan con los hallazgos inmunohistoquímicos de proliferación o de apoptosis en las zonas analizadas.

La ERM permite valorar de manera no invasiva el efecto mediado por fármacos detectando diferencias metabólicas en la región de infarto y la ZSV entre el grupo de animales al que se le ha administrado Citicolina y el grupo no tratado.

El análisis por ERM permite el hallazgo de biomarcadores indirectos de recuperación metabólica que puedan ser traslacionales a la práctica clínica.

3. OBJETIVOS

3.1. Estudiar mediante ERM en un modelo animal de isquemia cerebral focal los cambios metabólicos que se producen en la zona de infarto y las zonas subventriculares.

3.2. Determinar si el análisis de muestras de tejido mediante la técnica de HRMAS con detención del metabolismo mediante FMW es válido para el modelo de isquemia cerebral.

3.3. Utilizar técnicas de reconocimiento de patrones para determinar los principales cambios espectroscópicos en las zonas de infarto y las zonas subventriculares

3.4. Comprobar mediante inmunohistoquímica si los cambios detectados mediante espectroscopía de resonancia magnética se correlacionan cuantitativamente con marcadores de proliferación o de apoptosis en las zonas analizadas.

3.5. Evaluar si la administración del fármaco Citicolina produce cambios en el patrón metabólico de las zonas caracterizadas y si estos cambios correlacionan con la inmunohistoquímica de dichas zonas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos relacionados con el uso de animales fueron revisados y aprobados por la *Comissió d'Ètica en la Experimentació Animal i Humana de la UAB (CEEAH)* y posteriormente por el *Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya* de acuerdo con la legislación local y estatal. El registro del protocolo experimental es CEEAH 1023/DMAH 5620.

Cada una de las ratas utilizadas en este protocolo experimental tenía un identificador único que permitió distinguirlas de las demás. Dicho identificador constaba del acrónimo "OFA" seguido de un número asignado de manera ordinal ascendente. Un total de 231 animales se utilizaron para el trabajo de puesta a punto y evaluación experimental a lo largo de la presente Tesis.

4.1. Generación del modelo animal de isquemia cerebral con reperusión

El modelo de isquemia cerebral focal de elección fue el de oclusión de la arteria cerebral media derecha mediante inserción transluminal de un filamento con posterior reperusión a los 90 minutos en un modelo animal de rata (tMCAO). Este modelo fue descrito por Zea Longa y colaboradores (Longa et al. 1989) y causa un infarto de tamaño grande que afecta a la corteza cerebral y a la zona del estriado.

El modelo animal utilizado fue ratas Sprague-Dawley machos (CrI:OFA (SD), Charles River, France) . El peso apto para la cirugía era entre 250 y 350 gramos. Las ratas se compraban de 8 semanas con un peso de 201-225 gramos y se estabulaban en

el Servei d'Estabulari de la UAB durante 1 semana mínimo para su aclimatación y para alcanzar el rango de peso adecuado.

La cirugía fue practicada bajo una lupa binocular Leica MZ95 (Leica Microsystems, Suiza) equipada con una fuente de luz KL1500 LCD (Leica Microsystems, Suiza). Para la anestesia se utilizó anestesia inhalada suministrada mediante equipo de anestesia McKinley tipo 2 (Everest, España). Inicialmente las ratas se anestesiaron en una caja de inducción con una dosis del 4% de Isoflurano (IsoVet, Braun) en oxígeno (Carburos Metálicos, España). Durante la cirugía se mantenía la anestesia mediante mascarilla facial entre 1,5-2,5% de Isoflurano en oxígeno.

La rata se colocaba en posición supina sobre una manta eléctrica para mantener la temperatura del animal constante. La monitorización de la temperatura se realizaba mediante sonda rectal (TES1307 Datalogging K/J, Electrical Electronic Corporation) con registros de control de la temperatura cada 10 minutos para mantener la temperatura a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. El animal se inmovilizaba con ligaduras de sujeción en las extremidades para mantenerlo lo más extendido posible (para no causar dolor ni restringir la circulación sanguínea del animal se utilizaba cinta adhesiva).

Seguidamente se afeitaba y desinfectaba la zona del cuello con antiséptico (Betadine®), se practicaba una incisión mediante tijera en la línea media (desde la parte inferior de la mandíbula hasta la clavícula y se exponía el sistema carotídeo derecho (que quedaba a la izquierda en la posición supina). Para mantener abierta la zona quirúrgica se utilizó un retractor (Goldstein Retractor, 1,8 cm Spread, Fine Science Tools (FST).

Los pasos descritos a continuación se muestran gráficamente en la Figura 44: Para reducir el flujo sanguíneo colateral se interrumpieron todas las ramas de la arteria carótida externa y las ramas extracraneales de la arteria carótida interna. Este procedimiento se realizó cauterizando la arteria tiroidea superior y la arteria occipital (Small Vessel Cauterizer, Fine Science Tools (FST) y haciendo una ligadura firme con sutura en la arteria pterigopalatina y en la carótida externa (seda trenzada Ethilon 6/0, Sangüesa). En la carótida externa se colocó otra sutura alrededor de ésta mediante un

nudo laxo (distanciada lo más posible de la primera). Con un clip quirúrgico se obturó el flujo de la arteria carótida interna y la carótida común y se procedió a cortar la carótida externa entre los 2 nudos. A continuación, en la parte de la carótida externa que quedaba conectada a la interna se introdujo el filamento de nailon de 4/0 (Ethicon blue nylon 4/0, Sangüesa) con el extremo redondeado. Se hizo avanzar unos 20 mm (retirando el clip de la carótida interna) pasando por el polígono de Willis hasta ocluir la entrada de la arteria cerebral media (que se detectaba notando una ligera resistencia al avance una vez introducidos los 20 mm). Si la resistencia se notaba antes de los 20 mm o después era necesario cambiar el diámetro del extremo redondeado del filamento para adaptarlo al tamaño de los vasos del animal ya que se podía estar ocluyendo otra arteria o incluso provocar una hemorragia subaracnoidea. Una vez colocado el filamento se cerró la ligadura del extremo de la arteria carótida externa y se retiró el clip de la arteria carótida común para permitir el flujo sanguíneo en el segmento nuevamente accesible en el animal (Figura 44). Se suturó la incisión en el cuello del animal (seda trenzada Ethilon 4/0 punta triangular, Sangüesa) y el animal se despertó y se mantuvo en observación de forma aislada y/o se le realizaron las pruebas de resonancia magnética para comprobar que se estaba produciendo la lesión isquémica

Una vez transcurridos los 90 minutos de isquemia se volvió a anestésiar el animal y se retiró el filamento de nailon. Para realizar este procedimiento se extrajo el filamento lentamente hasta que la punta redondeada tocó la ligadura de la carótida externa, y se recolocaron los clips en la carótida interna y la carótida común para evitar que el animal se desangrase. Con ayuda de unas microtijeras (Vannas Spring Scissors, 4 mm-, Fine Science Tools (FST)) se cortó la sutura del extremo de la carótida externa liberando el filamento, y se hizo una nueva ligadura en este punto asegurando bien el nudo para que el sistema vascular quedara cerrado. Finalmente se retiraron los clips, se suturó el animal, se desinfectó la herida con Betadine y se despertó el animal

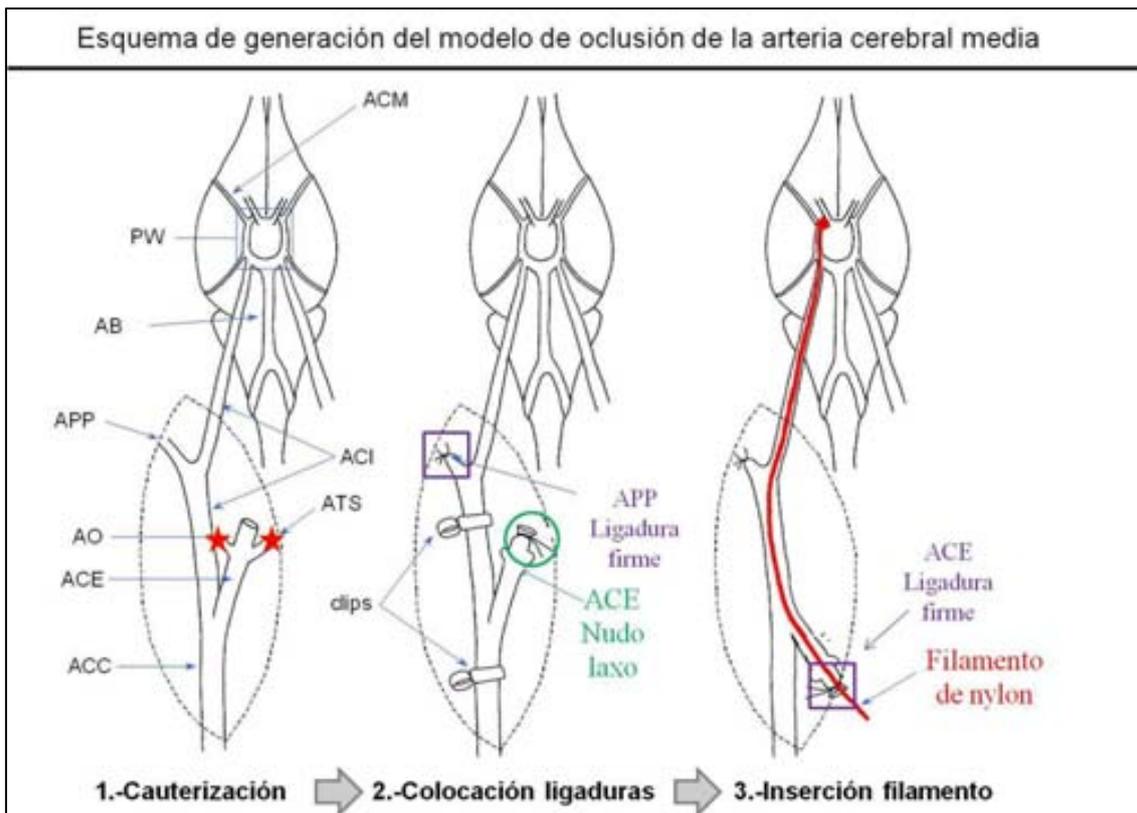


Figura 44: Esquema donde se muestran los pasos para la generación del modelo experimental de isquemia cerebral focal. Las siglas indican el nombre de las arterias: PW= polígono de Willis, AB= arteria basilar, APP= arteria pterigopalatina, AO= arteria occipital, ACE= Arteria carótida externa, ACC= arteria carótida común, ACM= arteria cerebral media, ACI= arteria carótida interna ATS = arteria tiroidea superior. Los símbolos de estrella de color rojo indican los puntos de cauterización de las arterias, los recuadros lilas indican los puntos de ligadura firme y el círculo verde el punto del nudo laxo para permitir la entrada del filamento de nylon. Figura modificada de: (Pérez-Asensio 2006)

Una vez realizado el procedimiento los animales estuvieron estabulados con ciclos de luz de 12h luz / 12 horas oscuridad con comida y agua *ad libitum* y se estableció un protocolo con criterios de punto final para la supervisión del dolor post-quirúrgico.

4.1.1. Pauta de analgesia

Para minimizar el dolor del animal se estableció una pauta de analgesia de una inyección subcutánea de 1 mg/kg de peso de Meloxicam (Metacam, Boehringer Ingelheim, concentración:5 mg/ml) al finalizar la cirugía y otra dosis igual a 1 día post-isquemia (que se administraba al finalizar la exploración por resonancia magnética a 1 día post-isquemia).

4.2. Administración de terapia (Citicolina)

Un total de 6 animales con infarto confirmado por imagen de angiografía y difusión de RMN fueron tratados con Citicolina (formato sal monosódica, suministrada por Ferrer Internacional S.A) divididos en 2 grupos experimentales: sacrificados a 1 día post-isquemia y sacrificados a 7 días post-isquemia. Para diferenciar el grupo de los animales tratados de los no tratados se añadió la letra C (de Citicolina). Por lo tanto se denominaron 1 día-C post-isquemia y 7 días-C post-isquemia.

Una disolución madre de Citicolina en suero fisiológico (cloruro sódico (NaCl) 0,9%, Braun) se preparó diariamente a una concentración de (200mg/ml). A partir de esta disolución madre se prepararon las dosis para administrar a los animales, de 500 mg/kg para las 2 dosis del primer día y de 250 mg/kg para 4 dosis de los sucesivos días. La administración fue por vía intraperitoneal (i.p.) inyectando de forma alternativa en la parte derecha e izquierda del cuerpo(Figura 45).

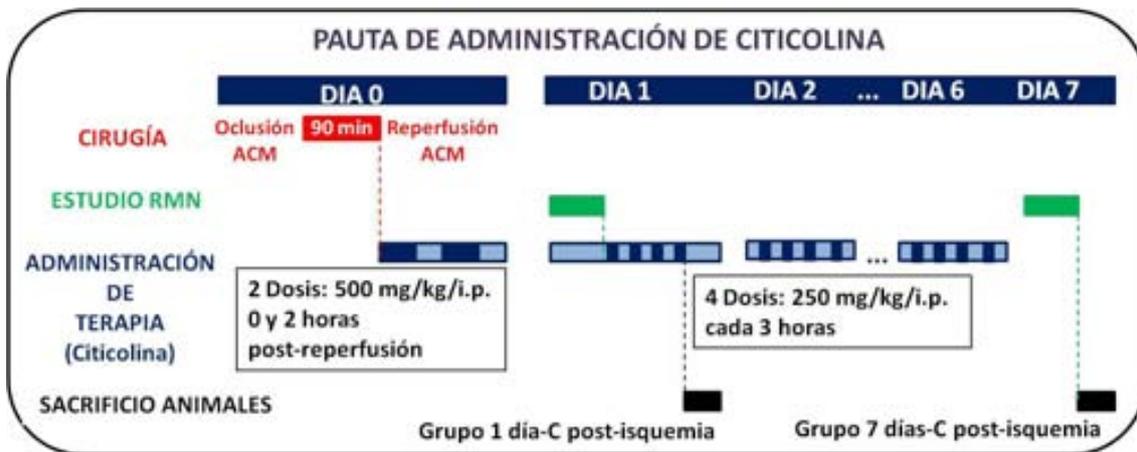


Figura 45: Protocolo experimental para el análisis del efecto de la Citicolina en el modelo experimental de isquemia cerebral MCAO con reperusión a los 90 minutos. En rojo se muestra la cirugía que determina el punto de inicio de la pauta de la administración de Citicolina (en el momento de inicio de la reperusión). En verde se muestran los estudios por RMN realizados a los animales. En azul la pauta de administración de Citicolina con las dosis administradas. Los puntos suspensivos (...) entre el día 2 y el día 6 indican que las dosis administradas fueron las mismas que en éstos. En negro se muestra el punto de sacrificio de los grupos experimentales 1 día-C post isquemia y 7 días-C post isquemia. Las líneas discontinuas indican la relación temporal entre distintos “eventos”.

4.3. Exploraciones mediante resonancia magnética

Todos los estudios de resonancia magnética *in vivo* se realizaron utilizando un aparato BioSpec 70/30, (Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania) instalado en el Servei de RMN (SeRMN) de la UAB, equipado con bobina B-GA12 insertada en un sistema de gradientes B-GA20S) y una sonda de recepción de superficie en cuadratura, desacoplada activamente de una sonda de emisión de volumen de 72 mm de diámetro interno.

Esta configuración de alto rendimiento proporciona intensidades de gradientes de hasta 400mT/m, con velocidades de cambio de 5.500T/m/s y tiempos de activación de 80 microsegundos, y dispone de corrientes para la homogeneización del campo magnético sobre la muestra elevadas, que pueden alcanzar los 240Hz/cm²/A.

4.3.1. Imagen de inicio del experimento RMN: Secuencia Tripilot

Esta secuencia de imagen es la imagen inicial estándar antes de cualquier estudio de RMN *in vivo* en los protocolos diseñados. Es una secuencia de imagen de muy baja resolución que permite la colocación del animal en los 3 planos dentro del imán. El punto donde convergen las líneas en la Figura 46 es el centro del campo magnético del imán (el isocentro) en donde queremos colocar el volumen de interés del animal a investigar.

Parámetros de adquisición de la secuencia Tripilot: Secuencia *Fast, Low-Angle Shot* (FLASH); campo de vista (FOV), 50 x 50 x 50 mm; matriz (MTX) = 128 x 128 x 128 (391 x 391 x 391 $\mu\text{m}/\text{pixel}$); TE/TR = 5/100 ms; número de promedios (NA) = 4; tiempo total de adquisición (TAT) = 12 segundos.

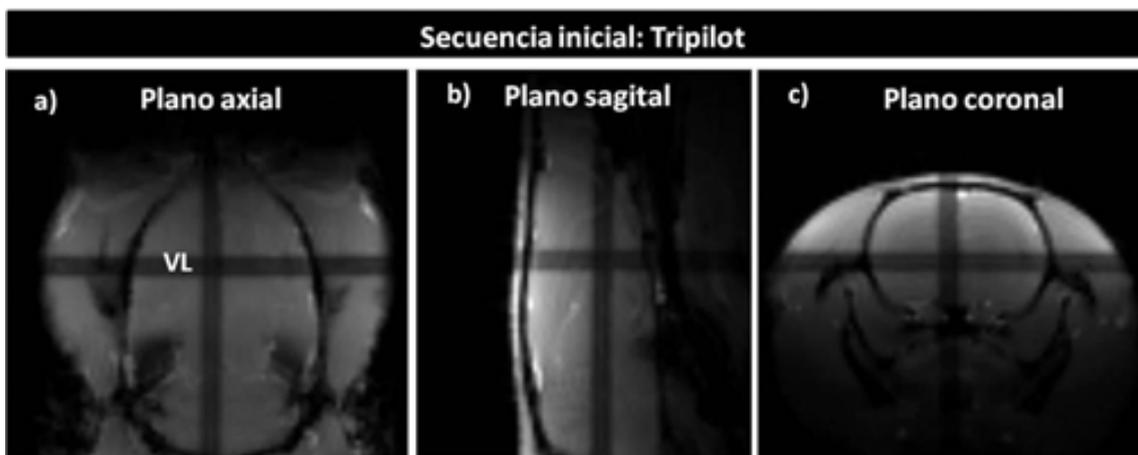


Figura 46: Imágenes que se muestran con la secuencia TriPilot en las 3 direcciones **a)** axial, **b)** sagital y **c)** coronal. La nomenclatura de los planos se ha hecho coincidir con la utilizada en el ámbito de la histología (aunque pueda diferir de la nomenclatura que se utiliza en resonancia en que a) sería el plano coronal y c) el plano axial). La secuencia Tripilot permite ver la colocación del animal en el imán para optimizar su posición, las cruces en cada plano indican el centro del campo magnético (isocentro) que es donde la señal estará optimizada. En nuestro caso, ya que el principal interés era en el análisis de las ZSVs, el isocentro se desplaza anteriormente en el plano axial para hacerla coincidir con la posición de los ventrículos laterales que se indica como VL.

4.3.2. Imagen de angiografía

La imagen de angiografía se utilizó para determinar la existencia de oclusión de la ACM derecha y su posterior reperfusión durante el procedimiento de generación del modelo experimental.

Este tipo de imagen no se pudo realizar en todos los animales por falta de disponibilidad de tiempo de exploración en el escáner Biospec. Por ello, únicamente se llevó a cabo en un subgrupo para poner a punto el tamaño de lesión que debía corresponder a una completa oclusión de la ACM derecha a 1 día post isquemia, valorado por T_2 (ver también sección 4.3.4).

Parámetros de adquisición de la angiografía 3D-TOF: Secuencia FLASH; FOV= 32 x 32 x 32 mm; MTX = 128 x 128 x 128 (250 x 250 x 250 $\mu\text{m}/\text{pixel}$); TE/TR = 2,5/15 ms; ángulo de giro = 20°; NA= 1; sonda de adquisición utilizada= de superficie de cabeza de rata; TAT= 3 minutos y 4 segundos.

La reconstrucción de la angiografía se hizo de forma automática utilizando la función de *Maximum Intensity Projection* (MIP) en Paravision 5.0. El plano axial era el que permitía una mejor visualización de la oclusión de la ACM (Figura 47b.1 y b.3).

4.3.3. Imagen de difusión

La imagen de difusión permite detectar el edema citotóxico intracelular previo al infarto. En nuestro caso se adquirió la imagen de difusión para valorar la zona afectada por el infarto durante el proceso de oclusión de la arteria y asegurar que afectaba a la región del estriado y el córtex cerebral y que el procedimiento quirúrgico había sido realizado con éxito.

Para ello se utilizaron las imágenes de los mapas de ADC (Figura 47 b.2.). Para asegurar la detectabilidad del edema citotóxico, que es lo que crea la disminución de los valores de ADC en la fase aguda de la isquemia, las imágenes se obtuvieron alrededor de los 30 minutos desde el inicio de la oclusión donde ya era visualizable la zona afectada. Según describieron Neumann-Haefelin y colaboradores (Neumann-

Haefelin et al. 2000) con 30 minutos de isquemia en rata la lesión ya evoluciona típicamente a infarto a pesar de que se produzca la reperfusión.

Parámetros de adquisición de la secuencia de difusión DTI: Secuencia DTI eco-planar (DTI-EPI); TE/TR= 30/3100 ms; orientación= axial; FOV = 32 x 32 mm; MTX = 128 x 128 (250 x 250 μ m/pixel); número de cortes (NS) = 12; grosor de cada corte (GS) = 1 mm; distancia entre cortes (DS) = 0,2 mm; NA = 1; Ancho de banda espectral = 250 kHz; Duración del gradiente (δ)= 4 ms; Tiempo de aplicación entre 2 gradientes (Δ) = 16 ms; direcciones de difusión= 12; valor de b = 1000 s/mm² en este caso únicamente se utilizó un valor de b ya que el objetivo era obtener un mapa de ADC sin realizar cálculos precisos de valores de ADC); sonda de adquisición utilizada= de superficie de cabeza de rata; tiempo de adquisición total (TAT) = 3 minutos 30 segundos.

4.3.4. Imagen ponderada en T₂

La imagen ponderada en T₂(Figura 47 a,c) se utilizó para la obtención de imágenes para el estudio de los volúmenes de infarto y como base para la determinación de la colocación de los vóxeles de espectroscopía. Se tomaron imágenes de referencia de 3 planos (coronal, sagital y axial). El plano coronal se obtuvo con alta resolución y los otros 2 planos fueron en baja resolución.

Parámetros de adquisición de la imagen ponderada en T₂ de baja resolución: Secuencia RARE, *echo train length* = 8; FOV = 32 x 32 mm; MTX = 128x 128 (250x 250 μ m/pixel); NS =1; GS = 1,50 mm; DS = 0,10 mm; TR/TE = 2000/12ms; NA =1; orientación: axial, coronal, sagital; sonda de adquisición utilizada= de cuadratura de cabeza de rata; TAT = 24 seg.

Parámetros de adquisición de la imagen ponderada en T₂ de alta resolución: Secuencia RARE, *echo train length*= 8; FOV = 32 x 32 mm; MTX = 256 x 256 (125 x 125 μ m/pixel); NS = 30; GS = 0,5mm; DS= 0,1mm; TR/TE = 4200/36ms; NA = 4; orientación= coronal; sonda de adquisición utilizada= de cuadratura de cabeza de rata, TAT = 6 minutos y 43 segundos.

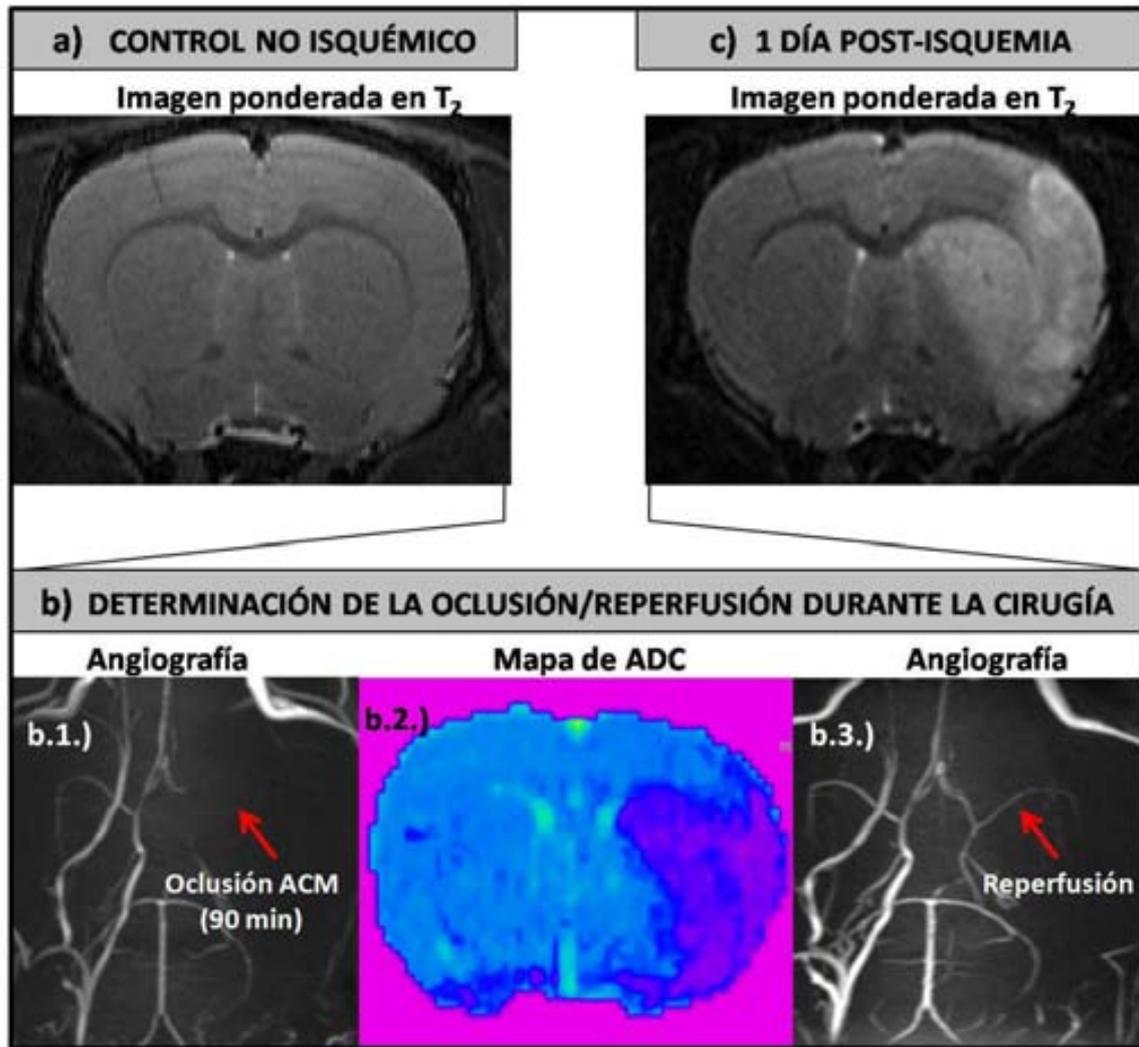


Figura 47: Secuencia de imágenes de la generación del modelo experimental. **a)** Imagen ponderada en T₂ de parénquima cerebral de rata sana. **b.1)** Angiografía realizada durante la oclusión donde se determina la pérdida de flujo sanguíneo en la arteria cerebral media (ACM) señalizada por la flecha roja. **b.2)** Mapa de ADC realizado durante la oclusión donde se aprecia disminución de señal en la región donde el tejido está comprometido. **b.3)** Determinación de la reperfusion de la ACM señalizada por la flecha roja mediante la técnica de angiografía (comparar imagen b.1 y b.3). **c)** Imagen ponderada en T₂ a 1 día post-isquemia donde la zona de hiperintensidad determina el alcance global del infarto.

4.3.5. Análisis de parámetros derivados de la IRM

Las imágenes de resonancia se utilizaron para la determinación de varios parámetros de interés como el volumen de infarto y el porcentaje de edema.

4.3.5.1. Cálculo del volumen de infarto

El volumen del infarto se midió a partir de las imágenes de alta resolución ponderadas en T_2 en el plano coronal del animal.

La medida se realizó mediante un sistema de generación de regiones de interés (ROI; del inglés: *Region of Interest*) con el programa Paravision 5.0 (Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania). Dicho programa calcula el área de las ROIs basándose en el número de píxeles y su superficie unitaria (Figura 48).

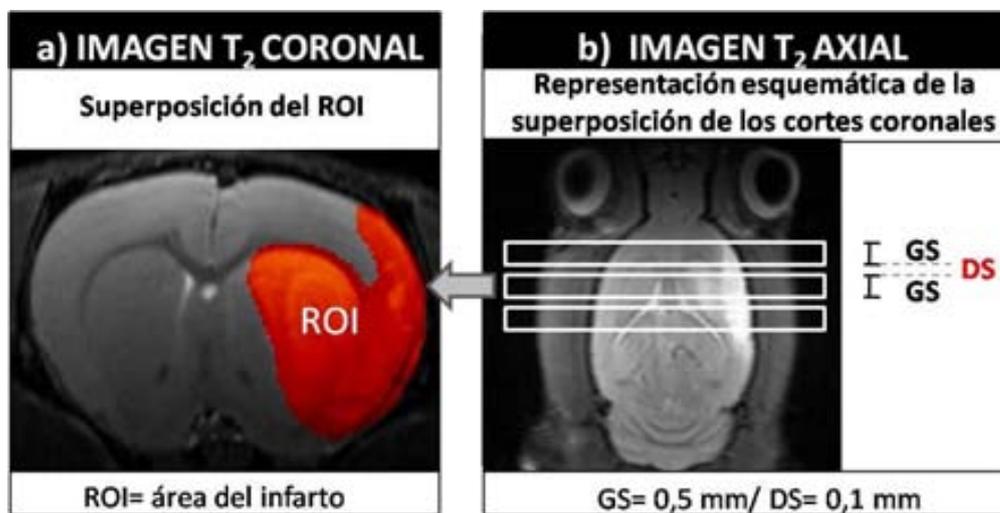


Figura 48: Cálculo de volumen del infarto a partir de IRM. **a)** Superposición manual del ROI en la imagen ponderada en T_2 mediante el programa Paravision 5.0; **b)** Representación esquemática (no al tamaño real donde son mucho más finos) de la superposición de los cortes para determinar el volumen de la lesión.

El área de la lesión en píxeles se multiplicó por el área del píxel y por el grosor de la sección y la distancia entre secciones tal y como se muestra en la Ecuación 12:

$$VI \text{ (mm}^3\text{)} = ((ROI \cdot GS) + ((ROI_2 + \dots + ROI_n) \cdot (GS + DS))) \cdot 0,016$$

Ecuación 12: Ecuación de cálculo del volumen de infarto a partir de imágenes 2D. Abreviaturas: VI = Volumen de infarto, ROI = región de interés (en número de píxeles); GS= Grosor de la sección (en el protocolo experimental era 0,5 mm); DS= Distancia entre 2 secciones (en el protocolo experimental era de 0,10 mm); El factor multiplicador es el área en mm² de cada píxel (en el protocolo experimental era 0,016 mm²= 0,125*0,125 mm).

4.3.5.2. Cálculo del porcentaje de edema

El cálculo del porcentaje de edema se determinó a partir de la diferencia de volúmenes entre el hemisferio ipsilateral respecto al contralateral.

Los volúmenes (V) de cada hemisferio (V hemisferio contralateral y V hemisferio ipsilateral) se calcularon de forma similar a como se mostró en la Ecuación 12, aunque en este caso la región de interés era cada uno de los hemisferios delimitados por la línea media, que en caso de edema se encuentra desplazada en el hemisferio ipsilateral (Figura 49).

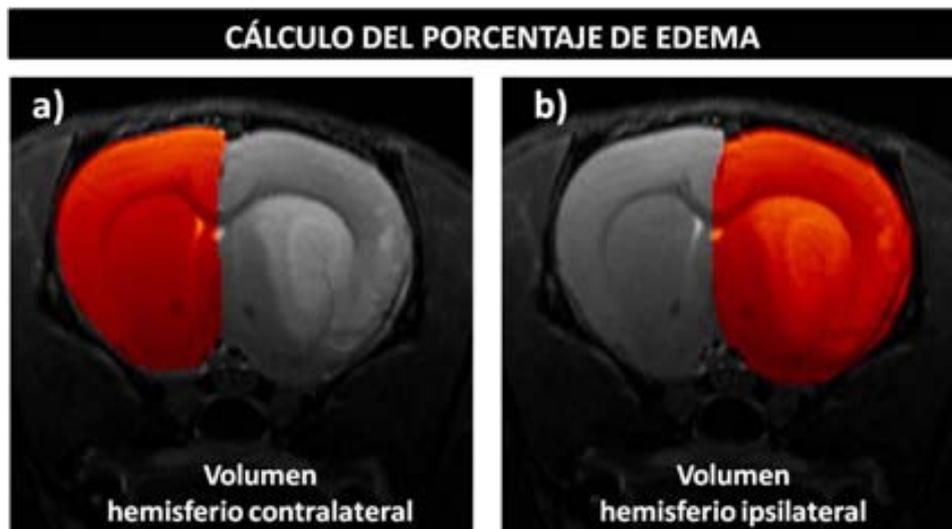


Figura 49: Cálculo del volumen de cada hemisferio para el cálculo del porcentaje de edema. **a)** Hemisferio contralateral y **b)** hemisferio ipsilateral. El volumen del hemisferio se calcula hasta la línea media.

Una vez obtenidos los volúmenes de infarto para cada hemisferio el cálculo del % de Edema se realizó como se muestra en la Ecuación 13 extraída de (Moldes et al. 2012):

$$Edema(\%) = \left(\frac{V_{H.ipsi} - V_{H.contra}}{V_{H.contra}} \right) \cdot 100$$

Ecuación 13: Ecuación de cálculo del porcentaje de edema cerebral. $V_{H.contra}$ = volumen del hemisferio cerebral contralateral y $V_{H.ipsi}$ = volumen del hemisferio ipsilateral. Los volúmenes de los hemisferios eran calculados en base a ROIs siguiendo la fórmula descrita en la Ecuación 12.

4.3.6. Espectroscopía *single voxel*

Para la realización de los estudios de espectroscopía se trabajó con la sonda de superficie de cuadratura (*phased-array*) con 4 elementos. Se trata de un tipo mejorado de sonda de recepción. Este tipo de sondas, de estructura modular, permiten una disminución del número de repeticiones obteniendo un mejor cociente de señal a ruido y una mejor resolución tanto en imagen como en espectroscopía.

Para la realización de la espectroscopía SV se utilizó un volumen de interés de $2 \times 2 \times 4,5$ mm (volumen total: $18 \mu\text{l}$). La información se adquiría de la zona de infarto, zona subventricular ipsilateral, zona subventricular contralateral y hemisferio contralateral (Figura 50). Todos los vóxeles estaban situados a la misma altura y sólo se desplazaban horizontalmente para obtener el espectro de las distintas regiones para evitar posibles diferencias de captación de señal en cuanto a la distancia respecto a la bobina de recepción (situada en la superficie del cráneo).

La colocación de los vóxeles se determinaba mediante su posicionamiento sobre una imagen coronal ponderada en T_2 de alta resolución.

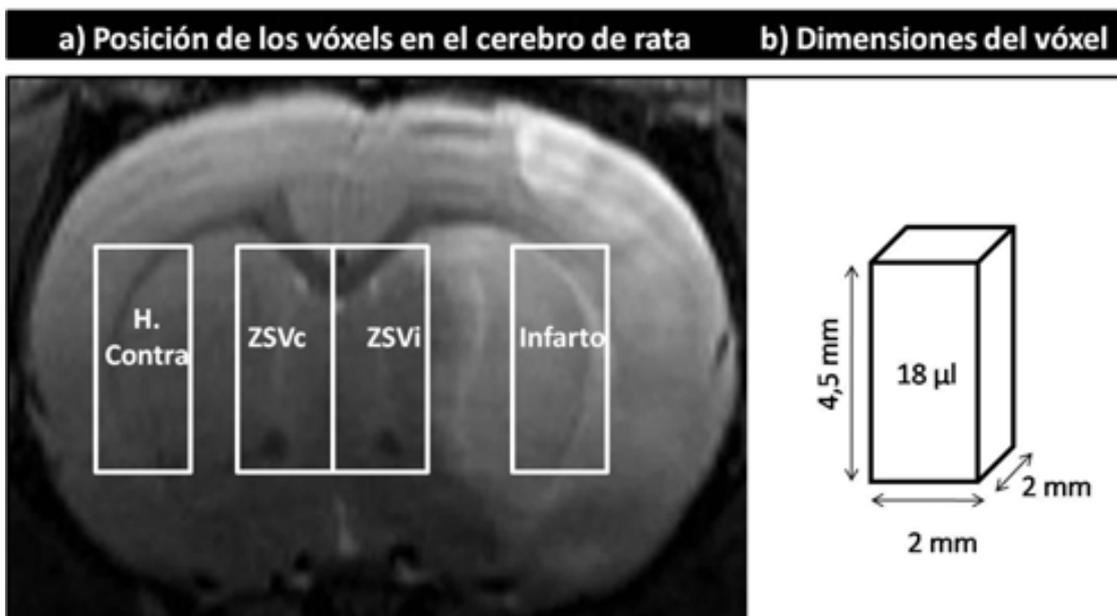


Figura 50: Representación esquemática de las zonas de análisis del patrón metabólico por ERM. a) Imagen coronal ponderada en T_2 de cerebro de rata 1 día post-infarto con la colocación de los vóxeles (recuadros de color blanco) en las distintas regiones de interés. H.contra = hemisferio contralateral, ZSVc= Zona subventricular contralateral, ZSVi= Zona subventricular ipsilateral e Infarto; b) Representación esquemática tridimensional de las dimensiones del vóxel utilizado para ERM *in vivo*.

Previamente a la obtención del espectro los *shims* lineales y de segundo orden fueron ajustados automáticamente con el método FASTMAP en un volumen de $5 \times 5 \times 5$ mm, dentro del cual estaba incluido el VOI.

Parámetros espectrales: Anchura de banda espectral= 13,34ppm/4006,41 Hz; TE= 12 ms; TR= 1800 ms; número de puntos: 16k (8k reales); NA = 256; sonda de adquisición utilizada= de cuadratura de cabeza de rata; TAT =7 min 48 seg.

Todos los protocolos de imagen y espectroscopía *in vivo* fueron optimizados previamente por la Dra. Silvia Lope-Piedrafita del Servei de Ressonància Magnètica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

4.3.7. Espectroscopía multivóxel

Las secuencias de IERM se adquirieron utilizando el método *2D Chemical Shift Imaging* (CSI) con localización PRESS. Los parámetros utilizados fueron: FOV= 32 x32mm; Volumen de Interés (VOI)= 6x 6 x 2 mm; GS= 2 mm; TE= 14ms; TR= 1500 ms; NA= 7; NEX=1200); ancho de banda espectral= 13,34 ppm (4006,41 Hz). La supresión de agua se efectuó con el método VAPOR (300 Hz de ancho de banda). Los *shims* lineales y de segundo orden fueron ajustados automáticamente con el método FASTMAP en un volumen de 7 x 7 x 7 mm, dentro del cual estaba incluido el VOI. Seis bandas de saturación ((GS10 mm; pulsos *sech-shaped*: 1,0ms/20250Hz) se posicionaron alrededor del VOI para minimizar el efecto de las señales provenientes del exterior. La resolución espacial obtenida quedó definida por una matriz de 16x 16vóxels en el FOV (4 µl de resolución nominal).Número de puntos=2048, sonda de recepción utilizada = de superficie; TAT = 30 min 6 seg. Posteriormente, mediante una interpolación de Fourier, se reconstruyó una matriz de 64 x 64, tal y como se describe en (Simoes et al. 2010).

4.3.8. Sacrificio de los animales por perfusión transcardíaca

Todos los animales que al final de los estudios de IRM/ERM fueron analizados por inmunohistoquímica se sacrificaron mediante el método de la perfusión transcardíaca con paraformaldehído, que permite la obtención del tejido cerebral fijado sin presencia de sangre (Figura 51).



Figura 51: Imagen de la diferencia entre un cerebro de rata sacrificado por el método de perfusión transcardíaca o por cualquier otro método de sacrificio. Imagen modificada de la página web de Leica-microsystems (<http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/sacrifice-perfusion-in-animal-research/>).

El procedimiento detallado a continuación se llevó a cabo en una campana de flujo laminar ya que la solución fijadora es tóxica.

Para la realización de la perfusión transcardíaca (Figura 52) se anestesió el animal con una sobredosis de pentobarbital sódico de 100 mg/kg (Dolethal, Vetoquinol solución inyectable concentrada 0,2 g/ml) intraperitoneal. La dosis tenía que ser elevada para que el animal no sufriera dolor, pero no lo suficiente como para provocar una parada cardíaca. Una vez comprobado que el animal no tenía reflejos, se sujetaba la piel del animal donde se tenía que hacer la incisión para evitar cortar las vísceras y se hacía un corte paralelo al diafragma. A partir de este corte se realizaba uno en forma de U cortando el diafragma y realizando 2 incisiones laterales desde la altura del diafragma hasta la axila del animal cortando las costillas de manera que se podían levantar y separar en bloque para poder acceder al corazón. Una vez realizado este paso entra aire en la cavidad torácica del animal no puede respirar con lo que hay que actuar de forma rápida, antes de que ocurra la parada cardíaca. Seguidamente se obturó el flujo de la aorta descendente con ayuda de unos fórceps para evitar que la infusión llegara al riego corporal caudal y así reducir la cantidad de fijador necesario. A continuación se introdujo palomilla Valu-Set 23G (0,6 x 19x 305 mm) (Becton Dickinson, Alemania) en el ventrículo izquierdo del corazón unida a una jeringa de 60 ml con solución salina y se activó la perfusión a una velocidad de 15 ml/min utilizando una bomba de inyección (Bomba AL-2000, World Precision Instruments). Una vez

empezada la infusión, se realizó rápidamente un corte en la aurícula derecha del animal para permitir que saliera la sangre del animal en primer lugar y seguidamente las soluciones de lavado y fijadora. Las soluciones utilizadas para la perfusión fueron primero 180 ml de solución salina (NaCl 0,9% (p/v) (Sigma) en agua destilada (3 jeringas de 60 ml) y posteriormente 180 ml de paraformaldehído (PFA) (Panreac) al 4% en tampón fosfato (PB) (0,1M, pH 7,4) (3 jeringas de 60 ml). En una correcta perfusión, además de mostrar el cerebro un aspecto similar al del cerebro perfundido de la Figura 51, la parte superior del animal queda rígida debido a la perfusión de los músculos. En cuanto al riego pulmonar, aunque no está obstruido mecánicamente con ningún elemento, si el corte de la aurícula es correcto no debería producirse el encharcamiento de los pulmones, ya que sólo interesa la perfusión del riego corporal rostral.

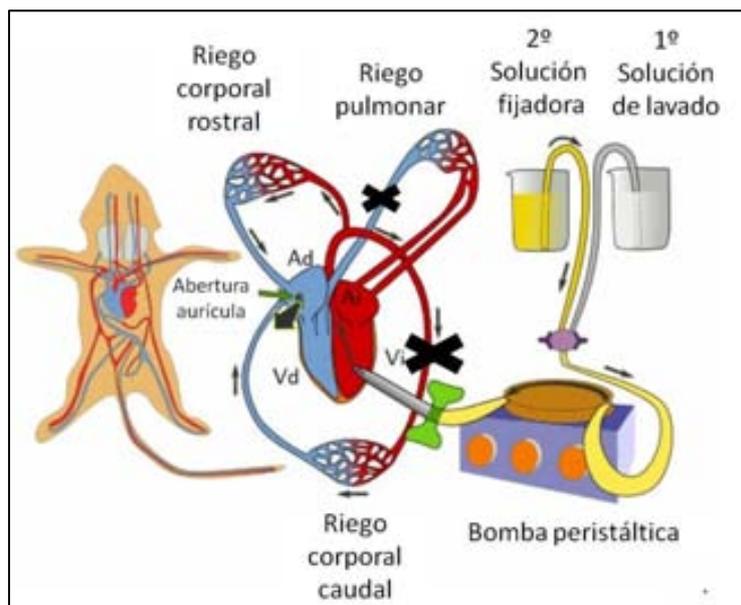


Figura 52: Esquema de la metodología de perfusión transcárdica, en este caso con método de bomba peristáltica. En nuestro caso, al no disponer de bomba peristáltica se utilizaron bombas de inyección con las soluciones contenidas en jeringas de 60 ml. Sin embargo, la metodología es equivalente. Las abreviaturas indican: Ad= aurícula derecha, Ai = aurícula izquierda, Vd= Ventrículo derecho, Vi= Ventrículo izquierdo. El sistema vascular marcado en rojo corresponde al carotideo y en azul al venoso. Las cruces negras indican los puntos donde no había infusión ya que se había obturado mecánicamente la circulación para evitar que se perfundiera la mitad inferior del animal que no es de interés para el estudio o porque el método de perfusión elimina esa parte de la circulación.

4.3.8.1. Post-fijación de las muestras para inmunohistoquímica

Una vez obtenidos los cerebros según 4.3.8 se guardaron en 30 ml de solución de PFA al 4% durante 1 día. Seguidamente se procedió a hacer 3 lavados de 10 minutos en PB 0,1 M; pH 7,4 (Na₂HPO₄, Panreac) en agitación mediante un agitador(Heidolph Rotamax 120, Schwabach, Alemania) y finalmente se conservaron en PB + azida sódica al 0,05% (p/v); pH 7,4 a 4 °C hasta el momento de su análisis.

4.3.9. **Sacrificio por irradiación con microondas focalizadas**

Los animales en los que el objetivo era parar el metabolismo para estudios de resonancia magnética *ex vivo* a campo alto con HRMAS se sacrificaron con el método de irradiación por FMW. Para diferenciar el grupo de los animales sacrificados por perfusión transcardíaca destinados a inmunohistoquímica de los sacrificados por FMW destinados a estudios de HRMAS se identificaron estos animales añadiéndoles la letra F (de FMW). Por lo tanto se denominaron el grupo 1 día-F post-isquemia y 7 días-F post-isquemia

Esta tecnología requirió la utilización de un sistema de irradiación *Muromachi microwave fixation system* (modelo TMW -6402C, Muromachi, Kikai Co. LTD. Tokyo). En el SeRMN de la UAB está disponible un equipo de potencia 5 kw(Figura 53).

Después del análisis por resonancia magnética *in vivo* con el Biospec, aprovechando que los animales estaban profundamente anestesiados, se colocó el animal en el soporte de rata específico para este procedimiento. Actualmente los soportes contienen un sistema de recirculación de agua para mejorar la irradiación. En nuestro caso se utilizó un modelo más antiguo, que no contenía este sistema (el soporte de rata fue cedido por la Dra. Anna Planas). Hay varios tamaños de soporte y se utilizó el más pequeño (para ratas de 150-250 g). El soporte permite una perfecta sujeción de la cabeza animal para evitar un posible movimiento debido al efecto de la irradiación que pudieran afectar al resultado final.

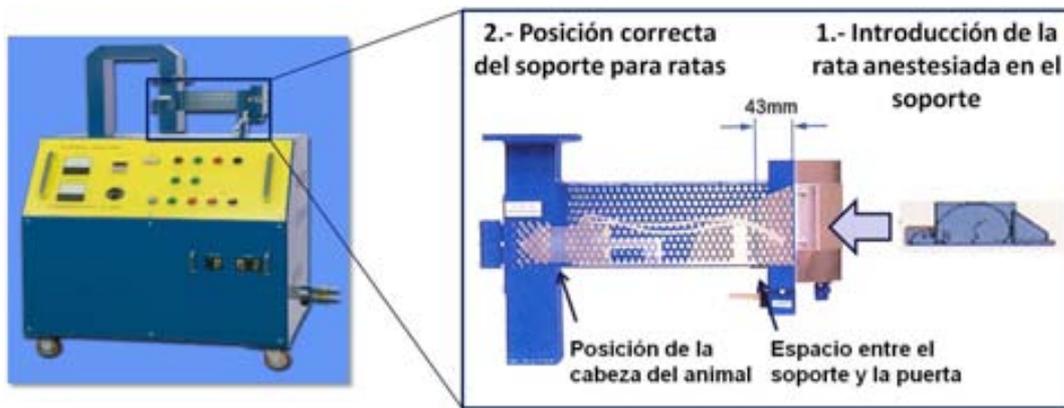


Figura 53: Sistema de irradiación por microondas focalizadas (Muromachi, Kikai Co. LTD. Tokyo) donde se muestran un dibujo esquemático el procedimiento de colocación del animal para la irradiación. Imagen modificada de la página web de Muromachi: <http://www.muromachi.com>

Previamente a la irradiación se conectó el baño de agua recirculante HAAKE DC10-K15 para permitir la refrigeración adecuada del aparato antes de la irradiación. Tiempo aproximado de refrigeración: 1 hora. Una vez listo el aparato se pueden realizar tantas irradiaciones como se desee dejando unos 3 minutos entre cada una.

El tiempo óptimo de irradiación se determinó en 1,2 segundos a una potencia de 5 kw para ratas entre 250-300 gramos, aunque el pico de irradiación se produce en cuestión de ms.

Una vez irradiado el animal se procedió a la extracción del cerebro de forma muy cuidadosa ya que el aumento de temperatura hace que, aunque mantiene su estructura (Figura 54) su consistencia sea más gelatinosa. Una vez extraído el cerebro se guardó entero en N₂ líquido hasta el momento de su análisis por HRMAS.



Figura 54: Imagen de la diferencia entre un cerebro de ratas sacrificado por sobredosis de anestesia y por irradiación con microondas focalizadas. Imagen modificada de la página web de Leica-microsystems(<http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/sacrifice-perfusion-in-animal-research/>) y Muromachi (<http://www.muromachi.com>).

4.3.10. Espectroscopía *ex vivo* por HRMAS

Para la preparación de la muestra para análisis HRMAS se obtuvieron los cerebros conservados a -80°C . Después de un período de atemperación a temperatura ambiente se realizó con un bisturí un corte coronal para la obtención de una loncha de unos 2 mm de grosor situada a la altura de los ventrículos laterales (Figura 55c). En la loncha se practicaron 2 cortes transversales a la altura de la parte superior e inferior del cuerpo calloso (Figura 55d) y seguidamente se obtuvieron los trozos de tejido correspondientes a la zona de infarto y contralateral y las 2 zonas subventriculares en base a la colocación de los vóxeles de espectroscopía localizada en la imagen (Figura 55 a y b).

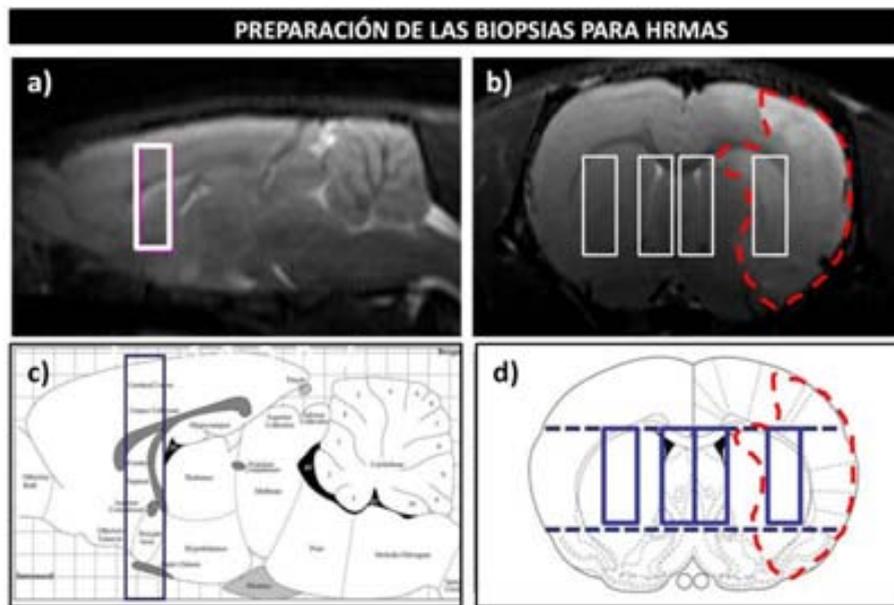


Figura 55: Esquema acerca de la realización de los cortes en el cerebro de rata para la obtención de las muestras que posteriormente serían analizadas por HRMAS. Fila superior: Imagen obtenida in vivo mediante IRM en Biospec a 7T **a)** Imagen T₂ en el plano sagital donde se muestra la posición de los vóxeles *in vivo*, **b)** Imagen T₂ en el plano coronal donde se ve la colocación de los vóxeles para el análisis del territorio de la ACM y las ZSVs. La zona rodeada por una línea discontinua roja indica el alcance del infarto Fila inferior: Obtención de las biopsias en el tejido **c)** Realización de un corte de 2mm de grosor en el área de las ZSVs. Y **d)** Las líneas discontinuas superior e inferior azules indican corte transversal a nivel del cuerpo caloso y las líneas continuas azules la obtención de 4 biopsias en las mismas posiciones que muestra la imagen *in vivo*. La zona rodeada por una línea discontinua roja indica la posición del infarto.

Una vez obtenidos los 4 segmentos de tejido (biopsias), estos fueron introducidos en 4 rotores independientes. Los rotores utilizados eran los estándares para la técnica de HRMAS que son de zirconio y tiene capacidad de muestra de 50 μ l y 4 mm de diámetro (Cortecnet, France).

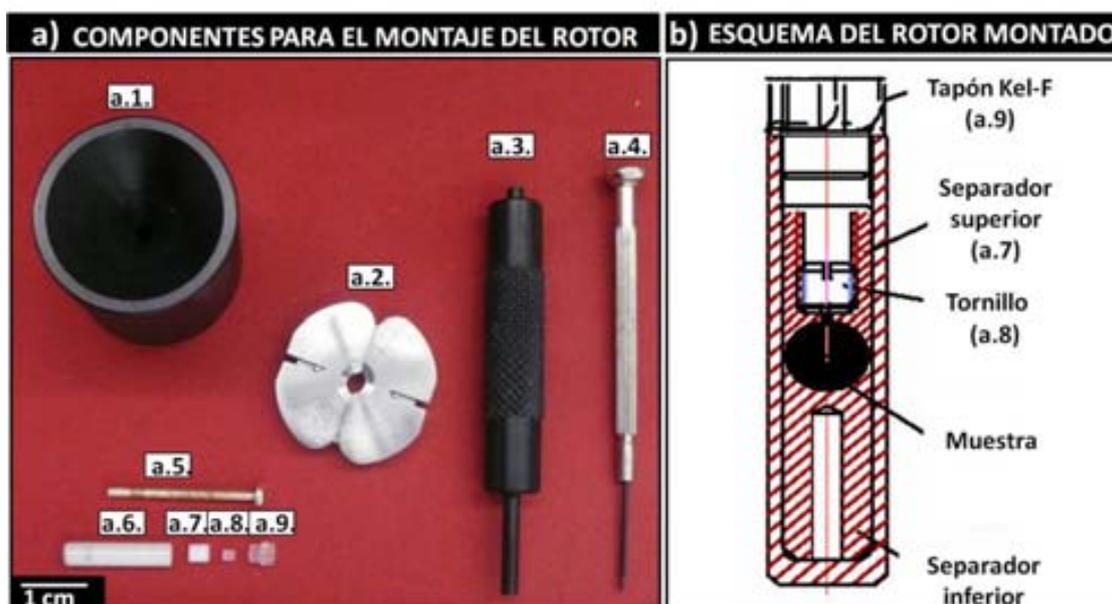


Figura 56: Accesorios para el análisis de muestras de HRMAS y esquema de la colocación final de estos para el análisis de dichas muestras. a) Accesorios para el análisis de las muestras por HRMAS: Por partes, los componentes son: a.1. Embudo de HRMAS (*HRMAS filling funnel*), a.2. Retirador de tapón (*rotor cap remover*), a.3. Empaquetador de HRMAS (*HRMAS rotor packer*), a.4. Destornillador, a.5. Tornillo cilíndrico, a.6. Rotor de zirconio, a.7. Separador superior, a.8. Tornillo, a.9. Tapón Kel-F. La barra blanca dentro del rectángulo negro del extremo izquierdo inferior es una medida de tamaño que indica 1 cm. b) Dibujo esquemático de la colocación final de la muestra en el rotor de zirconio. Imagen modificada de: (Simões RV 2012) y <http://triton.iqfr.csic.es/guide/man/hrmas/chap4-1.html>)

Para controlar el peso de muestra utilizado en cada caso, se pesaron las piezas del rotor sin la muestra en el interior y, posteriormente, con la muestra incorporada en una balanza de precisión (Balanza Sartorius, Sartorius AG, Alemania). Así, se pudo controlar que el peso estuviera dentro de un rango similar de, aproximadamente, 15 ± 5 mg. Al rotor se añadieron unos 10 μl de agua deuterada (D_2O , Euriso-top, Centre d'études de Saclay) salina (0,15 M NaCl) fría hasta rellenarlo para permitir la detección de señal para “lock” de deuterio en el análisis de espectroscopía HRMAS. Finalmente se ensambló el rotor de la forma estándar (Figura 56b).

El análisis por HRMAS se llevó a cabo en un equipo AV400 con una consola AvanceIII y unidad de control de la temperatura equipado con una sonda HRMAS $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ (Bruker Española S.A., Madrid, España) que operaba a 9,4T (400 MHz para

^1H) con una velocidad de giro de 3000 Hz alrededor de un eje situado en la orientación del ángulo mágico $54,7^\circ$ respecto al campo magnético B_0 .

La adquisición de espectros se realizó a una temperatura de 37°C (Davila et al. 2012). Previamente se había calibrado la sonda de HRMAS para tener en cuenta el ligero aumento de temperatura a una determinada velocidad de giro (3000 Hz) de manera que la temperatura real de la muestra girando a 3000 Hz fuera de 37°C (Simões RV 2012).

Secuencias adquiridas:

1) Pulso-adquisición con presaturación de agua durante 2s (con atenuación de 54dB equivalente a 0,042 mW de potencia)

2) *Standard Hahn spin echo* con $TE=136$ ms con presaturación de agua como en 1).

Parámetros espectrales: Anchura de banda espectral: 10ppm/4000Hz; número de puntos: 16k (8k reales); tiempo de adquisición= 2,04 s, tiempo de reciclaje = 4,04 s; NA = 256; TAT = 15 min 34 seg.

Todos los protocolos de espectroscopía *ex vivo* fueron llevados a cabo en colaboración con Myriam Dávila del grupo de Aplicaciones Biomédicas de la Resonancia Magnética Nuclear (GABRMN) de la UAB.

4.3.11. Post-procesamiento de los espectros de RMN

4.3.11.1. Espectros *in vivo*

Los espectros de ERM *in vivo* fueron inicialmente procesados en la estación de trabajo equipada con el *software* Paravision 5.0 (Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania) que utiliza TopSpin versión 1.3.

A los espectros *in vivo* se les aplicó 4Hz de apodización antes de la transformada de Fourier. Se corrigió manualmente la fase de orden cero y uno y se ajustó la línea de base. Los espectros se referenciaron a Creatina (N-CH₃, a 3,03 ppm) como estándar interno de desplazamiento químico.

La región de interés del espectro comprendía el rango de 4,5 a 0,0 ppm (región donde se sitúan la mayoría de metabolitos de interés en nuestro caso) que en las condiciones de adquisición descritas en el apartado 4.3.6 equivale a 1383 puntos digitales.

El vector espectral así procesado se exportó como un fichero en formato ASCII para su análisis posterior.

4.3.11.2. Espectros ex vivo

Los espectros obtenidos mediante la técnica HRMAS fueron procesados de forma similar a como se hizo *in vivo*, variando algunos parámetros. La estación de trabajo del equipo de HRMAS es directamente TopSpin versión 1.3.

A los espectros de alta resolución se les añadió 0,5 Hz de apodización antes de la transformada de Fourier, se les corrigió manualmente la fase de orden cero y uno y se ajustó la línea de base. Se referenciaron a Creatina (N-CH₃, a 3,03 ppm).

En este caso la región de interés del espectro comprendía el rango de 4,5 a 0,5 ppm y según las condiciones de adquisición descritas en el apartado 4.3.10 equivalía a 13113 puntos digitales. También se exportaron como ficheros ASCII para su análisis posterior.

4.3.11.3. Normalización de los espectros

Para trabajar con intensidades relativas de las resonancias de metabolitos, una de las fórmulas que permiten una normalización más reproducible es la *unit length* (UL2), también conocida como norma Euclidiana. Esta normalización se basa en

calcular el porcentaje que la intensidad de cada punto digital del vector espectral representa con respecto a la suma total de dicho vector (Ecuación 14). Además, en el caso de la normalización UL2 se incorporan los valores absolutos de posibles picos negativos calculando la raíz cuadrada del sumatorio de cada una de las intensidades individuales elevada al cuadrado.

$$UL2 = \frac{h_{real}}{\sqrt{\sum_{0,5}^{4,5} (h_{real})^2}} \cdot 100$$

Ecuación 14 Ecuación de cálculo de las alturas normalizadas a UL2. Abreviaturas: UL2= Altura normalizada para cada punto del espectro y h_{real} = altura inicial antes de la normalizar, para cada punto digital del vector espectral entre 0,5 y 4,5 ppm.

La fórmula de la Ecuación 14 fue la utilizada para la normalización de los espectros *ex vivo* de HRMAS.

En cambio, para los espectros *in vivo* se llevó a cabo una ligera modificación de la fórmula de normalización UL2 que es la que se muestra en la (Ecuación 15) en que en el denominador se utilizó el vector suma adquirido en hemisferio contralateral (como control) para el resto de vóxeles del mismo animal investigado (UL2_c).

$$UL2_c = \frac{h_{real}}{\sqrt{\sum_0^{4,5} (h_{real}^{contralateral})^2}} \cdot 100$$

Ecuación 15 Ecuación de cálculo de las alturas normalizadas a UL2_c. Donde la UL2_c= altura normalizada para cada punto del espectro según el hemisferio contralateral y h_{real} = altura inicial antes de normalizar para cada punto digital del vector espectral entre 0,5 y 4,5 ppm.

El motivo de esta modificación fue que en la región del infarto el aumento importante de algunas de las resonancias puede producir disminuciones relativas aparentes del resto de resonancias investigadas que no serían reales. En el caso de los espectros *in vivo* estos cambios son muy notables y de este modo se minimiza el efecto que el aumento del lactato a 1,30 y resonancias lipídicas a 1,28 ppm y 0,9 ppm pudieran tener en el resto del espectro.

En cambio en los espectros de HRMAS no se consideró oportuno aplicar la normalización UL2_{contra} por 2 motivos:

- Los cambios en el lactato y los LM debidos al infarto no suponen un aumento de intensidades muy notable ya que debido a las características propias de la técnica HRMAS que moviliza los lípidos, estos se encuentran altos de por sí y el aumento lipídico aparente debido al infarto no es tan notable como en el caso de los espectros *in vivo*.

- La obtención de biopsias para el estudio *ex vivo* implica más variabilidad experimental al análisis que la colocación del *vóxel in vivo*. Por ejemplo, distintos tamaños de muestra, etc. Con lo cual si se utilizara como denominador el espectro de otra muestra se podría estar incurriendo en un error más grave que aplicando en este caso la normalización UL2 simple.

4.3.11.4. Cálculo de las intensidades y cocientes de intensidades de las resonancias de interés

Los valores de las intensidades relativas del máximo de la resonancia correspondiente a cada metabolito de interés normalizadas según la metodología descrita en el apartado 4.3.11.3 se expresaron en forma de promedio \pm desviación estándar (SD).

Los cocientes para determinar las variaciones de la concentración aparente (intensidad máxima) de los metabolitos de interés entre distintas zonas o puntos temporales se expresan de distinta manera:

- A las variaciones entre zonas se denomina “valor de cambio”(VC) y se calcula el cociente para cada animal individualmente y a partir de estos se expresa el promedio \pm SD.

- A las variaciones entre puntos temporales del protocolo de infarto se denominan “valor de cambio temporal” (VCT) y el cociente se calcula a partir de los promedios de las Intensidades normalizadas. El resultado se expresa como promedio.

4.3.11.5. Cálculo de las áreas y cocientes de áreas de las resonancias de interés

La evaluación cuantitativa de metabolitos utilizando áreas solo se utilizó para el cálculo del cociente PCr/Cr en HRMAS ya que son singuletes bien definidos. El cálculo de áreas implica la integración del área de la resonancia entre unos límites definidos, 3,96-3,94 ppm para PCr y 3,94-3,92 para Cr en nuestro caso. Para ello se utilizó el programa Topspin 1.3.(Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania).

4.3.11.6. Representación gráfica de los espectros promedio

Los espectros que se mostrarán en el capítulo de resultados están representados como espectros promedio de los espectros normalizados del grupo de animales investigados. Tal y como se comentó en el apartado 4.3.11.3 la normalización aplicada fue de UL2_c en los espectros *in vivo* y UL2 en los espectros *ex vivo*.

Los espectros promedio se muestran incorporando con sombreado la SD (en el caso de los espectros *in vivo*) o sin la SD (en el caso de los espectros HRMAS). El motivo de no representar la SD en los espectros de HRMAS no es otro que al haber más señales de metabolitos la representación con SD dificulta su observación.

Para este tipo de representación de los espectros se utiliza *software* R (versión 2.10) (www.r-project.org) utilizando módulos desarrollados para tal fin en el GABRMN.

4.3.12. Inmunohistoquímica

Los cerebros previamente fijados mediante la técnica de perfusión transcardíaca se destinaron a la realización de análisis inmunohistoquímicos. Para ello se utilizaron cortes de tejido fresco. Se hicieron lavados de PB 0,1M; pH 7,4 para limpiar los restos de PB +azida sódica 0,05% (p/v), pH 7,4 donde se mantenía el cerebro (ver apartado 4.3.8.1) y se procedió a realizar cortes coronales de 20 μm de grosor en la región de la zona media/central de la ZSV utilizando el vibrátomo (VT-1000S, Leica).

4.3.12.1. Tinción con anticuerpo contra Ki67

El marcador Ki67 es una proteína nuclear que es expresada en las células en proliferación durante todo el proceso mitótico (Kee et al. 2002) con lo cual marca todas las células que están en las fases de división del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) mientras que no marca células en fase de reposo (G0) (Scholzen and Gerdes 2000), con lo cual es un buen marcador de las CPNs en proliferación.

Para la tinción con Ki67 se calentaron los cortes con tampón citrato 0,1 M-Tween 20 0,05% (p/v), pH 6 a 90°C durante 20 minutos. Seguidamente y una vez enfriados, se hicieron 3 lavados más de PB 0,1M. Se llevó a cabo un bloqueo de las peroxidasas endógenas utilizando una solución de 10% metanol y 3% peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en PB 0,1M durante 15 minutos. Se retiró la solución mediante lavados con solución tampón fosfato salino (PBS) – 0,1% Tritón - 0,1% albúmina (BSA) y se incubó el tejido en la solución de bloqueo (PBS-0,2% Tritón - 10% BSA) durante 1 hora. La incubación con el anticuerpo contra Ki67 de ratón (Novocastra, Reino Unido) se llevó a cabo a una dilución 1/100 durante toda la noche a 4°C en tampón de bloqueo. Se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario que era un anticuerpo biotinilado de cabra anti ratón IgG (Vector Laboratories, Burlingame, California). Se retiró la solución anterior mediante lavados con PBS y se incubó en solución avidina-biotina-peroxidasa (ABC Vectastain Elite Reagent, Vector Laboratories) a una dilución 1/400 en solución de bloqueo durante 1 hora en oscuridad. Se lavó el reactivo anterior con PBS. Los resultados fueron visualizados

utilizando 0,03% diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories) con 0,01% de H₂O₂ en PBS durante 10 minutos. Finalmente se lavó la solución anterior con PB 0,1M y se montaron los portaobjetos con los cortes para observación por microscopía.

Se realizó la cuantificación de las células marcadas positivamente en 2 regiones: ZSV ipsilateral y ZSV contralateral. La observación de las células marcadas se hizo en un microscopio Leica contando 6 réplicas en cada caso.

Los recuentos de células se mostrarán en el capítulo de resultados expresados en células Ki67+/mm².

4.3.12.2. Tinción con TUNEL

La detección de la apoptosis se realizó utilizando la técnica *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)* (kit comercial *Apoptag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit*, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) que permite detectar las células apoptóticas basándose en la fragmentación clásica que se produce en el ADN en este tipo de muerte. Mediante esta técnica se detecta los extremos 3'-OH libres de los fragmentos de ADN a los cuales añade nucleótidos marcados con digoxigenina (dUTP) mediante la enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT), y por lo tanto se considera una medida indirecta de la apoptosis.

El protocolo de tinción se llevó a cabo siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante del *kit*. De forma breve, los cortes se hidrataron en 3% H₂O₂ a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se incubaron con la enzima proteolítica proteinasa K (1:200) en tampón PBS a 37°C durante 10 minutos para facilitar el acceso TdT a los extremos 3'-OH libres. Seguidamente se lavaron y se añadió la mezcla suministrada por el kit de TdT digoxigenina y nucleótidos d-UTP. Se incubaron a 37°C durante 2 horas. Los cortes fueron bloqueados a temperatura ambiente durante 30 minutos y finalmente se incubaron con el anticuerpo biotinilado (anti-digoxina) a una concentración de 1/200 en tampón de bloqueo a 37°C durante 30 minutos en oscuridad.

Para poder visualizar los resultados se utilizó 0,03% diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories) con 0,01% de H₂O₂ durante 10 minutos. Seguidamente se lavó la solución anterior con PB 0,1M y se montaron los portaobjetos para microscopía.

Se hizo la cuantificación de las células marcadas positivamente en 4 regiones: Zonas subventriculares (ipsilateral, contralateral) y zonas territorio ACM (infarto, hemisferio contralateral). La cuantificación de las células marcadas se hizo en un microscopio Leica contando 6 réplicas en cada caso.

Los recuentos de células se mostrarán en el capítulo de resultados expresados en células TUNEL+/mm².

Todos los protocolos de inmunohistoquímica fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Neurobiología Comparada del Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva de Valencia (IP: Jose Manuel García Verdugo) por la Dra. Sara Gil Perotín, colaboradora en el proyecto de investigación en el que se enmarcó la Tesis.

4.3.13. Técnicas de reconocimiento de patrones

En esta tesis se desarrollaron un total de 4 clasificadores supervisados. Los objetivos de la clasificación fueron establecer parámetros en base a la evolución del infarto a lo largo del tiempo (en un clasificador) y la clasificación diferencial de las ZSVs respecto a otras zonas del cerebro (tejido sano y tejido infartado) en los otros tres clasificadores. Con respecto al reconocimiento de patrones no supervisado se incluyó únicamente un caso como prueba de concepto de una metodología con interesantes perspectivas de futuro.

4.3.13.1. Reconocimiento de patrones supervisado

El *software* utilizado para llevar a cabo las clasificaciones fue SpectraClassifier v.3.0.09 (SC) (<http://gabrmn.uab.es/sc>) siguiendo la metodología descrita por sus autores (Ortega-Martorell et al. 2010)

Para ello se utilizaron los espectros adquiridos mediante ERM *in vivo* y normalizados según la fórmula $UL2_c$. Una vez introducidos los casos en SC se asignaron a la clase que les correspondía. Posteriormente fueron divididos en 2 grupos: entrenamiento (para generar las ecuaciones de clasificación) y test independiente (para evaluar la reproducibilidad de la clasificación desarrollada). Aproximadamente 1/3 del total de los casos del grupo eran los que se asignaban al grupo de test y los restantes 2/3 al grupo de entrenamiento (Tate et al. 2006).

Para cada clasificador el sistema seleccionó las características diferenciales (frecuencias espectrales). El número de características para ser usado en el clasificador para evitar el sobreentrenamiento fue como máximo $n/3$, donde n es el número de casos de la clase más pequeña que se usa en la comparación (Tate et al. 1998). La selección de características se llevó a cabo con el método *Sequential Forward Feature Selection (SFFS)*.

Las variables seleccionadas se utilizaron para generar clasificadores. SC utiliza el Análisis Lineal discriminante (LDA) de Fisher, creando un espacio latente bidimensional (en el caso de un clasificador de tres clases), definido por la proyección de las variables canónicas derivadas del LDA.

Cada clasificador fue evaluado en sus características descriptivas utilizando para el grupo de entrenamiento el método de *Bootstrapping* con 1000 repeticiones en el cual se realiza un muestreo aleatorio con reemplazo de un caso en cada repetición para la determinación de los casos correctamente clasificados (CCC). También fue evaluado en sus características predictivas utilizando el *Balanced Error Rate (BER)* (Ecuación 16) para el grupo de test independiente, que pondera los casos mal clasificados según el tamaño de cada clase considerada.

$$BER = \frac{1}{3} \left(\left(\frac{\text{malclasificados tipo 1}}{\text{total casos tipo 1}} \right) + \left(\frac{\text{malclasificados tipo 2}}{\text{total casos tipo 2}} \right) + \left(\frac{\text{malclasificados tipo 3}}{\text{Total casos tipo 3}} \right) \right)$$

Ecuación 16: Cálculo del BER para un conjunto de 3 grupos de datos. n= número de clases del clasificador.

4.3.13.2. Reconocimiento de patrones no supervisado

Para el análisis no supervisado se utilizaron espectros multivóxel (condiciones de adquisición en el apartado 4.3.7), que fueron post-procesados según se describe en (Simoes et al. 2010) de modo que de un mismo animal se pudieron obtener 144 espectros normalizados a UL2 simultáneamente, correspondientes a distintas áreas del cerebro que incluían zona de infarto, tejido sano y zonas subventriculares.

El sistema empleado para el RP no supervisado fue desarrollado por Ortega-Martorell y colaboradores (Ortega-Martorell et al. 2012a; Ortega-Martorell et al. 2012b) basado en la Factorización No Negativa de Matrices (del inglés, *Non-negative Matrix Factorization*). Este sistema permite la extracción de fuentes dentro de un conjunto de espectros. El número de fuentes analizadas fue de 2 a 5.

El sistema representa un mapa nosológico mediante un sistema de colores (De Edelenyi et al. 2000), hecho que permite determinar la distribución espacial de la fuente en el tejido analizado .

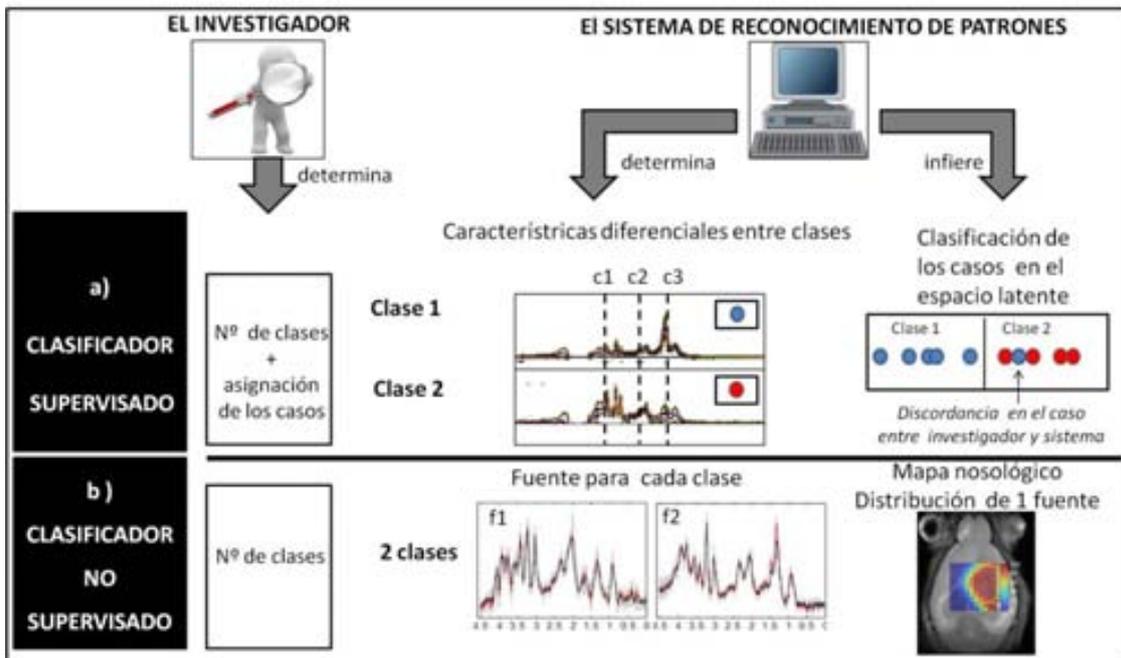


Figura 56: Esquema representativo de los dos tipos de clasificadores con los programas utilizados para su realización. **a)** Representación del clasificador supervisado utilizando el *software* SCv.3.0.09. donde se muestra que el investigador determina el número de clases (en este caso 2) y a qué clase se asigna cada caso. Con esta información el sistema extrae las características relevantes de cada grupo y realiza una clasificación que se visualiza como una proyección de las variables canónicas derivadas del LDA (bolas azules y bolas rojas) con los límites de cada clase representados como líneas divisorias. c1, c2, c3 indica las características seleccionadas **b)** Representación del clasificador no supervisado utilizando *software* basado en la Factorización No Negativa de Matrices donde se muestra que el investigador únicamente determina el número de clases y es el sistema el que asigna un patrón asociado a cada clase (fuente). En el caso de análisis de espectros multivóxel la distribución de la fuente se puede visualizar como imagen nosológica. En este ejemplo se muestra para un caso de tumor cerebral en ratón la imagen nosológica de la distribución de la fuente 2 (f2). Imágenes modificadas de (Ortega-Martorell et al. 2010) y (Ortega-Martorell et al. 2012a)

4.4. Estadística

Todos los análisis estadísticos fueron desarrollados con el programa estadístico SPSS versión 15 (IBM, SPSS Inc., Chicago).

En el análisis estadístico se determinó la normalidad de la distribución de los datos utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Seguidamente para la comparación de los promedios de las intensidades relativas de metabolitos se utilizó el test t-Student para el análisis de 2 grupos o el análisis de la varianza (ANOVA) en caso de analizar más de 2 grupos simultáneamente con el Bonferroni post-hoc test. El nivel de significación estadística se estableció en un nivel del 95% de confianza ($p < 0,05$) y también se determinaron las tendencias a la significación que se establecieron ($0,05 < p < 0,10$).

Para los estudios de análisis del mismo animal entre el control de referencia a 1 día y el correspondiente estudio de ERM en el punto final se utilizó el test t-Student para datos pareados.

Para la determinación de las correlaciones entre metabolitos y datos de inmunohistoquímica se utilizó la correlación bivariada de Pearson.

Para descartar valores atípicos (*outliers*) en las distribuciones de datos se utilizó el Test de Grubb que permite determinar los valores *outliers* extremos para un determinado tamaño muestral basándose en el cálculo de la puntuación de Z que indica la dirección y grado en que un valor individual obtenido se aleja del promedio, en una escala de unidades de desviación estándar y se calcula como se describe en la Ecuación 17. Cada tamaño muestral tiene una puntuación de Z crítica partir del cual el valor se considera un *outlier* estadísticamente significativo y se puede considerar su descarte.

$$z = \frac{x - \bar{x}}{SD}$$

Ecuación 17: Cálculo de la puntuación de z donde x= valor de un dato, \bar{x} = promedio del conjunto de datos y SD= desviación estándar del conjunto de datos.

El test se realizó utilizando una aplicación que está disponible online en la dirección: <http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>

4.5. Diseño experimental

Para determinar el diseño experimental se realizó una búsqueda bibliográfica de los perfiles temporales de proliferación de las CPNs en la ZSV post-isquemia así como de los modelos animales más utilizados en su estudio (Tabla 3):

	Referencia	Modelo animal	Máximo de proliferación	Magnitud del aumento	Marcaje	Comentarios sobre proliferación
1	(Jin et al. 2001)	Rata tMCAO 90 min	14 días	2 veces a los 7 días 4 veces a los 14 días (respecto a controles)	BrdU 50mg/kg 2 dosis/día 2 días anteriores al sacrificio	Proliferación bilateral simétrica
2	(Zhang et al. 2001)	Rata MCAO embólico	7 días	1,5 ZSVi 7días/ZSVi control	BrdU 50mg/kg 4 dosis cada 3 horas el día anterior al sacrificio	
3	(Arvidsson et al. 2002)	Rata MCAO 120 min	14 días	2 veces	BrdU 2 dosis/día 14 días	
4	(Parent et al. 2002)	Rata tMCAO 90 min	14 días	2 veces	BrdU 50mg/kg 2 dosis /día Días 7 y 9 post-infarto	
5	(Zhang et al. 2004a)	Rata MCAO embólico	7 días	2 veces (7d/pre-isquemia)	BrdU 50mg/kg 3 dosis cada 2 horas antes del sacrificio	Inicio 2 días, niveles altos hasta 14 días
6	(Zhang et al. 2004b)	Rata MCAO embólico	4 y 7 días	2 veces (7 días/ pre-isquemia)	histona H3 fosforilada (marcador de fase G2)	
7	(Kokaia et al. 2006)	Rata tMCAO 120 min	14 días	4 veces	BrdU 50mg/kg 3 dosis cada 3 horas antes del sacrificio	
8	(Zhang et al. 2008a)	"review"	7 días	1,30 (7días/2días)	BrdU % de células de la ZSV en división	A los 14 días vuelve a disminuir

Tabla 3: Tabla resumen de las referencias consultadas sobre estudios realizados en modelos de isquemia cerebral en rata y los datos de proliferación post-infarto. Los cambios están expresados en cocientes ZSVi/ZSVc, a no ser que se detalle de otra manera. En los casos en que este cociente no estaba expresado específicamente en el trabajo, fue calculado a partir de los datos promedio mostrados en él.

Se decidió analizar la región de la ZSV (y no del giro dentado del hipocampo como en (Manganas et al. 2007) ya que es el mayor reservorio de CPNs del cerebro y son las que migran en caso de infarto (Yamashita et al. 2006). En la búsqueda bibliográfica no se incluyeron animales que no fueran roedores ni datos sobre neurogénesis post-isquemia en el hipocampo. La búsqueda solo incluyó datos hasta 2009, momento en que se definió el procedimiento experimental para esta Tesis.

Los resultados analizados muestran diferencias pero, en general, se determina que el máximo de proliferación está entre los 7 y los 14 días post-infarto. Para el procedimiento experimental de esta Tesis se decidió analizar los animales a los 7 días.

Se decidió utilizar tamaños de infarto grande (oclusión de la ACM durante 90 minutos) ya que el número de CPNs en proliferación en la ZSV se correlaciona positivamente con el tamaño de infarto (Kokaia et al. 2006).

4.5.1. Diseño experimental ERM *in vivo* con correlación inmunohistoquímica

En el estudio de ERM con correlación inmunohistoquímica se llevó a cabo un seguimiento de los animales a 1 día post-isquemia y alrededor del día correspondiente al máximo esperado de proliferación (7 días) (resumido en la Figura 56).

Todos los animales analizados a 6, 7 y 8 días tenían una exploración por resonancia a 1 día post isquemia que era utilizada como control interno para determinar la evolución de cada animal. También se incluyó un grupo control con ratas no isquémicas (n=3 en cada punto experimental).

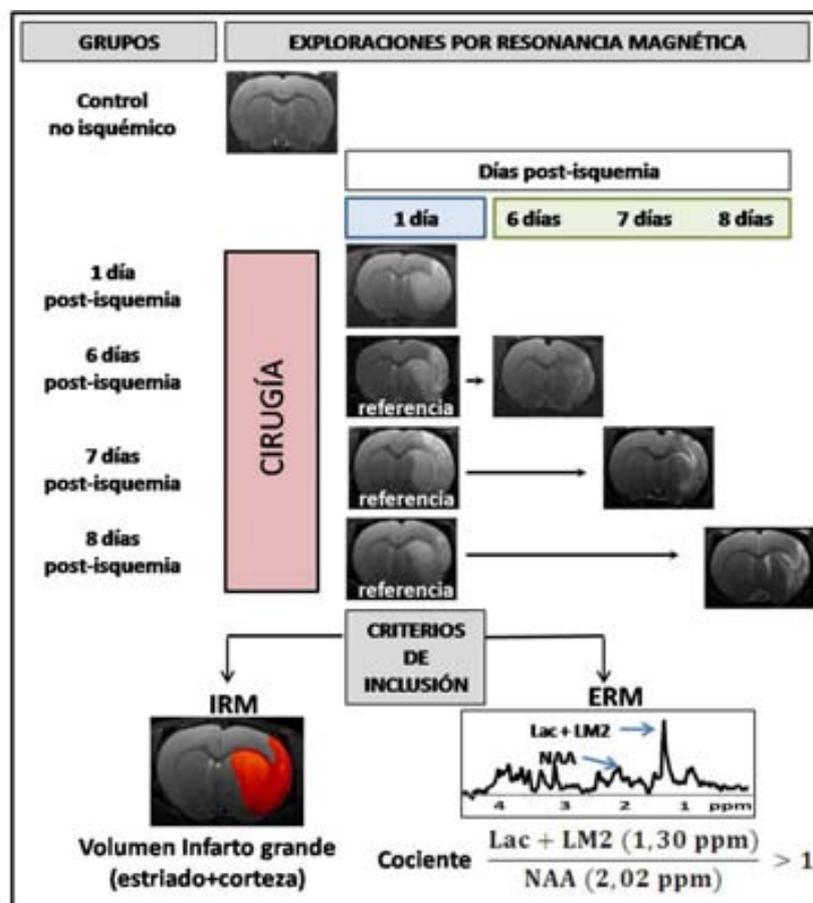
A 1 día post-isquemia se valoraba el tamaño de infarto y el patrón espectroscópico para determinar que todos los animales incluidos en el estudio fueran similares.

Los criterios de inclusión fueron:

a) Imagen (MRI): animales cuya imagen ponderada en T₂ a 1 día post-isquemia presenten una lesión hiperintensa que incluya zona estriado+ corteza.

b) Espectroscopía (ERM): animales que en el espectro de la zona de infarto a 1 día post-isquemia el Lactato+LM2 (1,30 ppm) sea superior en intensidad al NAA (2,02 ppm).

Estos criterios de inclusión se utilizaron para asegurar una estabilidad a nivel de volumen de infarto y de patrón espectroscópico entre los distintos grupos a 1 día post-isquemia intentando que no hubiera diferencias significativas entre ellos.



4.5.2. Diseño experimental correlación ERM *in vivo* y *ex vivo*

Un subgrupo de animales fue utilizado para análisis espectroscópico de biopsia post-sacrificio con FMW mediante HRMAS. Para este fin se destinaron controles no isquémicos, 1 día post-isquemia y 7 días post-isquemia como se esquematiza en la Figura 57. Para diferenciar el grupo sacrificado por FMW de los animales del estudio longitudinal, a los nombres de los grupos se les añadió la F (de FMW).

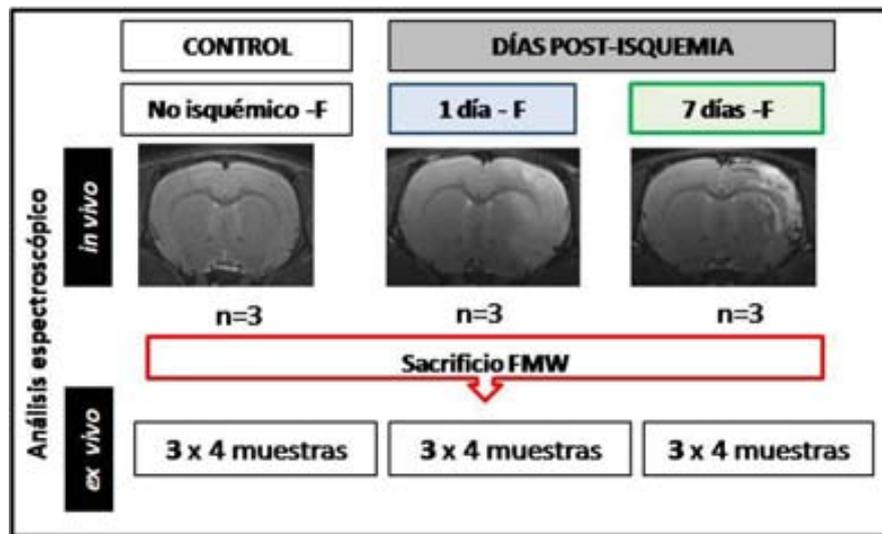


Figura 57: Diseño experimental del estudio de comparación del patrón metabólico *in vivo* y *ex vivo*. Los animales fueron sacrificados mediante la técnica de FMW. Las 4 muestras *ex vivo* corresponden a las 4 zonas de interés (ver Figura 55): Hemisferio contralateral, ZSV contralateral, ZSV ipsilateral e infarto

4.5.3. Listado de los animales utilizados en el protocolo experimental

El número de animales con un infarto adecuado para el protocolo experimental fue reducido, concretamente fueron un 15% del total como se puede apreciar en la Figura 58.

El principal punto limitante de la inclusión fue la generación del modelo experimental. La causa más frecuente de exclusión (en un 35% de los casos) fue que la cirugía realizada no mostraba signos de patología por imagen ponderada en T₂ de infarto a 1 día post-isquemia.

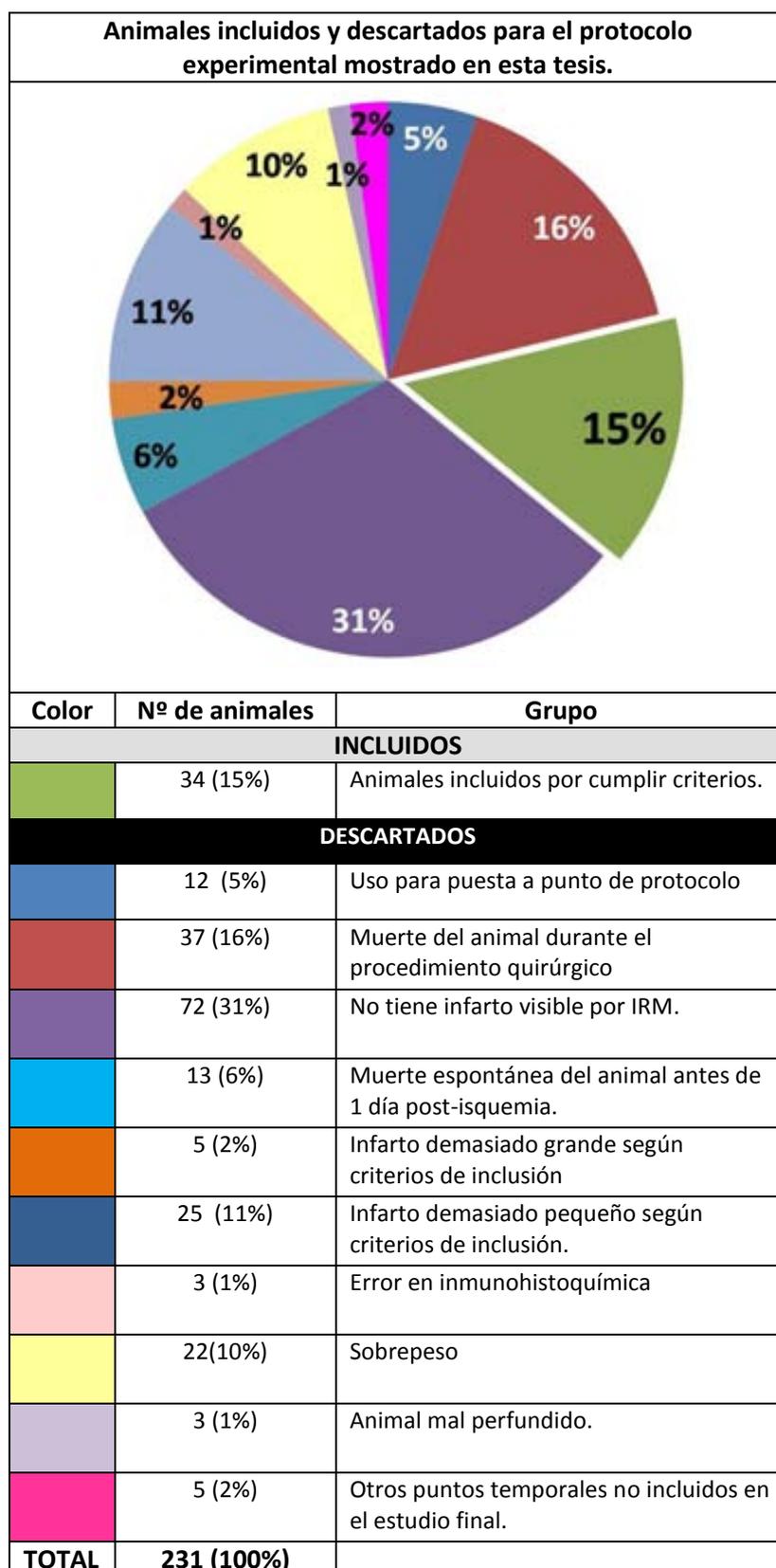


Figura 58: Gráfico donde se muestran los animales incluidos y excluidos en el protocolo experimental así como las causas de la exclusión. El número de animales se muestra en valor absoluto y entre paréntesis el porcentaje relativo de los animales estudiados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Análisis de la zona de infarto y contralateral

El infarto es un fenómeno que produce cambios fulminantes en el tejido cerebral. Estos cambios han sido más analizados en la literatura que los cambios en la ZSV. Por lo tanto, el análisis de la zona de infarto puede servir para la validación de las estrategias que en el apartado 5.2 se utilizarán para el análisis de las ZSVs. Por este motivo en este capítulo se analizarán las regiones del infarto con respecto al hemisferio contralateral.

Los puntos temporales de evolución del infarto que se analizarán son: control no isquémico, 1 día (etapa aguda), 6, 7 y 8 días post-isquemia (etapa subaguda/crónica).

5.1.1. Caracterización de los cambios morfológicos y metabólicos en la zona de infarto

5.1.1.1. Análisis de las imágenes ponderadas en T_2

La imagen por resonancia magnética ponderada en T_2 permite determinar el volumen del infarto que se observa como una hiperintensidad. Una de las principales ventajas de la resonancia magnética es el hecho de poder hacer estudios longitudinales en un mismo animal, y con ello medir la evolución en un mismo sujeto de estudio.

En las imágenes de la Figura 59a se muestra cómo la lesión tiene tendencia a disminuir su tamaño a lo largo del tiempo. En la Figura 59b y su correspondiente Tabla se puede observar que salvo en el grupo de 1 día post-isquemia, en que sólo hay una medida temporal, en los grupos de 6 a 8 días post-isquemia se observa una

disminución del volumen de infarto en el tiempo de aproximadamente un 20-30% respecto al volumen a 1 día, concretamente, hasta un promedio de $0,79 \pm 0,08$ ($p < 0,01$). En la Figura 59c se muestra también una importante reducción significativa del edema entre el punto intermedio a 1 día y el punto final, lo que claramente contribuye a la disminución del volumen de zona anómala observada.

Otro hecho importante a destacar es que no se observan diferencias significativas entre el volumen de infarto de los distintos grupos a 1 día post-isquemia.

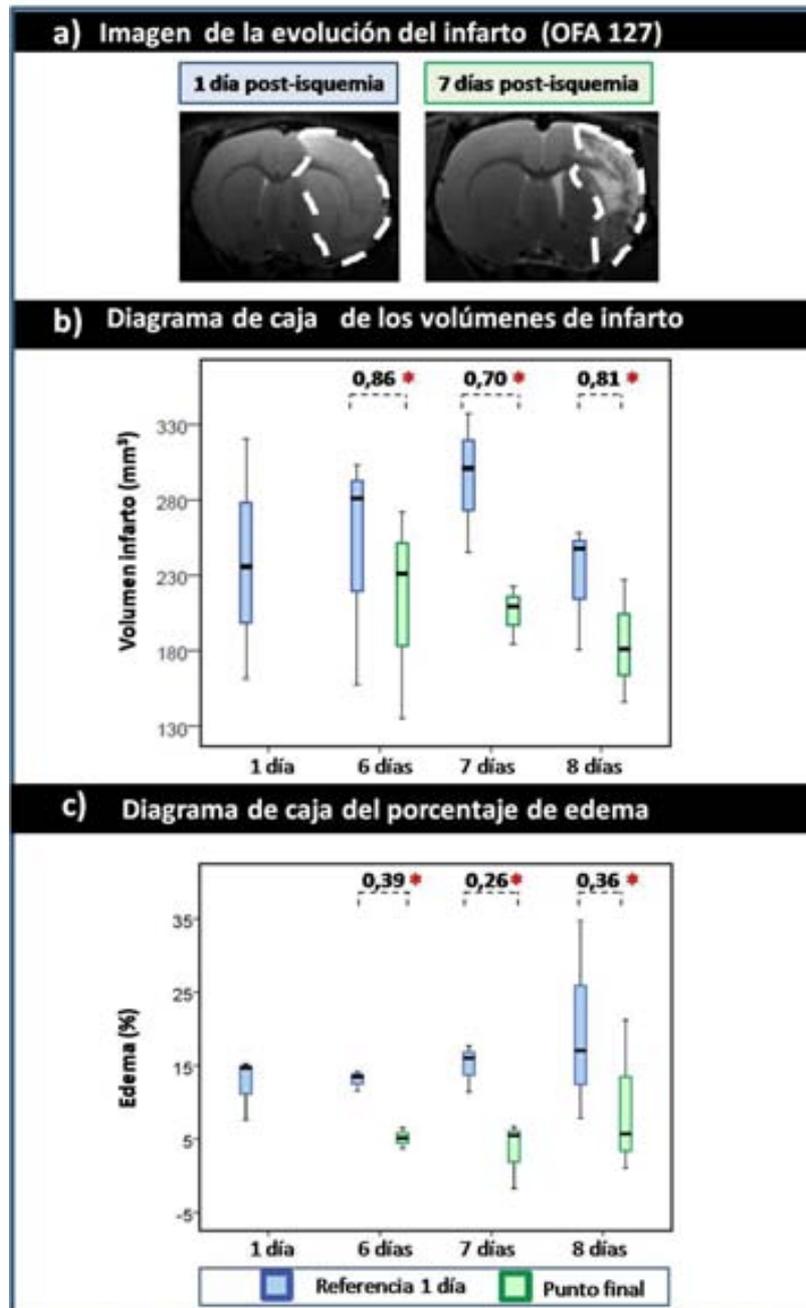


Figura 59: Análisis del infarto mediante IRM. **a)** Ejemplo de una imagen ponderada en T₂ donde se muestra el alcance del infarto en el modelo animal a 1 y 7 días. **b)** Diagrama de caja de los análisis de los volúmenes de infarto en los animales en el control en el punto intermedio (1 día) representado por las cajas azules y el punto final (6,7,8 días) representado por las cajas verdes para grupos de animales explorados sólo a día 1 (1 día) o a día 1 y 6 (6 días), 1 y 7 (7 días) y a 1 y 8 (8 días). **c)** Diagrama de caja de los porcentajes de edema de los mismos animales que en b). Los símbolos * indican cambio estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$). En los diagramas de caja el límite inferior y superior de la caja representa el cuartiles 1 y 3 de cada distribución de datos respectivamente y la franja central el cuartil 2 o mediana. Las barras horizontales inferior y superior muestran la posición del valor máximo y mínimo de la distribución.

Volumen del infarto (mm ³)				
GRUPO	PUNTO INTERMEDIO 1 día (Promedio ± SD)	PUNTO FINAL 6,7,8 días (Promedio ± SD)	Cociente punto final-punto intermedio 1 día (Promedio ± SD)	Significación (p < 0,05)
1 día	239 ± 80 #	----	-----	-----
6 días	247 ± 78	213 ± 70	0,86 ± 0,04	0,03*
7 días	294 ± 46	205 ± 19	0,70 ± 0,05	0,01*
8 días	249 ± 42	183 ± 41	0,81 ± 0,07	0,03*
PROMEDIO	258 ± 58	201 ± 44	0,79 ± 0,08	<0,01*

Tabla 4: Tabla de los volúmenes de infarto y cálculos de valores de cambio (VC) entre punto intermedio a 1 día y punto final para cada grupo experimental. Los animales sacrificados a 1 día post-isquemia solo tienen un valor ya que no se realizó un seguimiento longitudinal, fue una única exploración por resonancia antes del sacrificio. En la última fila, se muestran los resultados promedio. El símbolo # indica que en este grupo solo hay un punto temporal (ya que fueron sacrificados a 1 día post isquemia. El símbolo * indica cambio estadísticamente significativo (p<0,05). Test estadístico aplicado T de Student pareado.

Para determinar si los volúmenes de infarto eran similares a los descritos en la literatura para este modelo animal y tiempo de oclusión se realizó una búsqueda bibliográfica en la que seleccionaron los artículos que cumplían: 1) mismo modelo animal que el utilizado en el estudio (rata) y mismo tiempo de oclusión transitoria (90 minutos) , 2) medición del volumen de infarto mediante imagen ponderada en T₂, 3) Datos de volúmenes expresados en mm³, 4) Medición del volumen de infarto a 1-2 días post-isquemia. Solo se incluyeron datos a 1 día ya que a 6,7 y 8 días no se encontró prácticamente bibliografía que cumpliera estos requisitos.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en la búsqueda bibliográfica en los cuales el promedio es de 279 ± 114 mm³ con lo cual el volumen de infarto obtenido en nuestros animales a 1 día post isquemia que es de 258 ± 58 mm³ no presenta diferencias significativas con lo cual el modelo sería válido.

	Referencia	Volumen de infarto (mm ³) Promedio ± SEM	Medición por IRM	Modelo de rata	PROMEDIO BIBLIOGRAFÍA Promedio ± SD
1	(Schmerbach et al. 2008)	401,6 ± 29,2	2 días	No especificado	279 ± 114
2	(Lenmyr et al. 2003)	126 ± 75	1 día	Sprague Dawley	
3	(Lenmyr et al. 2004)	282±106	1 día	Sprague Dawley	
4	(Dittmar et al. 2003)	305 ±25	1 día	Wistar	

Tabla 5: Tabla de los volúmenes de infarto obtenidos de la bibliografía. El valor expresado en la columna de promedio de la bibliografía está calculado a partir de los valores promedio de la segunda columna (sin tener en cuenta SEM). Abreviaturas: SEM= error estándar de la media, SD= desviación estándar.

5.1.1.2. Análisis del patrón metabólico por ERM *in vivo*

Una vez determinado un tamaño de infarto similar a 1 día post-isquemia, también se determinó que el espectro promedio de la zona de infarto en la referencia a 1 día no tuviera diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales.

Para ello se analizaron las intensidades relativas promedio de los principales metabolitos del espectro (que son aquellas para las que las resonancias aparecen indicadas en los espectros de la Figura 60a) en la referencia a 1 día post-isquemia para determinar que los distintos grupos experimentales fueran comparables entre sí. Como se puede observar en el gráfico de Figura 60b) únicamente se determinó que en la resonancia de Lac+LM2 (1,30 ppm) en el Grupo de 6 días había un ligero aumento en sus valores de día 1 de 1,21 veces ($p=0,07$) con respecto al Grupo de 1 día con tendencia a la significación. Con lo cual, de forma general, se puede considerar que el patrón en el punto de referencia a 1 día era estable en todos los animales que fueron incluidos en el estudio.

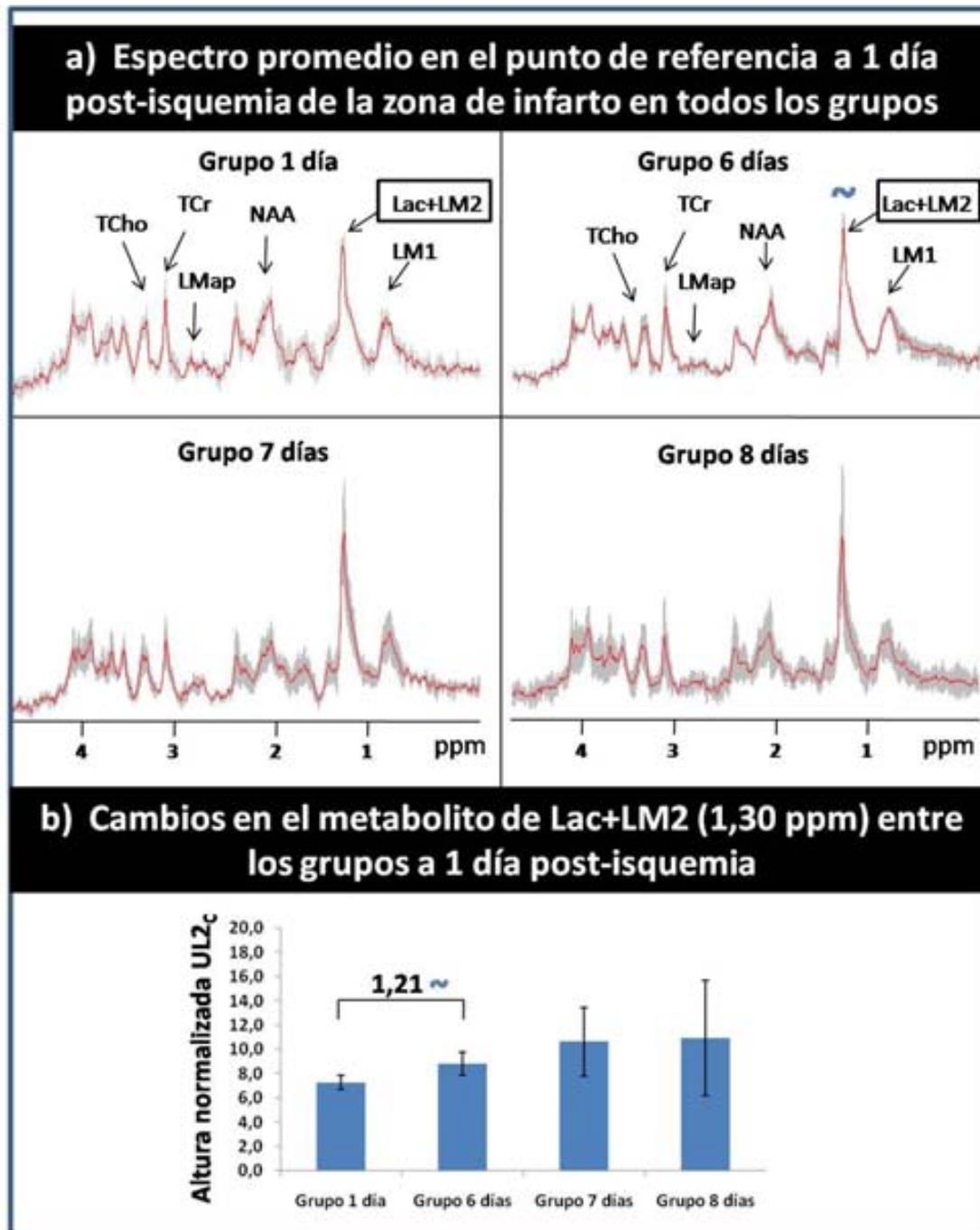


Figura 60: Análisis de la estabilidad del patrón metabólico de ERM *in vivo* a 1 día post-isquemia. **a)** Espectros promedio \pm SD en gris de los grupos de 1,6,7,8 días en el punto intermedio de 1 día post-isquemia. **b)** Gráfica comparativa de la altura normalizada (UL2c) del metabolito de Lac+LM2 (1,30 ppm) entre los distintos grupos donde se aprecia el cociente del cambio entre el grupo de 1 y 6 días. Ver Tabla 2

Tabla 2 (pág.59) para las asignaciones de las principales resonancias. El símbolo (~) indica tendencia a la significación ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado: ANOVA.

Una vez determinado que a 1 día post-isquemia los volúmenes de infarto y los espectros en la zona de infarto eran similares, con lo cual cumplía los criterios de inclusión, se procedió a analizar las variaciones entre los distintos grupos a 1,6,7,8 días post-isquemia.

5.1.1.3. Análisis de la variación metabólica debida al infarto en los distintos grupos *in vivo*

La disposición de los volúmenes de interés fueron en la zona de infarto y de forma homóloga en el hemisferio contralateral tal y como se muestra en la Figura 61, estas zonas serán definidas de forma general como zona de la arteria cerebral media (ACM).

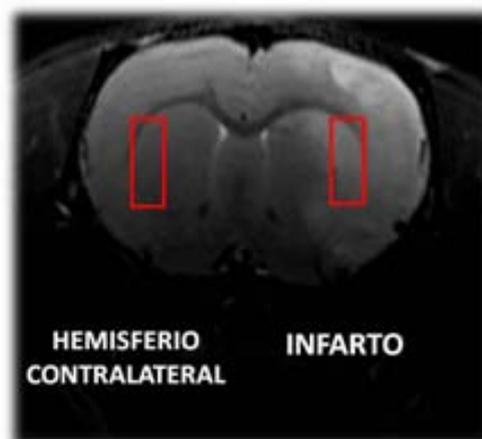


Figura 61: Esquema de colocación de los vóxeles 4,5 x 2 x 2 mm sobre la imagen RM ponderada en T₂ para la realización de estudios ERM *in vivo* para determinar los cambios en el territorio de la ACM.

Con los animales seleccionados para el estudio se procedió a determinar cuáles eran los cambios metabólicos detectables por ERM debidos al infarto.

En el caso de la lesión por infarto se determinaron los cambios para cada grupo determinando el valor de cambio entre la zona de infarto respecto al hemisferio contralateral.

En los espectros en la Figura 62, en las gráficas de la Figura 63 o en los valores de cambio de la Tabla 6 se observan cambios significativos en todos los metabolitos analizados normalizados mediante $UL2_{\text{contra}}$. De forma general los metabolitos que disminuyen con el infarto son colina total (TCho; 3,21 ppm), creatina total (TCr; 3,03 ppm) y N-acetilaspártato (NAA; 2,02 ppm) mientras que los metabolitos en los que se produce un aumento son en los lípidos móviles apoptóticos (LMap; 2,80 ppm), Lactato con lípidos móviles 2 (Lac+LM2; 1,30 ppm) y lípidos móviles 1 (LM1; 0,90 ppm).

Seguidamente se analizarán los resultados para cada resonancia con más detalle:

Colina total (TCho, 3,21 ppm): Para esta resonancia cabe destacar que, de forma contraria a lo esperado, en el caso de los animales control no isquémicos existen diferencias significativas entre ambos hemisferios (hecho que no se da para ningún otro metabolito), concretamente, un cambio de 1,28 veces ($p=0,05$). A pesar de esta mayor variabilidad, que puede ser debida a que la posición de los vóxeles no era simétricamente perfecta y podía incluir alguna región distinta, en presencia de infarto la situación es la opuesta y la TCho disminuye de forma generalizada. Esta disminución es más pronunciada en el caso de 1 y 6 días post-infarto, con una disminución a la mitad ($p=0,01$) y a los 7 y 8 días que se modera es alrededor de un 0,70 veces la inicial siendo significativa la disminución ($p=0,01$) en el grupo de 8 días. A los 7 días, los cambios no son significativos ya que existe una mayor variabilidad en la TCho de la zona infartada.

Creatina total (TCr; 3,03 ppm): Esta resonancia disminuye de forma claramente significativa ($p\leq 0,01$) en todos los grupos en la zona de infarto. En el caso de 1 día post-isquemia el cambio es a la mitad y en los grupos de 6, 7 y 8 días incluso hay más disminución respecto al hemisferio contralateral aproximadamente, a una tercera parte. En este caso, en el control no isquémico, no existen diferencias significativas entre ambos hemisferios.

Lípidos móviles apoptóticos (LMap; 2,80 ppm): Esta resonancia, aparece como una señal prominente en los espectros de la zona de infarto a 6, 7 y 8 días (Figura 62)

aunque a 1 día ya se observan cambios en esa zona del espectro aunque no son significativos Tabla 6.

Al hacer el análisis por intensidades de todos los metabolitos este es el que presenta mayores cambios porcentuales. Concretamente un promedio de 3,84 veces a los 6 días, 6,65 veces a los 7 días y 8,50 veces a los 8 días. De todos modos, aunque sea el menor cambio porcentual, únicamente es significativo en el grupo de 6 días post-isquemia ($p=0,01$), ya que en el grupo de 7 y 8 días la variabilidad de los valores de intensidades en la zona de infarto es elevada con lo que el cambio entre la zona de infarto y contralateral, aunque sea evidente (Figura 63) no llega a la significación estadística.

N-acetilaspártato (NAA; 2,02 ppm): Igual que en el caso de la TCr, el NAA disminuye de forma significativa en todos los grupos, sin excepción ($p\leq 0,01$). En el grupo de 1, 6 y 7 días post-isquemia la reducción se mantiene constante, llegando al 0,40, mientras que en el grupo de 8 días post-isquemia parece que la reducción sea menor y es de aproximadamente la mitad, concretamente 0,55 ($p=0,01$).

Lactato + Lípidos móviles 2 (Lac+LM2; 1,30 ppm): Esta resonancia, en la literatura está asociada que clásicamente al lactato únicamente, corresponde a la superposición de 2 resonancias provenientes de lactato y lípidos móviles, correspondiente en el caso de los lípidos a su grupo metileno. Aunque ambas señales estén próximas en el espectro, tienen significado biológico muy distinto. En el caso de la zona de infarto ésta es la resonancia con mayor intensidad de todo el espectro aunque el aumento que se observa en dicha resonancia no se puede atribuir exclusivamente a uno de los dos metabolitos sin un post-procesamiento adicional. Aun así, a excepción del grupo de 7 días que presenta mayor variabilidad (como en los casos de otros metabolitos) los cambios son notables desde 1 día post-isquemia, en que tiene un cambio del doble ($p<0,01$) con respecto al hemisferio contralateral, a 6 días en que hay un aumento de 4 veces ($p=0,02$) y a 7 y 8 días en que el cambio es de prácticamente 6 veces aunque únicamente es estadísticamente significativo a los 8 días post isquemia ($p=0,04$). Una manera de separar la contribución de ambas resonancias al patrón *in vivo* es utilizando tiempos de eco largo (TE=136 ms) (ver también resultados *ex vivo*, sección 5.1.1.5)

aunque la sensibilidad del espectro es muy inferior a la del espectro a TE corto (TE=12 ms).

Lípidos móviles 1 (0,90 ppm): Esta resonancia corresponde principalmente al metilo de ácidos grasos de lípidos móviles. Está relacionado por lo tanto con la señal de LM2 que se detecta a 1,30 ppm. En la señal de LM1 se observa cómo hay cambios significativos a partir de los 6 días post-isquemia siendo significativos a 6 y 8 días post-isquemia, en el caso de 6 y 7 días alrededor del doble, y en el caso de 8 días del cuádruplo ($p=0,05$). Con esta información se podría deducir que, aplicado al análisis de las resonancias de Lac + LM2, a 1 día, probablemente el aumento en las resonancia sería debida más a los LM2a 1,30 ppm que al lactato.

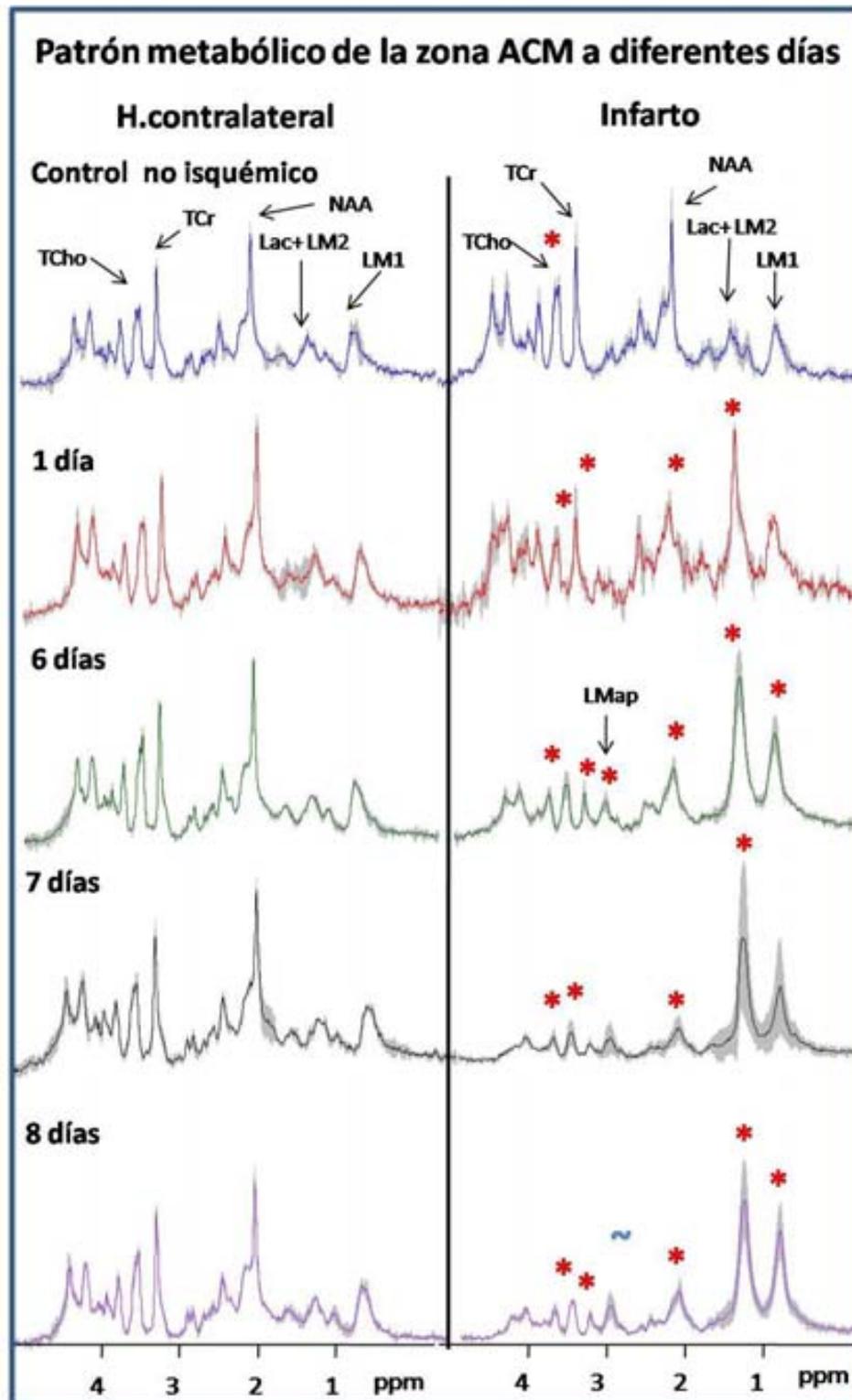


Figura 62: Espectros promedio \pm SD (sombreado en gris) de ERM *in vivo* de la zona de la arteria cerebral media (ACM) para cada grupo experimental normalizados a UL2c: control no isquémico (azul), 1 día (rojo), 6 días (verde), 7 días (negro) y 8 días (lila) post-isquemia. Cada espectro promedio corresponde a $n=3$. (ver

Tabla 2 para las asignaciones de las abreviaturas). Los cambios entre la zona de infarto y el H. contralateral se indican con el símbolo * si tienen significación estadística ($p \leq 0,05$) y con el símbolo ~ si tienen tendencia a la significación ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado: T de Student.

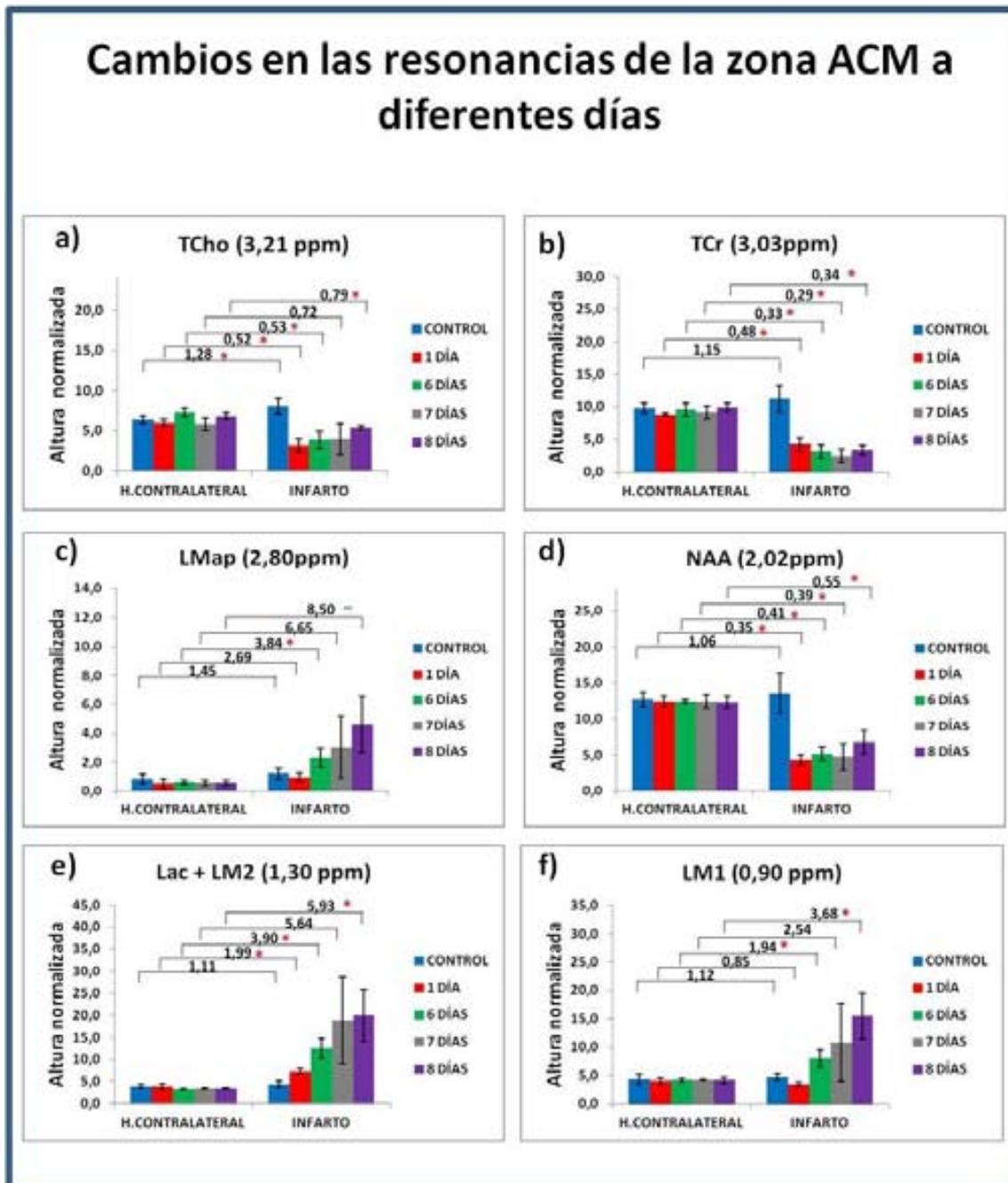


Figura 63: Gráficas promedio \pm SD de las alturas normalizadas a $UL2_c$ de las resonancias de ERM *in vivo* de la zona de la ACM para cada grupo experimental (control, 1 día, 6 días, 7 días y 8 días post-isquemia). Cada valor promedio corresponde a $n=3$. Sobre las barras horizontales se indican los valores de cambio (VC) entre el infarto y el H.contralateral. Los VC con significación estadística se indican con el símbolo * ($p \leq 0,05$) y si tienen tendencia a la significación con el símbolo ~ ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado: T de Student.

VC entre infarto y H.contralateral							
RESO.	GRUPO	VC	Sig.	RESO.	GRUPO	VC	Sig.
TCho (3,21 ppm)	Control	1,28 ±0,18	0,05	NAA (2,02 ppm)	Control	1,06 ± 0,14	0,63
	1 días	0,52 ±0,10	0,01 *		1 días	0,35 ±0,05	< 0,01 *
	6 días	0,53±0,14	0,01 *		6 días	0,41 ±0,08	< 0,01 *
	7 días	0,72 ±0,39	0,20		7 días	0,39 ±0,16	< 0,01 *
	8 días	0,79 ±0,06	0,01 *		8 días	0,55 ±0,12	0,01 *
TCr (3,03 ppm)	Control	1,15 ±0,18	0,33	Lac+ LM2 (1,30 ppm)	Control	1,11 ±0,19	0,51
	1 días	0,48 ±0,13	< 0,01 *		1 días	1,99 ±0,47	< 0,01 *
	6 días	0,33 ±0,11	0,01 *		6 días	3,90 ±0,70	0,02 *
	7 días	0,29 ±0,12	< 0,01 *		7 días	5,64 ±2,89	0,11
	8 días	0,34 ±0,08	< 0,01 *		8 días	5,93 ±1,64	0,04 *
LMap (2,80 ppm)	Control	1,45 ±0,39	0,30	LM1 (0,90 ppm)	Control	1,12 ±0,24	0,58
	1 días	2,69 ± 2,55	0,20		1 días	0,85 ±0,04	0,22
	6 días	3,84 ± 1,05	0,01 *		6 días	1,94 ±0,43	0,01 *
	7 días	6,65 ± 5,12	0,18		7 días	2,54 ±1,64	0,24
	8 días	8,50 ± 3,67	0,07 ~		8 días	3,68 ±0,48	0,05 *

Tabla 6: VC promedio ± SD entre infarto y H.contralateral obtenido a partir de las alturas normalizadas a UL2_c de las principales resonancias analizadas para cada grupo. Cada valor promedio corresponde a n=3. Los VC con significación estadística se indican con el símbolo * (p≤0,05) y si tienen tendencia a la significación con el símbolo ~ (0,05<p<0,10). Test estadístico aplicado: T de Student.

5.1.1.4. Análisis de la variación metabólica entre la referencia a 1 día post-isquemia y punto final

En el apartado anterior se han mostrado los cambios entre la zona de infarto comparada con el hemisferio contralateral, que corresponde a tejido sano, entre los cuales se observan diferencias en prácticamente todas las resonancias analizadas.

Sin embargo una de las principales ventajas de la resonancia magnética no invasiva es poder hacer un estudio longitudinal en un mismo sujeto. En nuestro caso todos los animales de los grupos en etapa subaguda/crónica (6-8 días) fueron analizados por ERM en un punto intermedio (a 1 día post-isquemia). Esto permite tener información sobre la evolución del infarto en el tiempo para un mismo sujeto y calcular los valores de cambio en cada animal (entre el día 1 post-isquemia y el día de punto final) (Tabla 7). En los espectros de la Figura 64 y los gráficos de la Figura 65 se muestran valores promedio para dar una idea de los principales cambios.

El principal interés de este análisis es determinar cuáles son los cambios detectables por RMN de la etapa subaguda/crónica que puedan ser potenciales biomarcadores metabólicos de la evolución del infarto una vez ya se han producido supuestamente los mayores cambios (etapa aguda inicial).

En los resultados de este análisis de valores de cambio entre el patrón a 1 día post-isquemia y a tiempos más largos se puede apreciar que en la mayoría de resonancias no hay cambios significativos entre ambos puntos temporales.

Las únicas resonancias que cambian de forma significativa entre la etapa aguda y la etapa crónica en la zona de infarto son LMap (2,80 ppm) y LM1 (0,90 ppm).

Cabe destacar que en ambos casos el cambio significativo se produce en los grupos de 6 y 8 días post-isquemia, no así en el grupo de 7 días post-isquemia, debido a las elevadas SD del grupo de 7 días.

En los LMap (2,80 ppm) es donde se produce el mayor cambio, concretamente, en el grupo de 6 días post-isquemia se produce un aumento de $3,84 \pm 0,64$ veces ($p = 0,03$) y en el grupo de 8 días post-isquemia aumenta $7,79 \pm 3,75$ veces ($p = 0,07$) que aunque el cambio es grande, debido a una elevada SD únicamente muestra tendencia a la significación. Sin embargo ello parece indicar que los LMap evolucionan en forma de aumento en la etapa crónica.

En el caso de los LM1 (0,9 ppm) también se muestra esta evolución en aumento de los 6 a los 8 días de forma significativa aunque en este caso el aumento es

de aproximadamente 2 veces ($p= 0,04$) a los 6 días, y 4,5 veces ($p=0,01$) a los 8 días post-isquemia.

Por lo tanto, las únicas variaciones que hay a lo largo del tiempo entre 1 día y la etapa crónica (6, 7, 8 días) en los infartos de las ratas son en moléculas que corresponden a lípidos, concretamente a unos ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en el caso de LMap (2,80ppm) y la resonancia de los metilos de los LM1 (0,90 ppm) que pueden corresponder al aumento de los mismos PUFAs.

En el caso de la resonancia de Lac + LM2 (1,30 ppm), aunque también tiene contribución lipídica del metileno de los LM2, no se aprecian diferencias significativas entre 1 día y el punto final, aunque el contenido lipídico pueda verse afectado, las variaciones simultáneas en el lactato a lo largo del tiempo (ver también apartado 5.1.1.6.2) impiden constatar diferencias. Únicamente en el grupo de 6 días muestra un aumento $1,14 \pm 0,24$ con tendencia a la significación ($p= 0,09$).

Contrariamente a lo esperado, en el hemisferio contralateral (que se considera un control) hay algunos cambios significativos. A pesar de no ser grandes cambios pueden indicar que hay cierto nivel de variabilidad en el análisis. Concretamente los cambios en el hemisferio contralateral son en la TCr (3,03 ppm) a 6 días de $1,13 \pm 0,04$ ($p=0,02$), en el NAA (2,02 ppm) a 7 días de $1,10 \pm 0,02$ ($p=0,02$).

Estos cambios menores en el hemisferio contralateral sin justificación clara hacen que para el análisis global en este casos sólo los cambios más relevantes en la zona de infarto puedan ser tomados en consideración, como serían los LMap (2,8 ppm) y los LM1 (0,90 ppm) que son de una magnitud superior a 2 mientras que el cambio con tendencia a la significación de los LM2 y también uno con tendencia a la significación en la TCho (3,21 ppm) a 8 días pudieran ser parte de esta “variabilidad basal” antes mencionada.

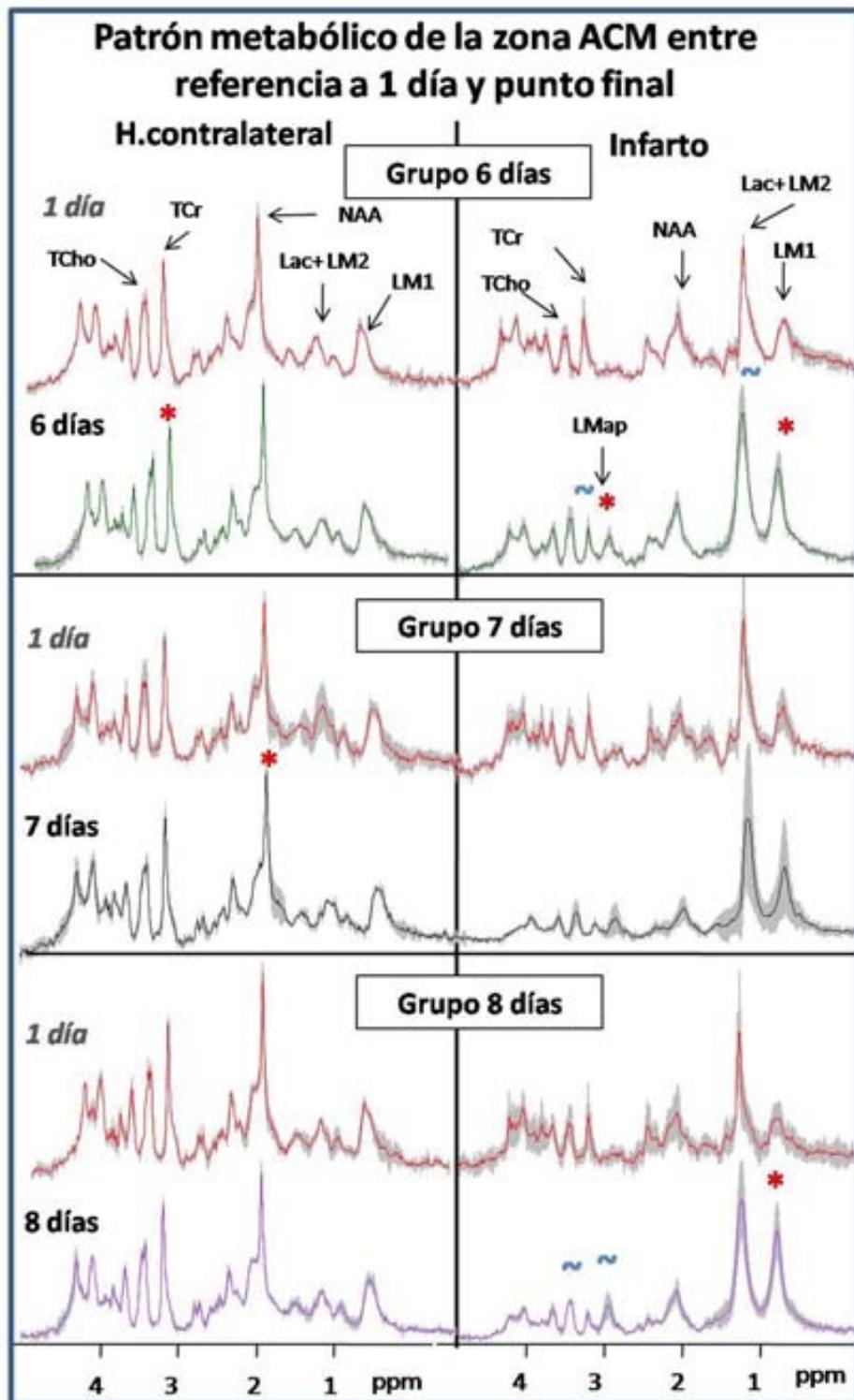


Figura 64: Espectros promedio \pm SD (sombreado en gris) de ERM *in vivo* de la evolución de la zona del infarto y del H.contralateral entre la referencia a 1 día (rojo), y el punto final: 6 días (verde), 7 días (negro) y 8 días (lila) post-isquemia. Cada espectro promedio corresponde a $n=3$. (ver

Tabla 2 para las asignaciones de las abreviaturas). Los cambios entre la referencia a 1 día y el punto final se indican con el símbolo * si tienen significación estadística ($p \leq 0,05$) y con el símbolo ~ si tienen tendencia a la significación ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado: T de Student pareado.

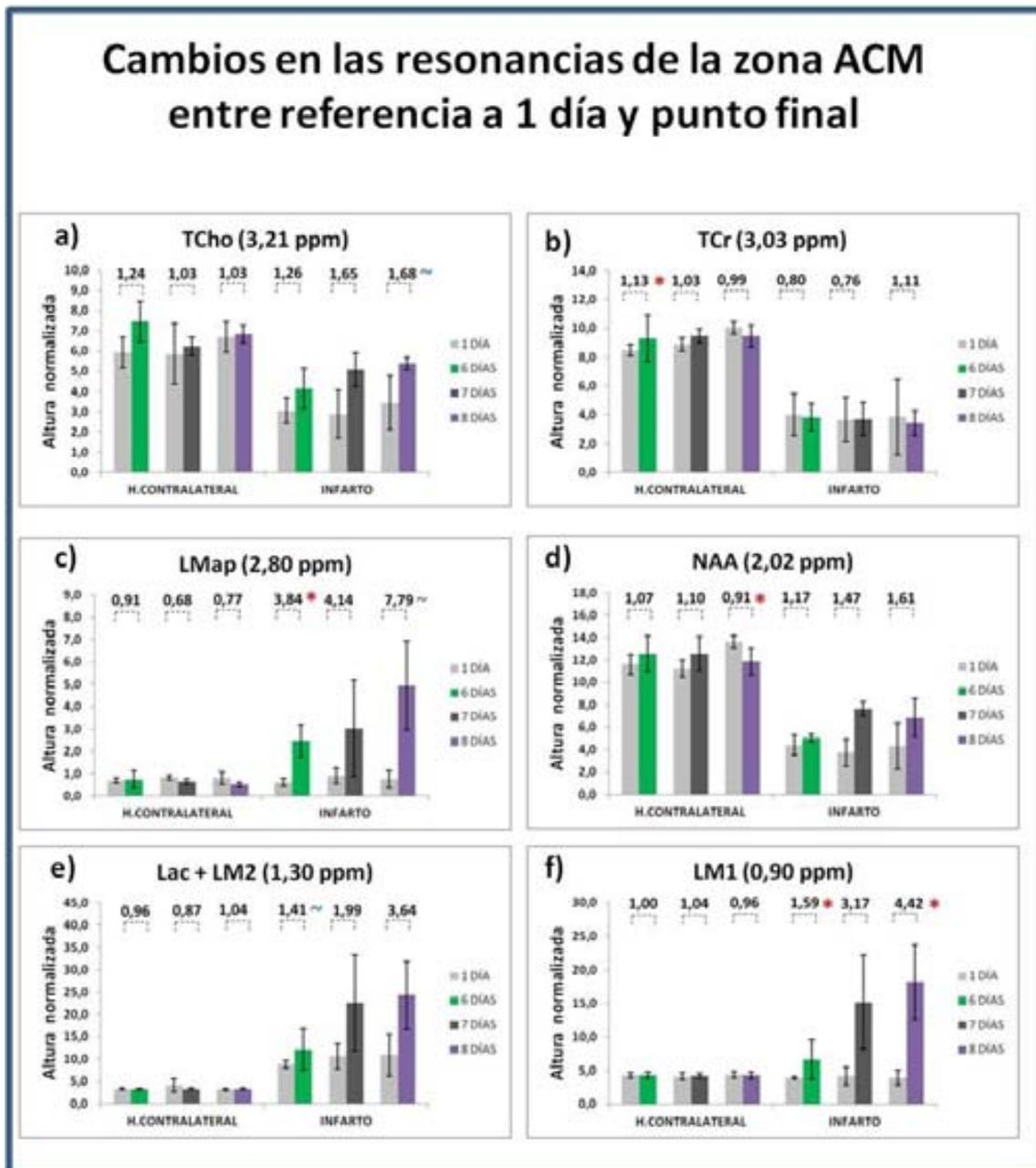


Figura 65: Gráficas promedio \pm SD de las alturas normalizadas a $UL2_c$ de las resonancias de ERM *in vivo* del infarto y el hemisferio contralateral entre la referencia 1 día (gris) y el punto final para cada grupo experimental: 6 días (verde), 7 días (negro) y 8 días (lila). Cada valor promedio corresponde a $n=3$. Sobre las barras horizontales discontinuas se indican los valores de cambio (VC) entre la referencia a 1 día y el punto final. Los VC con significación estadística se indican con el símbolo * ($p \leq 0,05$) y con el símbolo \sim si tienen tendencia a la significación ($0,05 < p < 0,10$) Test estadístico aplicado: T de Student pareado.

VC de los metabolitos entre referencia a 1 día y punto final					
RESONANCIA	GRUPO	H.contralateral (Prom \pm SD)	Significación ($p < 0,05$)	Infarto (Prom \pm SD)	Significación ($p < 0,05$)
TCho (3,21 ppm)	6 días	1,24 \pm 0,22	0,15	1,26 \pm 0,15	0,13
	7 días	1,03 \pm 0,23	0,97	1,65 \pm 0,28	0,50
	8 días	1,03 \pm 0,10	0,75	1,68 \pm 0,53	0,09 ~
TCr (3,03 ppm)	6 días	1,13 \pm 0,04	0,02 *	0,80 \pm 0,05	0,08~
	7 días	1,03 \pm 0,18	0,82	0,76 \pm 0,30	0,23
	8 días	0,99 \pm 0,09	0,82	1,11 \pm 0,88	0,73
LMap (2,80 ppm)	6 días	0,91 \pm 0,28	0,60	3,84 \pm 0,64	0,03 *
	7 días	0,68 \pm 0,25	0,18	4,14 \pm 4,15	0,25
	8 días	0,77 \pm 0,44	0,39	7,79 \pm 3,75	0,07~
NAA (2,02 ppm)	6 días	1,07 \pm 0,08	0,21	1,17 \pm 0,18	0,20
	7 días	1,10 \pm 0,02	0,02*	1,47 \pm 1,02	0,58
	8 días	0,91 \pm 0,06	0,13	1,61 \pm 1,04	0,15
Lac+LM2 (1,30 ppm)	6 días	0,96 \pm 0,07	0,43	1,14 \pm 0,24	0,09~
	7 días	0,87 \pm 0,36	0,42	1,99 \pm 1,51	0,34
	8 días	1,04 \pm 0,09	0,48	3,64 \pm 1,91	0,22
LM1 (0,90 ppm)	6 días	0,98 \pm 0,16	0,80	2,05 \pm 0,36	0,04 *
	7 días	1,04 \pm 0,12	0,68	3,17 \pm 2,69	0,29
	8 días	0,96 \pm 0,04	0,21	4,42 \pm 1,99	0,05 *

Tabla 7: VC promedio \pm SD entre referencia a 1 día y punto final obtenido a partir de las alturas normalizadas a UL2_c de las principales resonancias de ERM *in vivo* analizadas del H.contralateral y del infarto. Cada valor promedio corresponde a n=3. Los VC con significación estadística se indican con el símbolo * ($p \leq 0,05$) y si tienen tendencia a la significación con el símbolo ~ ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado: T de Student pareado.

Para determinar con más precisión algunos de estos cambios *in vivo* se procedió a caracterizar los cambios con la técnica de HRMAS a alta resolución de biopsias de tejido.

5.1.1.5. Análisis del patrón metabolómico por HRMAS *ex vivo*

Como se comentó en la sección 1.6.5.1 la técnica de HRMAS permite una mayor resolución espectroscópica debido a las características de la propia técnica así como a la posibilidad de trabajar a mayor campo magnético, aunque requiere el uso de biopsias, y por lo tanto, *ex vivo*.

Para la obtención de muestras para el análisis *ex vivo* se utilizó un subgrupo de animales no isquémicos-F (n=3), a 1 día-F (n=3) y a 7 días-F (n=3) post-isquemia, que se sacrificaron utilizando la técnica de la irradiación por FMW (-F).

En este subgrupo de animales el volumen de infarto a 1 día fue de $198 \pm 116 \text{ mm}^3$ y en el grupo de 7 días de $213 \pm 110 \text{ mm}^3$.

Todos los animales fueron sometidos a exploraciones de ERM *in vivo* antes del sacrificio para poder establecer comparaciones entre ambos patrones espectroscópicos, *in vivo* y *ex vivo*.

5.1.1.5.1. *Validación de la técnica*

Para poner a punto la técnica, en cuanto a la preservación del patrón metabolómico *ex vivo*, se determinó mediante la evaluación del cociente PCr/Cr (3,95/3,93 ppm) que debería ser similar lo descrito *in vivo*. Ya que en los espectros obtenidos para los animales investigados *in vivo* a 7 Teslas no se puede diferenciar la PCr de la Cr, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de artículos donde indicaban cocientes PCr/Cr o datos de concentraciones individuales que los permitieran calcular. Para intentar minimizar la variabilidad que pudiera haber entre los trabajos encontrados y nuestros experimentos, solo se seleccionaron resultados de los trabajos que cumplieron las siguientes características: 1) ratas sanas (ya que no se ha

encontrado ningún artículo con ratas isquémicas) y 2) datos de PCr/Cr provenientes de ERM, ya que las cuantificaciones por otras metodologías también son *post-mortem* y pueden tener la variabilidad intrínseca causada por la técnica de sacrificio escogida (

Tabla 8).

	Referencia	Cociente PCr/Cr	Medida	Técnica	Rata	PROMEDIO
1	(Pfeuffer et al. 1999)#	0,83	Concentración	ERM <i>in vivo</i>	Sprague Dawley	0,89 ± 0,05
2	(Lei et al. 2009)	0,9±0,1	Concentración	ERM <i>in vivo</i>	Sprague Dawley	
3	(Tkac et al. 2001)#	0,93	Concentración	ERM <i>in vivo</i>	Fischer	
4	(Detour et al. 2011)	0,30	Concentraciones calculadas respecto a <i>phantom</i> de Lac.	HRMAS <i>ex vivo</i>	Wistar	

Tabla 8: Tabla resumen de artículos que han determinado los valores de PCr y Cr mediante técnicas de ERM. Los datos corresponden a ERM *in vivo* a excepción del artículo 4 (marcado en gris) que da información sobre el cociente PCr/Cr en espectros de HRMAS de rata sana sacrificada con la metodología de irradiación FMW. El símbolo (#) indica que no daban información sobre el cociente de interés y fue calculado a partir de los valores de metabolitos promedio que ofrecían en el trabajo. En el artículo 4, las “concentraciones calculadas respecto a *phantom* de Lac” significa que el *phantom* contenía una concentración conocida de Lac a partir de la cual se infirió la cuantificación del Lac de las biopsias. Sin embargo, al ser el cociente significativamente distinto (según el test de Grubbs) al cociente de la literatura *in vivo*, no se tuvo en cuenta para calcular el promedio que se muestra en la última columna.

Para la comparación de los resultados obtenidos en nuestro estudio, ya que tanto el metabolito de la PCr como el de la Cr son singuletes y permiten una

integración relativamente sencilla se hizo un cálculo del cociente PCr/Cr en áreas, en lugar de intensidades normalizadas, ya que así es más similar a los datos *in vivo* que obtienen las concentraciones a partir de las áreas de los metabolitos que contribuyen a las resonancias detectadas.

Para el cálculo del cociente PCr/Cr de los espectros de los animales sacrificados por FMW se hizo el promedio de 12 muestras correspondientes a la zona del territorio de la ACM en los animales sanos y las zonas del hemisferio contralateral en los casos de infarto. Nuestros resultados en HRMAS muestran un cociente PCr/Cr (3,95/3,93 ppm) de $0,69 \pm 0,13$ (Figura 66). Comparado con el promedio de valores obtenido en la literatura $0,89 \pm 0,05$ el cociente es un 22% inferior ($p=0,02$). Por otro lado el cociente es superior al del trabajo de Detour y colaboradores (Detour et al. 2011) determinado en la Tabla 8 en el que utilizaron esta misma metodología de sacrificio por FMW y posterior HRMAS para el análisis a campo alto de cerebro biopsias de cerebro de rata sana.

Las diferencias entre nuestros resultados y los de *in vivo* hallados en la literatura (Tabla 8) pueden ser debidas a que los resultados que son extraídos de literatura *in vivo* en algunos casos utilizan técnicas de ajustes durante el post-procesamiento para calcular las concentraciones y esto podría estar causando un sesgo en estos valores en caso de no ser correctas las suposiciones en que dichos ajustes se basen.

De todos modos, a pesar de que el cociente PCr/Cr de los animales sacrificados con FMW es inferior al de *in vivo* determinado en la literatura, como el fallo energético por la caída de ATP no sucede hasta que no se agotan las reservas de PCr que permiten mantener la homeostasis energética mediante el sistema Cr-PCr/CK/ATP (Rambo et al. 2013) el hecho de detectar un cociente PCr/Cr (Figura 66) muy parecido al *in vivo* en las biopsias analizadas por HRMAS permite considerar que en el momento del sacrificio las reservas de ATP del animal estaban cubiertas y que el metabolismo fue detenido por FMW antes de que pudiera verse afectado el metabolismo energético y se produjeran afectaciones significativas del resto del patrón metabólico del tejido

investigado debidas a la isquemia post-mortem. Por este motivo los resultados obtenidos por HRMAS se consideran equivalentes a los de *in vivo*.

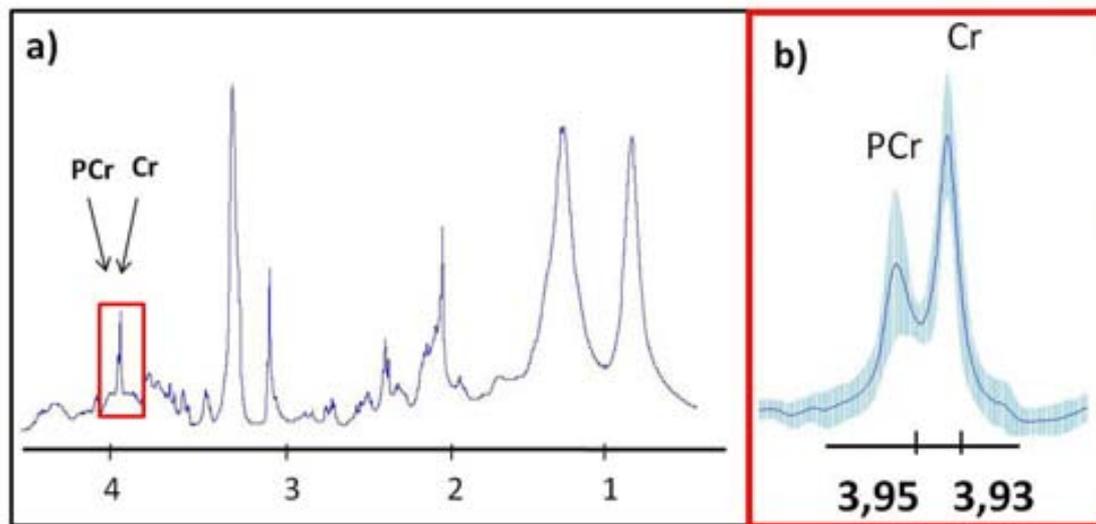


Figura 66: Valoración de la detención del metabolismo en biopsias de tejido analizadas por HRMAS **a)** Espectro promedio de las regiones hemisferio contralateral de los animales control (2 hemisferios) y del hemisferio contralateral a 1 día y 7 días post-infarto (n=12). El cuadro rojo indica la región donde aparece en el espectro el cociente PCr/Cr determinado. En **b)** se amplía la región del cuadrado rojo y se muestra la región de la PCr/Cr del espectro con la SD en sombreado azul.

5.1.1.6. Espectroscopía HRMAS del territorio de la ACM

En la Figura 67 se puede observar el espectro promedio (sin SD) obtenido por HRMAS para los 3 grupos. Se representan las 2 secuencias: la de pulso-adquisición, que permite determinar las resonancias de todos los metabolitos y la de Standard Hahn spin echo (TE=136), en la que no parecen los metabolitos con un TE corto y el Lac y otras resonancias aparecen invertidas.

Un hecho a tener en consideración es que en este trabajo sólo se han analizado por HRMAS *ex vivo* metabolitos que también son detectables *in vivo* claramente sin post-procesamiento adicional, ya que el objetivo del trabajo era determinar si los cambios detectados por HRMAS eran similares a los observados en el patrón espectral *in vivo*. Sin embargo, en HRMAS al tener mayor resolución y mejor SNR se podrían

analizar en un trabajo futuro un mayor número de metabolitos mediante esta técnica que utilizando ERM *in vivo*. Un hecho a destacar en los espectros *ex vivo* analizados por HRMAS mediante la secuencia de pulso-adquisición, tal y como se puede apreciar en la Figura 67, es que incluso en los animales no isquémicos la señal de LM a 1,30 y 0,90 es mucho más intensa que *in vivo* (Figura 62).

Esto es debido a que la velocidad de giro implícita en la técnica (3000 Hz) produce una mayor movilización los LM lípidos en la muestra con lo que su detección es mayor por resonancia magnética y pueden no corresponderse con las señales detectadas *in vivo* que no tienen dicha movilidad. Por lo tanto la técnica de HRMAS nos permitiría detectar cambios no visibles *in vivo*. De forma similar ocurre con la resonancia de las sustancias que contribuyen a la TCho que en la secuencia pulso-adquisición se convierte en la resonancia más prominente del espectro.

Los resultados del análisis de los valores de cambio entre la zona de infarto y la zona contralateral en el análisis por HRMAS es similar al de *in vivo*. En el caso de los controles-F no isquémicos no hay diferencias significativas entre los 2 hemisferios, mientras que a 1 y 7 días-F hay diferencias en la mayoría de metabolitos analizados que son los que aparecen referenciados

A continuación se detallan los resultados del análisis de metabolitos que se consideran de interés para detectar cambios debidos al infarto se desarrollarán en los apartados siguientes.

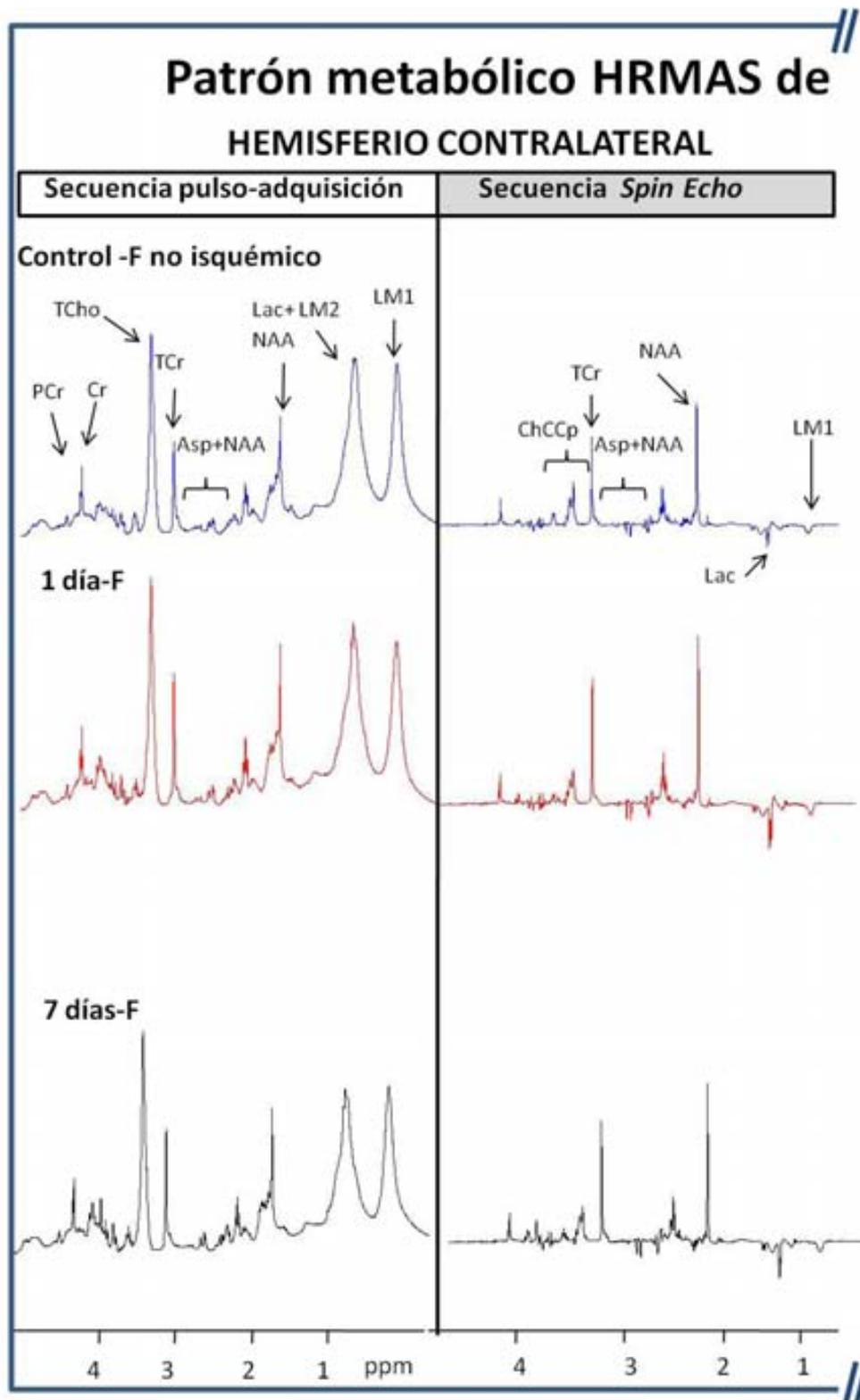
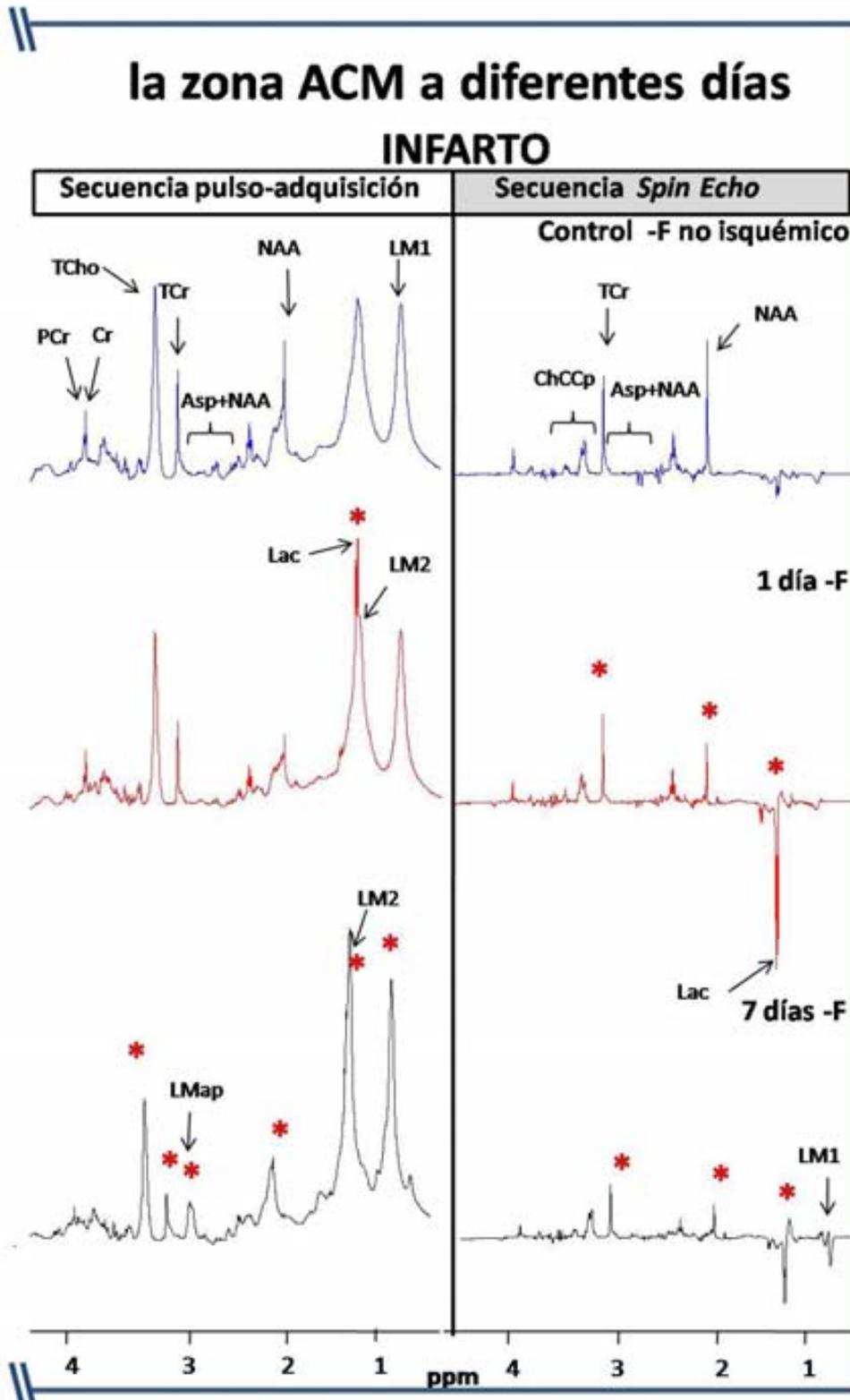


Figura 67: Espectros promedio \pm SD (sombreado en gris) de HRMAS *ex vivo* de la zona de la ACM para cada grupo experimental normalizados a UL2: control-F no isquémico (azul), 1 día -F (rojo), 7 días-F (negro) post-isquemia. Cada espectro promedio corresponde a $n=3$ (ver Tabla 2 para las asignaciones de las abreviaturas). Los cambios entre la zona de infarto y el H. contralateral se indican con el símbolo * si tienen significación estadística ($p \leq 0,05$). Test estadístico aplicado: T de Student.



5.1.1.6.1. Lípidos móviles apoptóticos

En la Figura 67 se pueden observar los cambios que se producen en la zona de Asp+NAA. En los espectros de mejor resolución *ex vivo* se pueden apreciar 4 resonancias (2,82 ppm, 2,78 ppm; 2,66 ppm y 2,62 ppm). Las resonancias correspondientes a 2,66 ppm y 2,62 ppm son más intensas y se corresponden con el aspartato que se encuentra formando parte del NAA.

A 7 días post-isquemia se observa en el infarto un aumento de la resonancia que se ha atribuido a LMap (2,80 ppm). Esta resonancia se situaría solapada con la posición del Asp (2,82 y 2,78 ppm). El motivo por el cual se considera que esta resonancia no corresponde a un aumento de Asp, es porque a 1 día post-isquemia se detecta una disminución generalizada de todos los aspartatos que se confunden con la base del espectro (el ruido) en las condiciones de adquisición.

De todos modos, para un correcto análisis de la zona correspondiente a la zona de los aspartatos y LMap se llevó a cabo un ensayo *in vitro* de determinación de las señales correspondientes al ácido aspártico para determinar sus resonancias en HRMAS utilizando la secuencia de pulso y adquisición y *Spin echo* para poder determinar su modulación, es decir, que utilizando secuencias con TE largos el pulso de 180° no reenfocherà la señal, y aparece invertido en el espectro.(Lange et al. 2006).

Para ello se utilizó un *phantom* que contenía una disolución de ácido aspártico y creatina en agua deuterada a pH*(medida del pHmetro sin corregir por el efecto del deuterio en la medida del pH) 7.0. El N-CH₃ de la creatina (3,03 ppm) se utilizó como referencia de desplazamiento químico (Figura 68).

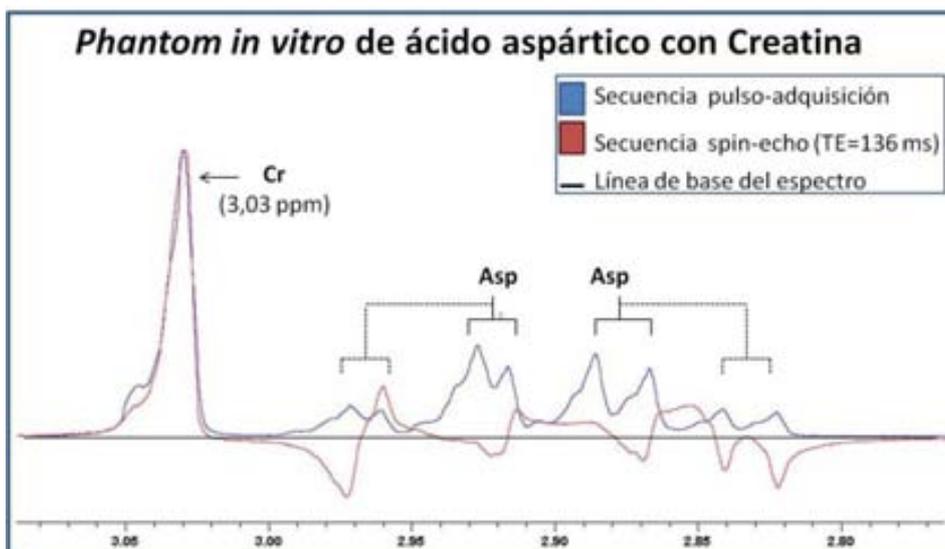


Figura 68: Disolución de ácido aspártico con creatina donde se superponen la solución analizada mediante secuencia de pulso-adquisición (azul) y secuencia *Spin echo* (rojo) junto con la línea de base (negro). Se muestra una ampliación de la región de 2,75 a 3,1 ppm correspondientes al grupo β -CH₂ del Asp. La apodización es de 0,5 Hz. La Cr se introdujo como referencia de desplazamiento químico.

En los resultados obtenidos *in vitro* (Figura 68) en la secuencia de pulso-adquisición se puede observar como el β -CH₂ del Asp es un doblete de pseudocuarteto con resonancias centradas a 2,90 ppm mientras que con la secuencia *Standard Hahn spin echo* se produce una modulación parcial de la fase de estas resonancias.

Una diferencia a mencionar es que en la muestra de tejido de HRMAS (Figura 69) las resonancias del Asp están centradas en 2,80 ppm y no a 2,90 ppm. Estas diferencias en el desplazamiento químico son debidas a que las resonancias del Asp son dependientes de pH y las diferencias que pueda haber entre el pH de la muestra de tejido y la disolución del *phantom* pueden ser las responsables de este cambio.

En la Figura 69 se muestran los espectros de la región correspondiente a los cambios que se producen en la zona Asp + NAA (entre 2,40 y 3,00 ppm) con el tiempo post-infarto. En los espectros *in vivo* no se pueden apreciar las resonancias bien resueltas. En los espectros de pulso-adquisición se puede comprobar cómo *ex vivo* por HRMAS se detectan las señales correspondientes a los Asp (centradas en la región de 2,80) en rata control y también en los hemisferios contralaterales de las ratas con

isquemia. Son señales poco intensas (indicadas como Asp). De forma contigua a estas señales, hay otras más intensas, que también corresponderían a Asp pero son los del N-acetilaspartato (indicadas como NAA), que tiene resonancias a 2,62y 2,66 ppm. Estas varían a día 1 y 7 post-isquemia de forma distinta a como lo hacen los Asp.

Ahora bien, para determinar que la resonancia que aparece a los 7 días en la zona de infarto corresponde a LMap y no a Asp es necesario el análisis de la secuencia *Spin echo*. En la Figura 69 se puede determinar que los Asp de tejido sano se invierten de forma parcial, incluso en el tejido infartado a 1 día post-isquemia se observa esta modulación, mientras que a 7 días en la zona de infarto no se invierten las resonancias, por lo que el compuesto que se está observando es distinto a los Asp.

Este análisis de la secuencia *Spin echo*, junto con la bibliografía existente al respecto (Griffin et al. 2003) correspondiente a la detección de PUFA que aparecen en esta zona, de manera asociada a procesos apoptóticos, hizo que se identificara esta señal a día 7 post-isquemia como correspondiente a lípidos móviles apoptóticos (LMap) de tipo PUFA.

Por lo tanto, en este apartado cabe resaltar: 1) Cuando se mencionan cambios en el valor de LMap comparando con controles o tiempos precoces post-infarto (fase aguda) verdaderamente se está estableciendo una relación entre las señales de Asp basal presentes inicialmente y LMap que aparecen en un estadio más tardío de la evolución del infarto. Con lo cual, se subestima ligeramente el aumento de los LMap y 2) La SNR que se obtiene con la espectroscopía *in vivo*, sobretodo en el caso del espectro correspondiente a tejido sano, conlleva trabajar a un nivel muy similar al del ruido para las señales basales de Asp con lo cual, al calcular cocientes referenciados a ese valor, se podría estar incurriendo en una infra o sobrevaloración de dicho cociente a la hora de valorar los cambios producidos por el infarto. A pesar de esto, especialmente *in vivo*, tal y como se puede determinar mediante la línea discontinua en la Figura 69 la contribución de los aspartatos es prácticamente despreciable y por lo tanto al calcular el cociente de LMap entre infarto y hemisferio contralateral se considera aceptable.

En la Figura 69 la señal de LMap a 2,80 ppm es fácilmente detectable en etapas tardías del infarto tanto *in vivo* como *ex vivo*. En la Figura 70 y en la

Tabla 9 se determinan numéricamente estos cambios: concretamente, a 7 días post-isquemia *in vivo* el aumento es notable ($6,11 \pm 4,53$) aunque no haya significación estadística debido a una elevada SD. Mientras que las mismas muestras analizadas por HRMAS, que tiene una mayor SNR, muestran un aumento significativo a los 7 días de $3,95 \pm 0,80$ ($p < 0,01$).

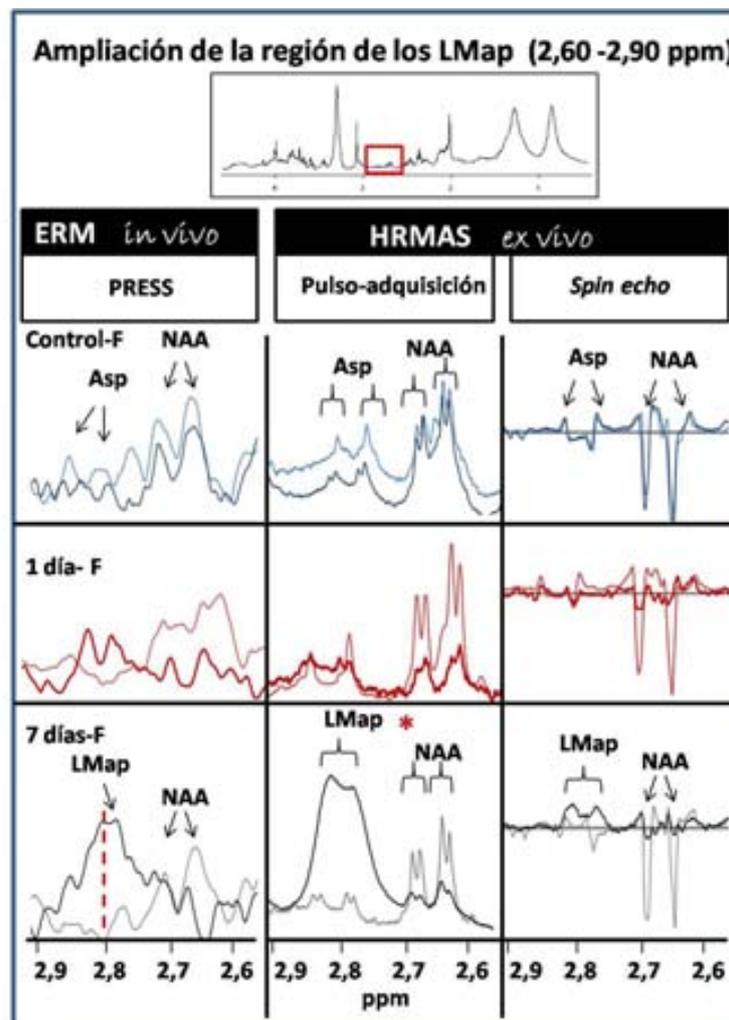


Figura 69: Ampliación de la región entre 2,40 ppm y 3,00 ppm que corresponde a la zona de los LMap (2,80 ppm) tanto para ERM *in vivo* como para HRMAS *ex vivo* (secuencia de pulso y adquisición y *Spin Echo*). Se superponen en color oscuro el espectro correspondiente a la zona de infarto y en color claro el del H. contralateral. El color corresponde a rata control-F (azul), rata 1 día-F (rojo) y rata 7 días-F (negro). Para la representación gráfica se ha utilizado un espectro de un único animal. Sin embargo para determinar los cambios estadísticamente significativos, representados por el símbolo * ($p \leq 0,05$) se han calculado a partir de la $n=3$ de cada grupo. Test estadístico aplicado: T de Student.

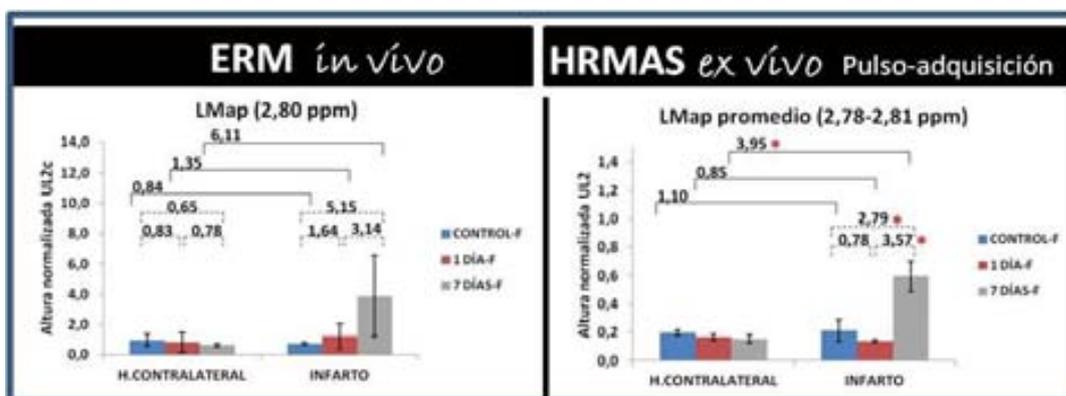


Figura 70: Gráficas promedio \pm SD para la resonancia de LMap (2,80) de las alturas normalizadas a UL2_c en el caso de la ERM *in vivo* y normalizadas a UL2 en el caso del HRMAS para cada grupo experimental (control-F, 1 día-F, 7 días-F post-isquemia). Cada valor promedio corresponde a n=3. Sobre las barras horizontales continuas se indican los VC entre el infarto y el H.contralateral. Sobre las barras horizontales discontinuas los valores de cambio temporales (VCT) que corresponden a diferencias entre los grupos a distintos días. Los cambios con significación estadística se indican con el símbolo * ($p < 0,05$) Test estadístico aplicado para los valores de VC: T de Student, test estadístico aplicado para los valores de VCT: ANOVA.

VC de los LMap (2,80 ppm) entre infarto y H.contralateral				
GRUPO	VC <i>in vivo</i> (Promedio \pm SD)	Significación ($p < 0,05$)	VC <i>ex vivo</i> (Promedio \pm SD)	Significación ($p < 0,05$)
Control	0,84 \pm 0,31	0,37	1,10 \pm 0,44	0,74
1 día	1,35 \pm 1,00	0,54	0,85 \pm 0,07	0,54
7 días	6,11 \pm 4,53	0,17	3,95 \pm 0,80	< 0,01 *

Tabla 9: VC promedio \pm SD entre la zona de infarto y contralateral para la resonancia de LMap (2,80 ppm) tanto por ERM *in vivo* como por HRMAS *ex vivo*. El VC se calculó a partir de las alturas normalizadas a UL2 para ERM *in vivo* y UL2C para ERM *ex vivo*. Cada valor promedio corresponde a n=3. Los VC con significación estadística se indican con el símbolo * ($p < 0,05$). Test estadístico aplicado: T de Student.

5.1.1.6.2. Lactato + LM2

El lactato es un metabolito ampliamente estudiado en ictus ya que su acúmulo es propio de la hipoxia que caracteriza a esta patología. Como se ha comentado anteriormente, la resonancia del Lac (el grupo metilo a 1,30 ppm) *in vivo* no se puede atribuir exclusivamente a este metabolito ya que puede tener contribución cercana en cuanto a desplazamiento químico del grupo metileno de los LM2 (a 1,28 ppm).

En la Figura 71 se puede observar que por HRMAS post-FMW sí son distinguibles ambas resonancias. En el caso del lactato se puede observar el doblete a 1,33-1,35 ppm y la resonancia de los LM2 a 1,28 ppm.

En la Figura 72 y la Tabla 10 se muestra cuantitativamente cómo *in vivo* la resonancia de Lac+LM2 parece que aumente a lo largo del tiempo, concretamente, respecto al hemisferio contralateral a 1 día post-isquemia el aumento es de $2,54 \pm 0,65$ veces ($p < 0,01$) y a 7 días de $6,54 \pm 4,08$ veces, aunque en el caso de 7 días el cambio no es significativo debido a una elevada variabilidad de dicha resonancia.

Sin embargo, los mismos animales analizados *ex vivo* mediante HRMAS post-FMW (Figura 71) permiten ser más específicos. A 1 día post-isquemia, el aumento de señal es debido a un aumento del Lac, como se puede observar en las dos secuencias de adquisición, mientras que los LM2 prácticamente no aumentan.

En cambio, a los 7 días post-isquemia los LM2 incrementan unas $1,55 \pm 0,26$ veces ($p < 0,01$), mientras que el Lac se reduce respecto a 1 día en las 2 secuencias. La reducción del lactato entre 1 día y 7 días post-isquemia es, aproximadamente, de un 40% (cociente Lac 7 días/1 día de 0,63 en el caso de la secuencia de Pulso-adquisición y 0,67 en el caso de la secuencia *Spin echo*).

La secuencia *Spin echo*, que permite distinguir el Lac sin contribución de los LM2, permite determinar cómo los niveles de Lac en la zona de infarto a 1 y 7 días son superiores al hemisferio contralateral, más similar a lo que ocurre *in vivo*. En la secuencia de pulso y adquisición, en cambio, parecería que a los 7 días los niveles de Lac serían similares a los de los controles no isquémicos. Estas diferencias entre ambas

secuencias hacen suponer que en la secuencia pulso-adquisición la señal del Lac tiene contribución de la señal LM2.

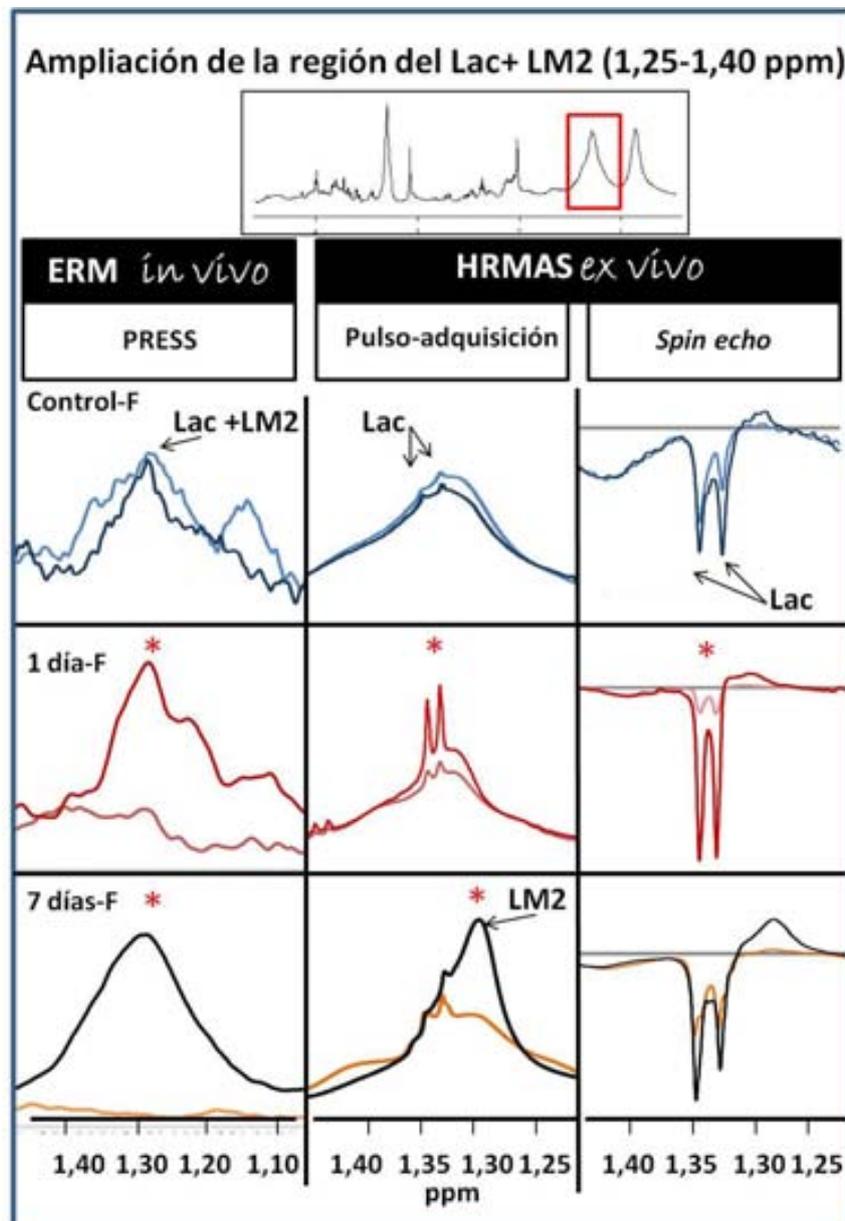


Figura 71: Ampliación de la región entre 1,10 ppm y 1,40 ppm que corresponde a la zona de los Lac+LM2 (1,30 ppm) tanto para ERM *in vivo* como para HRMAS *ex vivo* (secuencia de pulso y adquisición y *Spin Echo*). El color corresponde a rata control-F (azul), rata 1 día-F (rojo) y rata 7 días-F (negro). En el grupo control-F y a 1 día-F post isquemia se superponen en color oscuro el espectro correspondiente a la zona de infarto y en color claro el del H. contralateral. En el caso del grupo 7 días-F el color negro corresponde a infarto y el naranja a H. contralateral. Para la representación gráfica se ha utilizado un espectro de un único animal. Sin embargo para determinar los cambios estadísticamente significativos, representados por el símbolo * ($p \leq 0,05$) se han calculado a partir de la $n=3$ de cada grupo. Test estadístico aplicado: T de Student.

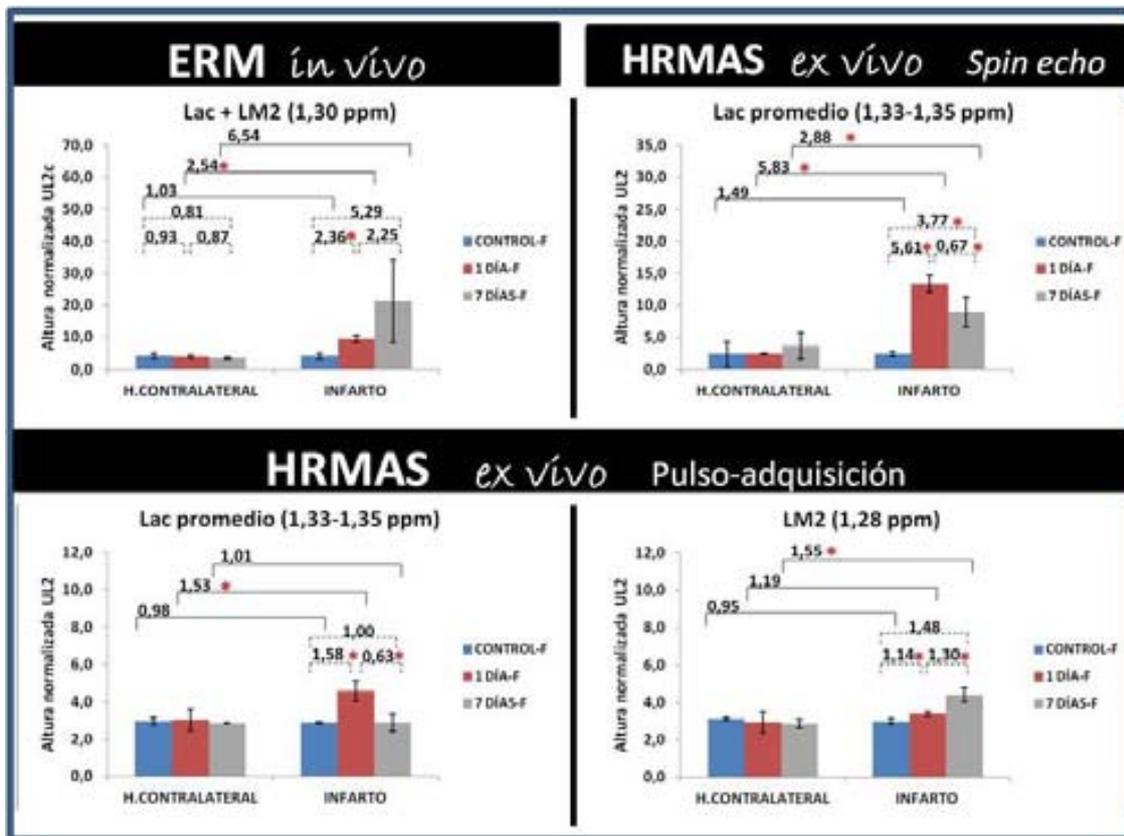


Figura 72: Gráficas promedio \pm SD para la resonancia de Lac+LM2 (1,30 ppm) de las alturas normalizadas a UL2_c en el caso de la ERM *in vivo* y normalizadas a UL2 en el caso del HRMAS para cada grupo experimental (control-F, 1 día-F, 7 días-F post-isquemia). Cada valor promedio corresponde a n=3. Sobre las barras horizontales continuas se indican los VC entre el infarto y el H.contralateral. Sobre las barras horizontales discontinuas los VCT. Los cambios con significación estadística se indican con el símbolo * (p<0,05) Test estadístico aplicado para los valores de VC: T de Student, test estadístico aplicado para los valores de VCT: ANOVA.

VC de Lac+LM2 entre infarto y H.contralateral						
ERM <i>in vivo</i>	RESONANCIA	GRUPO	PRESS	Sig.		
	Lac +LM2	Control	1,03 ± 0,40	0,93		
		1 día	2,54 ± 0,65	< 0,01 *		
		7 días	6,54 ± 4,08	0,14		
HRMAS <i>ex vivo</i>	RESONANCIA	GRUPO	Pulso- adquisición	Sig.	<i>Spin echo</i>	Sig.
	Lac	Control	0,98 ± 0,06	0,59	1,49 ± 0,93	0,99
		1 día	1,53 ± 0,26	0,03*	5,83 ± 0,75	< 0,01 *
		7 días	1,01 ± 0,16	0,922	2,88 ± 1,06	0,04 *
	LM2	Control	0,95 ± 0,07	0,21		
		1 día	1,19 ± 0,26	0,26		
		7 días	1,55 ± 0,26	< 0,01 *		

Tabla 10: VC promedio \pm SD entre la zona de infarto y contralateral para la resonancia de Lac+LM2 (1,30 ppm) tanto por ERM *in vivo* como por HRMAS *ex vivo*. El VC se calculó a partir de las alturas normalizadas a UL2_c para ERM *in vivo* y UL2 para ERM *ex vivo*. Cada valor promedio corresponde a n=3. Los VC con significación estadística se indican con el símbolo *(p \leq 0,05). Test estadístico aplicado: T de Student.

5.1.1.6.3. Colina total

La señal de resonancia magnética correspondiente a la colina total (TCho) es en realidad la suma de los componentes que contienen el grupo trimetilamina de la colina, en inglés denominados, *Choline containing compounds* (ChCCp) entre otros compuestos minoritarios.

En los espectros *in vivo* y *ex vivo* de pulso y adquisición, estas señales sólo son distinguibles en los casos que tienen una mejor resolución mientras que en la secuencia *Spin echo ex vivo* estos compuestos aparecen mejor separados (Figura 73).

En los espectros *in vivo* el punto máximo de la señal de TCho se acostumbra a asignar a 3,21 ppm, mientras que en los espectros *ex vivo* de HRMAS, en la secuencia de pulso y adquisición el punto máximo corresponde a 3,25 ppm.

En la secuencia *Spin echo*, se aprecian los distintos ChCCp que corresponden a la fosfatidilcolina (PtdCho; 3,25 ppm), la glicerofosfocolina (GPCho; 3,21 ppm), la fosfocolina (PCho; 3,20 ppm) y la colina “libre” (Cho, 3,19).

En la Figura 74 y la Tabla 11 cuando se analiza la TCho se observa *in vivo* una disminución significativa respecto al hemisferio contralateral a valores de $0,59 \pm 0,11$ ($p < 0,01$) a 1 día post-isquemia, que es más pronunciada que a 7 días, en donde es de $0,74 \pm 0,14$ ($p = 0,02$). A los 7 días, aun siendo un cambio significativo con respecto a día 1, parecería sugerir que en la etapa subaguda se estuvieran recuperando los niveles de colina total.

En el experimento *ex vivo* de pulso-adquisición, de forma contradictoria a lo que se muestra *in vivo*, parece que la mayor disminución de la TCho de $0,52 \pm 0,11$ veces ($p = 0,02$) sea a 7 días post-isquemia mientras que a 1 día no hay diferencias significativas respecto al contralateral. En cambio en el experimento de *spin echo*, donde se observan los compuestos de colina diferenciados, de forma general las mayores disminuciones se observan a 1 día post-isquemia mientras que a 7 días parece que se recuperen los valores de los animales control de forma más similar a lo que ocurre *in vivo*.

Analizando los compuestos de colina por separado a 1 día post-isquemia se encuentran disminuciones en la GPCho (3,21 ppm) y en PCho (3,20 ppm) que serían las causantes de la disminución en los niveles totales de colina que se observa por ERM *in vivo*.

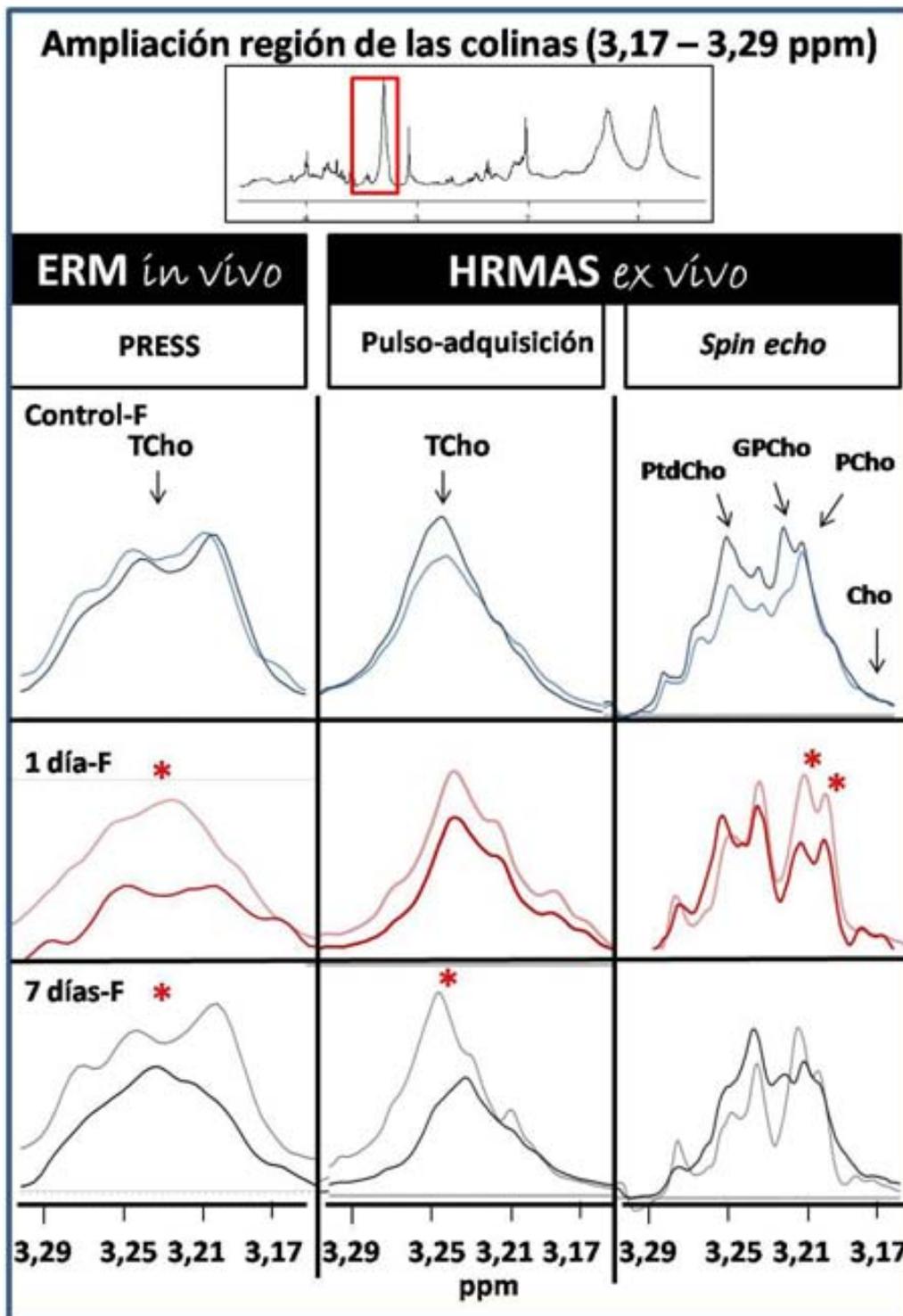


Figura 73: Ampliación de la región entre 3,17 ppm y 3,30 ppm que corresponde a la zona de los ChCCp (3,19-3,25 ppm) tanto para ERM *in vivo* como para HRMAS *ex vivo* (secuencia de pulso y adquisición y Spin Echo). Se superponen en color oscuro el espectro correspondiente a la zona de infarto y en color claro el del H. contralateral. El color corresponde a rata control-F (azul), rata 1 día-F (rojo) y rata 7 días-F (negro). Para la representación gráfica se ha utilizado un espectro de un único animal. Sin embargo para determinar los cambios estadísticamente significativos, representados por el símbolo * ($p \leq 0,05$) se han calculado a partir de la $n=3$ de cada grupo. Test estadístico aplicado: T de Student.

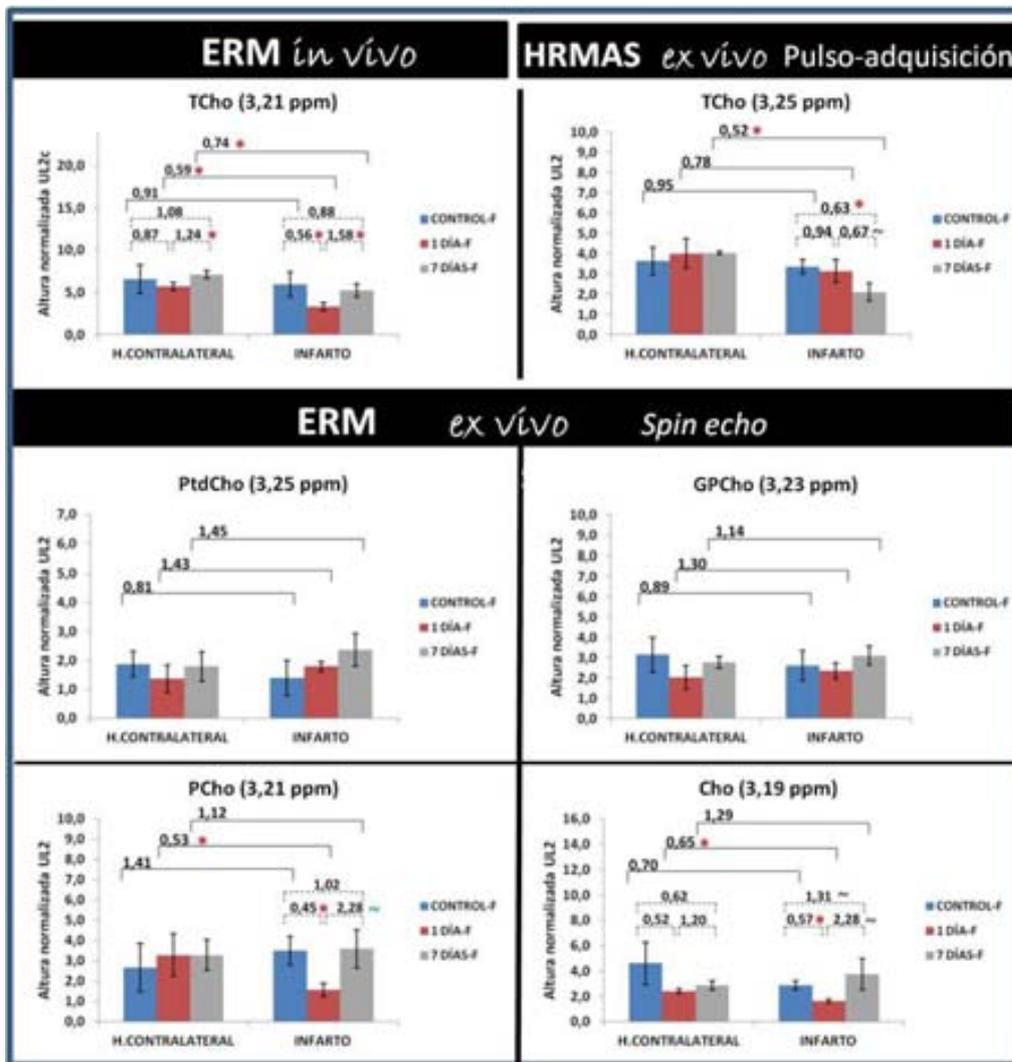


Figura 74: Gráficas promedio \pm SD para la resonancia de los compuestos que contienen colina (ChCCp, 3,21 ppm) de las alturas normalizadas a $UL2_c$ en el caso de la ERM *in vivo* y normalizadas a $UL2$ en el caso del HRMAS para cada grupo experimental (control-F, 1 día-F, 7 días-F post-isquemia). Cada valor promedio corresponde a $n=3$. Sobre las barras horizontales continuas se indican los VC entre el infarto y el H.contralateral. Sobre las barras horizontales discontinuas los VCT. Los cambios con significación estadística se indican con el símbolo * ($p < 0,05$) y si tienen tendencia a la significación con el símbolo ~ ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado para los valores de VC: T de Student, test estadístico aplicado para los valores de VCT: ANOVA.

VC de los compuestos que contienen colina entre infarto y H.contralateral							
	ERM <i>in vivo</i>		HRMAS <i>ex vivo</i>				
GRUPO	PRESS TCho (3,21 ppm)	Sig. (p<0,05)	Pulso- adquisición TCho (3,25ppm)	Sig.	RESO.	<i>Spin echo</i>	Sig. (p<0,05)
Control	0,91 ± 0,07	0,66	0,95 ± 0,25	0,56	PtdCho (3,25 ppm)	0,88 ± 0,44	0,44
1 día	0,59 ± 0,11	< 0, 01 *	0,78 ± 0,04	0,18		1,78 ± 1,01	0,12
7 días	0,74 ± 0,14	0,02 *	0,52 ± 0,11	0,02 *		1,47 ± 0,59	0,18
Control					GPCho (3,23 ppm)	1,07 ± 0,49	0,85
1 día						0,50 ± 0,12	0,02 *
7 días						1,03 ± 0,20	0,91
Control					PCho (3,21 ppm)	0,77 ± 0,25	0,12
1 día						0,69 ± 0,10	0,01 *
7 días						1,34 ± 0,37	0,28
Control					Cho (3,19 ppm)	1,15 ± 0,78	0,81
1 día						1,31 ± 0,59	0,43
7 días						1,58 ± 0,17	0,22

Tabla 11: VC promedio \pm SD entre la zona de infarto y contralateral para la resonancia de la TCho por ERM *in vivo* como por HRMAS *ex vivo* y para los distintos compuestos de colina Cho, PCho, PtdCho que se distinguen por HRMAS en la secuencia *Spin Echo*. El VC se calculó a partir de las alturas normalizadas a UL2_C para ERM *in vivo* y UL2 para ERM *ex vivo*. Cada valor promedio corresponde a n=3. Los VC con significación estadística se indican con el símbolo * (p<0,05). Test estadístico aplicado: T de Student.

5.1.1.7. Resultados del análisis inmunohistoquímico

A la vista de que uno de los mayores cambios que se detectaron en los animales con infarto fue en la señal atribuida a los LMap (2,80ppm) que en la literatura aparece relacionado con apoptosis, se llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico para detectar la presencia de apoptosis tanto en la zona infartada como en la región homóloga del hemisferio contralateral mediante la tinción con TUNEL (Figura 75).

Estos ensayos se hicieron en los animales que no fueron sacrificados por irradiación con microondas focalizadas, sino por perfusión transcárdica, que fueron los grupos evaluados como control, 1 día, 6,7 y 8 días post-isquemia.

Los resultados inmunohistoquímicos de marcaje de la apoptosis (Figura 75 y tabla 12) muestran que la apoptosis es más elevada en la zona de infarto que en la contralateral desde 1 día post-isquemia, aunque, a excepción de algunos casos, en el hemisferio contralateral también se detecta un cierto nivel de apoptosis basal.

En valores absolutos las células TUNEL+/mm² de la zona de infarto son similares a 1 día que a 6, 7 u 8 días. Al analizar el valor de cambio entre el H.contralateral y la zona de infarto se observa que a 1 día post-isquemia los cambios no son significativos debido a una alta SD en la zona de infarto a 1 día. En la etapa subaguda/crónica del infarto, a 6, 7 u 8 días post-isquemia el cambio entre el hemisferio contralateral y el infarto sí es significativo. Siendo el valor de cambio muy superior a los 7 días que a 6 y 8 días, concretamente de $506,19 \pm 406,16$ ($p=0,02$).

Hay que tener en cuenta la elevada variación de la SD en los promedios de los valores de cambio de la Tabla 12 como el valor de cambio se calcula para cada animal y después se realiza el promedio, este hecho indica que los valores de apoptosis son muy distintos entre los animales de cada grupo investigado.

Sin embargo a pesar de la elevada variabilidad, la diferencia respecto al hemisferio contralateral es significativa.

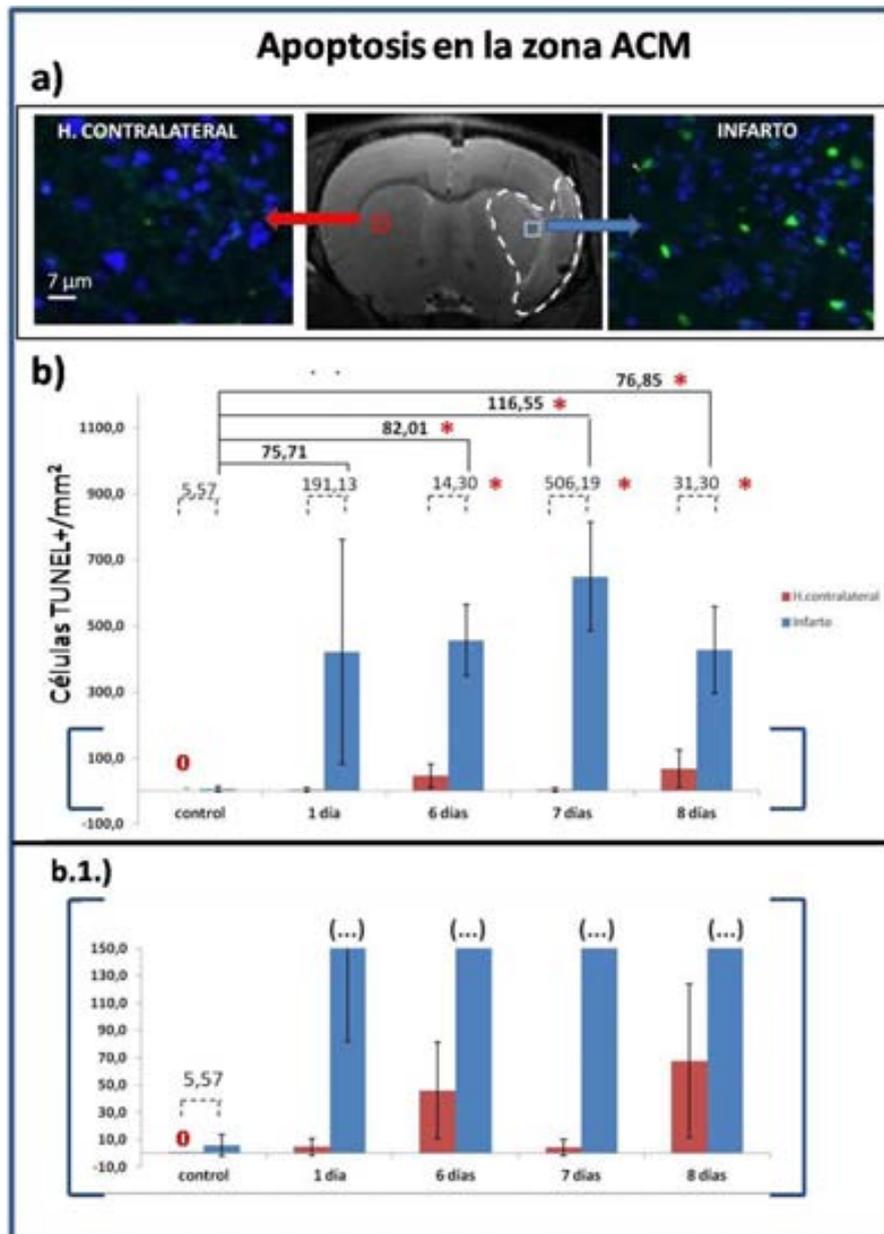


Figura 75: Análisis inmunohistoquímico de la apoptosis en la zona de la ACM **a)** Conjunto de imágenes de la tinción inmunohistoquímica con TUNEL (células marcadas en verde) en la zona de infarto y el H.contralateral. La tinción con DAPI (azul) permite ver todos los núcleos de las células de la muestra. La imagen central corresponde a una imagen ponderada en T₂ de una rata a 7 días post-isquemia. Los cuadrados azul y rojo indican la posición de la muestra analizada, **b)** Gráficas promedio \pm SD para el marcaje de apoptosis en la zona de infarto (barra azul) y la zona contralateral (barra roja) para los distintos grupos experimentales. En **b.1.)** se muestra una ampliación de la región inferior de b) para valorar mejor la apoptosis basal en el H.contralateral. Cada valor promedio corresponde a n=3. Sobre las barras horizontales discontinuas se indican los VC entre el infarto y el H.contralateral. Sobre las barras horizontales continuas los VCT. Los cambios con significación estadística se indican con el símbolo * ($p < 0,05$). Test estadístico aplicado para los valores de VC: T de Student, test estadístico aplicado para los valores de VCT: ANOVA.

Apoptosis en la zona de la ACM (TUNEL+/mm ²)				
GRUPO	TUNEL+/ mm ² H. contralateral (Promedio ± SD)	TUNEL+/ mm ² Infarto (Promedio ± SD)	VC Infarto-H.contralateral (Promedio ± SD)	Significación (p ≤ 0,05)
Control	0,00 ± 0,00	4,90 ± 8,49	5,57 ± 7,91 [#]	0,479
1 día	3,89 ± 6,74	421,62 ± 339,88	191,13 ± 208,68 [#]	0,167
6 días	46,05 ± 35,37	456,67 ± 106,82	14,30 ± 10,44	<0,01*
7 días	3,73 ± 6,46	649,03 ± 165,21	506,19 ± 406,16 [#]	0,02*
8 días	67,60 ± 56,28	427,95 ± 130,85	31,30 ± 47,80	0,01*

Tabla 12: Valores de apoptosis promedios ± SD del recuento de células apoptóticas por inmunohistoquímica (TUNEL+/mm²) en la zona de infarto y H. contralateral para cada grupo. Análisis de los VC entre ambas regiones. El símbolo [#] indica que para el cálculo de los VC los valores correspondientes a 0 se han convertido arbitrariamente a 1 para poder realizar el cociente. Cada valor promedio corresponde a n=3. Los VC con significación estadística se indican con el símbolo *(p≤0,05). Test estadístico aplicado: T de Student

5.1.1.8. Correlación de los datos de espectroscopía con la inmunohistoquímica

Para determinar cuál de los metabolitos analizados por ERM *in vivo* se correspondía mejor con los cambios analizados por inmunohistoquímica se procedió a la realización de la correlación de Pearson. Se incluyeron muestras de la zona de infarto y de las zonas contralaterales para el cálculo de los grupos control, 1 día, 6, 7 y 8 días.

Antes de proceder a la correlación se determinó la normalidad de los valores para determinar si existía algún valor extremo (*outliers*) que fuera muy distinto al resto de datos para evitar que afectara a la validez de la regresión. Al no haber ningún valor extremo se procedió al cálculo de la correlación de Pearson con todos los casos (n=42) (Tabla 13).

Los resultados de la correlación muestran que todos los metabolitos son biomarcadores potenciales de apoptosis celular ya que la mayoría muestran

correlaciones significativas a excepción de los LMap (2,80 ppm) que muestra únicamente tendencia.

Sin embargo es lógico que se muestren tantas correlaciones ya que la mayoría de cambios en la isquemia tienen lugar de forma fulminante en la fase aguda de la patología (minutos, horas). A 1 día post-isquemia, que es el punto temporal más precoz en que en este procedimiento experimental se cuantifica la apoptosis, los valores de células TUNEL+ son ya elevados con lo que la mayoría de correlaciones estarían de acuerdo con este fenómeno.

En cambio la señal de los LMap no aparece hasta etapas más avanzadas del infarto con lo cual no permitiría detectar los cambios en la etapa aguda a 1 día post-isquemia

Se puede detectar que las únicas señales que correlacionan positivamente con la apoptosis son las lipídicas (LMap, Lac+LM2 y LM1), mientras que el resto (TCho, TCr, NAA) tienen una correlación negativa.

Correlación de los datos de ERM <i>in vivo</i> con inmunohistoquímica en la zona ACM		
RESONANCIA	TUNEL+ (n=42)	
	Coefficiente de Pearson (r)	Significación (p < 0,05)
TCho(3,21 ppm)	- 0,53	< 0,01*
TCr(3,03 ppm)	-0,80	< 0,01*
LMap (2,80 ppm)	0,40	0,09 ~
NAA (2,02 ppm)	-0,82	< 0,01*
Lac+LM2 (1,30 ppm)	0,68	< 0,01 *
LM1 (0,90 ppm)	0,36	0,02 *

Tabla 13: Valores de correlación de Pearson (r) y sus valores de significación (p). Los VC con significación estadística se indican con el símbolo *(p≤0,05) y las que muestran tendencia a la significación con ~ (0,05<p<0,10).

5.1.1.9. Utilización de patrones de reconocimiento para análisis de patrones ERM *in vivo*

En este caso el uso de patrones de reconocimiento supervisado permitiría valorar cuáles eran las características (metabolitos) más relevantes a nivel matemático para la discriminación entre sí del tejido sano, del tejido infartado en fase aguda (1 día) y del tejido infartado en fase subaguda/crónica (6, 7, 8 días).

Los animales a 6, 7 y 8 días se unieron en un solo grupo para aumentar el número de casos del grupo y permitir una selección más robusta de las posibles características espectrales diferenciadoras. El clasificador desarrollado se muestra en la Figura 76.

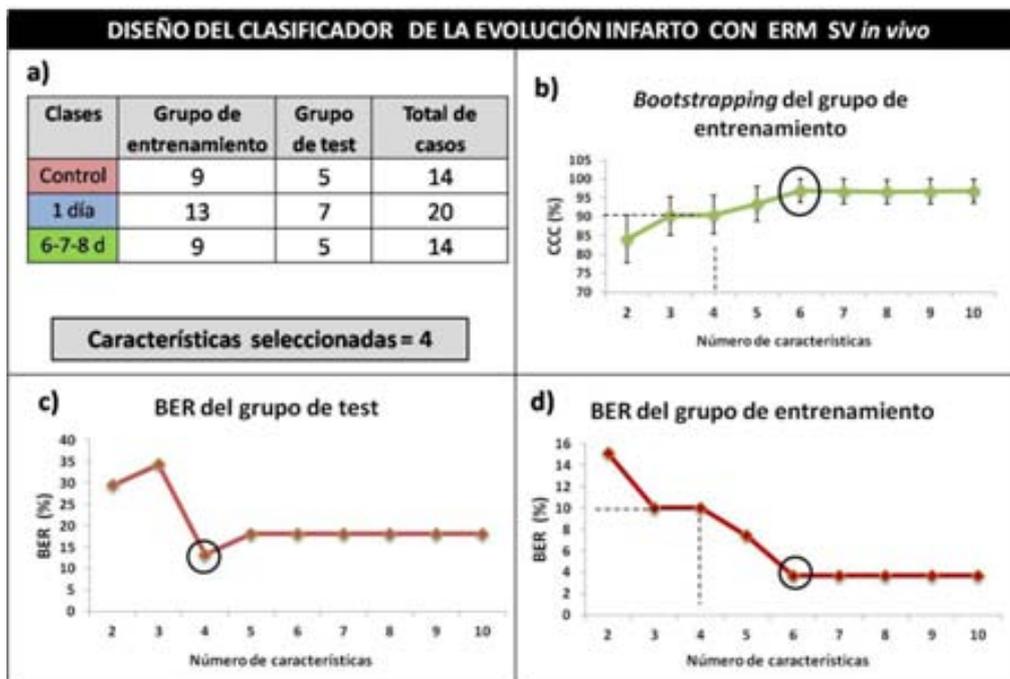


Figura 76: Clasificador desarrollado para el análisis de los cambios en el patrón ERM *in vivo* del infarto a distintos tiempos. **a)** En la tabla se muestra el número de casos incluidos en cada clase y su asignación a grupo de entrenamiento o test. El número de características seleccionadas se calcula en base al número que ofrece un mínimo BER en el grupo de test. **b)** El clasificador fue evaluado en sus características descriptivas utilizando *Bootstrapping* con 1000 repeticiones. En la gráfica se puede observar los casos correctamente asignados (CCC) \pm SD del grupo de entrenamiento. **c)** El clasificador fue evaluado en sus características predictivas utilizando el Balanced Error Rate (BER) del grupo de test. y d) BER del grupo de entrenamiento según el número de características seleccionadas. En las gráficas el círculo negro indica cual sería el número de características idóneo en cada caso y la línea discontinua indica el resultado según el número de características finalmente seleccionado en base al grupo de test.

Por lo tanto, teniendo en cuenta la evaluación de los casos correctamente clasificados y el BER de los casos de test el número óptimo de características para éste clasificador sería de 4. Las 4 características que el sistema determinó que eran las que mejor permitían la discriminación entre tejido sano (control), infartado en fase aguda (1 día) e infartado en fase crónica (6, 7, 8 días) fueron por orden de importancia las que se muestran en la Tabla 14 con sus correspondientes asignaciones tentativas.

Característica	Desplazamiento químico	Asignación tentativa de metabolitos
1	1,3350	Lactato + LM2
2	1,3415	Lactato + LM2
3	0,6870	LM1
4	3,0477	Creatina total

Tabla 14: Selección de las 3 características utilizadas para la generación del clasificador organizadas de la característica más a menos relevante con la correspondiente asignación tentativa que se les ha realizado según fuentes consultadas:(Martinez-Bisbal et al. 2004; Valverde-Saubi et al. 2010; Yang et al. 2012).

Este clasificador basado en las 4 características mencionadas presentó un porcentaje de acierto del clasificador del $90,62 \pm 5,19\%$ para los casos de entrenamiento y la evaluación con los casos de test independiente mostraron un promedio de errores en cada categoría (*BER*) de $13,3\%$. Si se analizan cada uno de los grupos por separado los casos de cerebro de tejido sano (entrenamiento + test) se clasifican bien en un 100% , distinguiéndolos del tejido infartado. En cambio en el tejido infartado la clasificación no es tan robusta: los casos de 1 día post-isquemia se clasifican bien en un $92,45 \pm 7,52\%$ y los casos de 6 a 8 días tienen la peor clasificación con $78,50 \pm 13,72\%$.

El clasificador de la Figura 77 permite ver la distribución de todos los casos (entrenamiento+ test) en el espacio latente bidimensional del clasificador LDA desarrollado por el sistema (un valor discriminante para cada eje 2D para un clasificador LDA de 3 clases).

A cada clase, según la etiqueta que se le haya asignado (control, 1 día, 6-7-8 días) le corresponde un color. La distribución en el espacio latente permite determinar cuáles son los casos que habiendo sido etiquetados en un grupo, el sistema por reconocimiento de patrones los asignaría a otro grupo, según aparezca en una zona del espacio latente que no le correspondería.

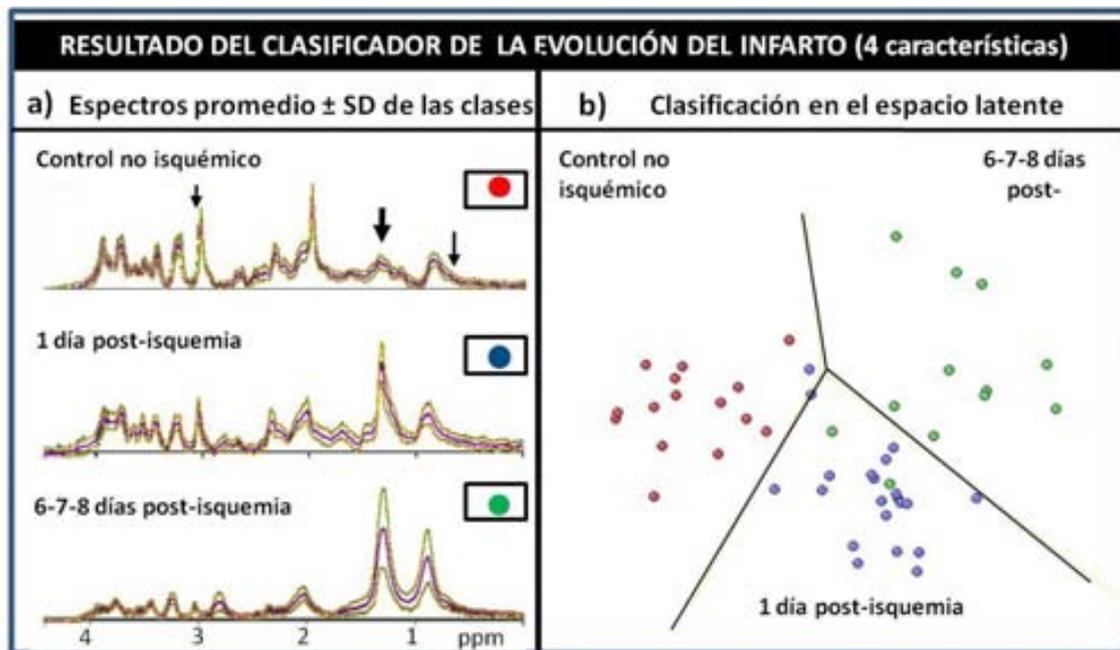


Figura 77 Representación de la clasificación realizada por el sistema SpectraClassifier. **a)** Espectros promedio (línea rosa) \pm SD (línea amarilla) para cada una de las clases generadas, **b)** Clasificación que hace el sistema de los casos de entrenamiento + test utilizados para análisis. Las bolas rojas corresponden a las que el investigador ha asignado a control no isquémico, las bolas azules a 1 día post-isquemia y las bolas verdes a 6,7,8 días post-isquemia. Las líneas divisorias indican las regiones frontera del plano que utiliza el sistema para clasificar cada uno de los casos. En formato de texto se especifica a qué grupo corresponde la posición en el espacio según el sistema.

5.1.1.9.1. *Uso de clasificadores basados en patrones no supervisados*

Como muestra de la capacidad predictiva de estos sistemas se ha creído interesante incluir una prueba de concepto que se realizó con un sistema basado en reconocimiento de patrones de forma no supervisada, que sería un posible futuro de este tipo de sistemas de reconocimiento (descrito en el apartado 1.6.5.5).

A continuación se muestra un ejemplo que se realizó en una rata con infarto de 7 días de evolución (OFA10). En este caso se trabajó con la técnica de ERM multivóxel que permite tener varios espectros simultáneos de un mismo animal y permite conservar una distribución espacial de estos.

La prueba se llevó a cabo para un mismo animal utilizando 2 fuentes y 5 fuentes. En la Figura 78 se puede observar como el sistema, utilizando 2 fuentes es capaz de reconocer la zona patológica con respecto a la de tejido sano con precisión, únicamente por su patrón espectral dominante, coincidiendo con la región anómala en la imagen ponderada en T_2 . En el clasificador de 5 fuentes, en cambio, el sistema es capaz de detectar 5 patrones distintos. Son de destacar las 2 últimas fuentes del clasificador (de arriba abajo) en base a 5 fuentes ya que muestran la zona anómala correspondiente al núcleo del infarto y otra zona claramente delimitada alrededor del infarto, donde el espectro es distinto, pudiéndose corresponder a una zona de penumbra o de actividad neuroreparativa externa. De todos modos, sería necesario trabajo futuro con correlación inmunohistoquímica para la asignación de los patrones a características concretas de las zonas así segmentadas.

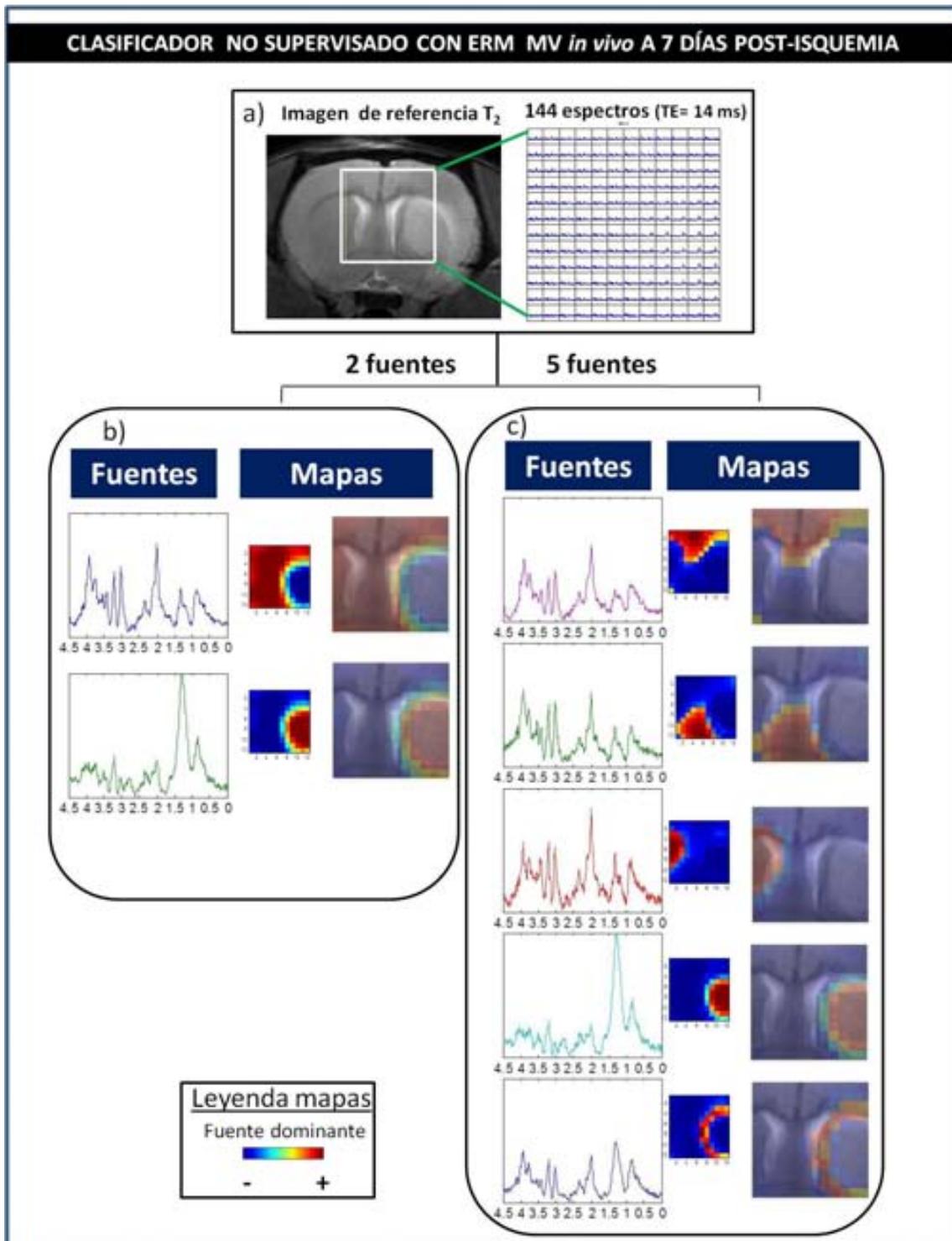


Figura 78: Sistema de reconocimiento de patrones no supervisado basado en un sistema de análisis de fuentes para un caso (OFA 10, 7 días post-infarto). **a)** Imagen ponderada en T₂ con el VOI para el multivoxel superpuesto (cuadrado blanco). A la derecha ampliación de la matriz multivoxel. **b)** Clasificador no supervisado en base a 2 fuente donde se pueden apreciar los mapas nosológicos para cada una de las fuentes- **c)** Clasificador no supervisado en base a 5 fuentes. Los mapas nosológicos muestran la distribución de cada una de las fuentes.

5.1.2. Discusión del análisis de la zona de infarto

El infarto cerebral ha sido estudiado extensamente en la literatura científica, especialmente desde el punto de vista de la imagen MRI (Weber et al. 2006). En nuestro caso, el análisis de la zona de infarto mediante MRI utilizando la imagen ponderada en T₂ en diversos puntos temporales permitió determinar que, de forma similar a lo descrito en la bibliografía (Tabla 3) con el mismo modelo experimental (inserción intraluminal del filamento con posterior reperusión en rata) y la misma duración de la oclusión (90 minutos), el modelo desarrollaba un infarto extenso, con afectación de la corteza y el estriado. El modelo también desarrolla edema que a nivel de IRM prácticamente desaparecía a los 6-8 días (Kang et al. 2012). También se utilizó datos de IRM como el volumen de infarto a 1 día post isquemia, coincidiendo con el máximo volumen de la lesión 24h-48h (Dittmar et al. 2003; Nagel et al. 2008) como criterio de inclusión de los animales al estudio.

El análisis de la zona de infarto por ERM con respecto a la señal obtenida en el hemisferio contralateral respondía básicamente a 2 objetivos: (1) Determinar que los cambios en los metabolitos que se detectaban se correspondían con los descritos en la literatura sobre el tema, y por lo tanto el modelo era válido para la evaluación adicional de cambios en las ZSVs y (2) Determinar de forma longitudinal cuáles eran los cambios en la etapa subaguda/crónica en la zona de infarto.

5.1.2.1. Cambios en el patrón metabólico en la etapa aguda del infarto

En la literatura referente a ERM *in vivo* de infarto es complicado comparar directamente resultados por varios motivos: (1) la cuantificación de los metabolitos es distinta según los trabajos, siendo analizados por alturas normalizadas a UL2, por alturas normalizadas respecto a la TCr, por áreas normalizadas respecto a TCr o por cuantificaciones absolutas utilizando *softwares* diseñados para ese fin y con hipótesis de trabajo diversas (ajuste de metabolitos, tiempos de relajación T₁ y T₂, referenciación a concentración de agua tisular, etc. (2) los modelos animales de infarto son también variables pueden ser en rata, ratón, con isquemia focal permanente o con reperusión

a distintos tiempos, (3) los protocolos diseñados para cada experimento de ERM pueden causar variabilidad debido a distintos TE, distintos campos magnéticos utilizados, etc.

Sin embargo, los cambios principales detectados mediante ERM en los metabolitos cerebrales (aumentos o disminuciones) debidos a la isquemia están bastante establecidos por trabajos realizados anteriormente por otros investigadores, como queda recopilado en distintas revisiones (Bonavita et al. 1999; Hoehn et al. 2001). Esencialmente, la magnitud del cambio es lo que varía entre los distintos modelos animales utilizados y los protocolos experimentales arriba mencionados.

Por lo tanto, y ya que el objetivo era verificar si los cambios observados de datos de infarto en nuestro modelo experimental seguían las tendencias descritas en la literatura, nos basamos para esta comparación en el artículo más reciente encontrado en la literatura al respecto, que es de Lei y colaboradores (Lei et al. 2009). En dicho trabajo, se analizan de forma exhaustiva los cambios en el patrón metabólico en las primeras 24 horas post-infarto (18 metabolitos en total) utilizando ERM *single voxel* en un modelo de ratón ICR-CD1 con oclusión de la ACM con reperusión a los 30 minutos. Este modelo corresponde a un infarto que únicamente afecta al territorio del estriado y no al córtex. A pesar de esta diferencia con nuestro modelo experimental, se consideró que el artículo era adecuado para indicar las variaciones en los metabolitos que pueden detectarse en un tamaño de infarto mayor. Dichos autores utilizaron tiempos de eco muy cortos ($TE=2,8$ ms) a un campo magnético elevado (14,1 T) y analizaron los cambios a nivel de concentraciones ($\mu\text{moles/g}$ tejido) mediante ajustes a distintas resonancias de metabolitos superpuestas en el patrón *in vivo* mediante el método LC model (Provencher 1993).

Los cambios detectados en el artículo de (Lei et al. 2009) para los metabolitos que hemos analizado en nuestros espectros muestran que los metabolitos que aumentan sus concentraciones en las primeras 24 horas son únicamente el Lac (1,30 ppm) mientras que disminuyen la TCho (3,21 ppm), TCr (3,03 ppm) y NAA (2,02 ppm). Estos cambios se corresponden con los observados en nuestro modelo experimental.

En dicho artículo, sin embargo, no cuantificaron las señales correspondientes a LM que afectan al patrón metabólico cuando se utilizan TE cortos. Estas resonancias de LM se determinan sobretodo en los estudios en tumores cerebrales (Shimizu et al. 1996; Kimura et al. 2001). El único estudio previo en isquemia que los cuantifica fue el de Harada y colaboradores (Harada et al. 2007) que en un modelo de rata con 45 minutos de oclusión y posterior reperusión determinaron que las señales lipídicas empezaban a aumentar a partir de las 6 horas en un experimento continuado hasta 7 días post-infarto.

A ese respecto, en los resultados *in vivo* a TE corto (TE=12 ms) la resonancia de Lac (1,33-1,35 ppm) no puede ser distinguible de la de los LM2 (1,28 ppm) sin un post-procesamiento de ajuste como el LC model, ya que se superponen bastante, especialmente a 7T. Una de las maneras de separar ambas señales es trabajar a tiempos de eco largo (TE=136 ms) para invertir la resonancia del Lac. Este protocolo se utilizó en nuestro caso *in vivo* (resultados no mostrados) pero se detectó que la calidad del espectro a tiempos de eco largo era muy inferior a la de tiempo de eco corto y en muchos casos no se obtenía un espectro con la SNR adecuada para un análisis posterior robusto. Como el tiempo experimental de adquisición de datos aumentaba significativamente realizando las secuencias a TE corto y a TE largo se prescindió de esta última y se caracterizó directamente la señal del lactato *ex vivo* utilizando la técnica de HRMAS, previo sacrificio de los animales con FMW, lo que permite determinar que los cambios atribuidos al lactato son propios del infarto y no debidos a la isquemia *post-mortem*.

En los animales analizados mediante las técnicas de ERM *in vivo* y HRMAS *ex vivo* esta resonancia de Lac+LM2(1,30 ppm) aumentaba de forma significativa a 1 día post-isquemia un factor de cambio de $2,54 \pm 0,65$ ($p < 0,01$) y en el caso del HRMAS a tiempos de eco largo (que no tienen contribución de la señal de lípidos móviles) el cambio únicamente atribuible al Lac (doblete 1,33-1,35 ppm) era de un factor de $5,83 \pm 0,75$ ($p < 0,01$).

Para determinar si los cambios en el Lac obtenidos en nuestro modelo experimental están en consonancia con los publicados se realizó una búsqueda

bibliográfica de resultados de otros grupos con ERM *in vivo*: Woo y colaboradores (Woo et al. 2010) en el mismo modelo animal de rata detectaron aumentos mediante ERM *in vivo* en el contenido de Lac+LM2 (1,30 ppm) en el cerebro hasta 3 días post-infarto y posteriormente éste desaparecía, a 1 día post-isquemia el cambio de la intensidad del cociente Lac+LM2/TCr entre el grupo control y el isquémico era del doble aproximadamente. En otro estudio de Van der Zijden y colaboradores (van der Zijden et al. 2008) en un modelo animal con 90 minutos de oclusión y posterior reperusión se estimó el cambio entre el H.contralateral y la zona infartada a las 24 horas en un incremento de 16,4 veces, calculado en concentraciones. El artículo antes mencionado Harada y colaboradores (Harada et al. 2007) en un modelo de rata con 45 minutos de oclusión, a pesar de no ofrecer datos sobre el cambio del valor de la señal de Lac entre control y 24 horas, sí menciona que la desaparición de la señal de Lactato ocurre a las 48 horas post-isquemia medido con TE largos (TE=563 ms).

Por lo tanto, el cambio detectado en nuestros resultados por ERM en la resonancia de Lac+LM2 *in vivo* es similar al descrito por Woo y colaboradores, probablemente porque la cuantificación de las señales (cocientes de intensidades respecto a TCr es más similar al que utilizamos nosotros). Otro hecho a tener en consideración es que los estudios *in vivo* proponen que la señal de Lac aumentado desaparece a los pocos días post-infarto (Harada et al. 2007) sustituyéndola por una señal de lípidos, sin embargo, los estudios realizados en esta tesis con HRMAS, que permiten una mejor SNR con el lactato aislado, determinan que la señal de lactato se mantiene aumentada al menos hasta los 7 días post-isquemia, contrariamente, a lo que está descrito en la literatura *in vivo*. Sin embargo, no podemos descartar otra posibilidad, que parte del lactato en el tejido infartado tuviera una movilidad restringida, por ejemplo, por asociación a macromoléculas, y que éste fuera visible únicamente mediante la adquisición de HRMAS. Efectos de tipo comparable se han observado para la resonancia trimetilamina de la PtdCho, de manera dependiente a la velocidad de giro HRMAS (Martin-Sitjar et al. 2012) o en el Lac plasmático (Bell et al. 1988).

Para el resto de metabolitos analizados a 1 día post-isquemia los resultados encontrados en la bibliografía concuerdan (en términos generales) con los cambios

observados en nuestro modelo experimental. Por ese motivo el modelo se considera validado para reproducir las condiciones que se dan en un infarto cerebral en otros aspectos de interés analítico.

Otro cambio importante que se produce en la fase aguda y que la metodología puesta a punto con el HRMAs post-FMW permite un mejor análisis con respecto a *in vivo* es en la zona de los compuestos que contienen colinas.

Los compuestos que contienen colina son necesarios para la síntesis y el reciclaje de PtdCho, un componente básico de las membranas celulares. En los espectros *in vivo* se detecta una disminución de la TCho (3,21 ppm) que ya es apreciable a 1 día post-isquemia y que ha sido asociada a los procesos de degradación de las membranas

Sin embargo, para poder detectar los distintos compuestos que contienen colina hay que utilizar herramientas que permitan una mayor resolución como puede ser el HRMAS. El HRMAS permite detectar los 4 componentes de la colina: Cho (3,19 ppm), PCho (3,20 ppm), GPCho (3,21 ppm) y la PtdCho (3,25 ppm).

En nuestros resultados *ex vivo* mediante HRMAS se puede determinar que a 1 día post-isquemia la disminución se debe básicamente a los componentes PCho (3,20 ppm) y GPCho (3,21 ppm). Los 2 compuestos de colina más abundantes en las células cuando no hay presencia de ischemia tal y como se puede apreciar en los (controles no isquémicos). La disminución de PCho que serían los componentes anabólicos de la síntesis de PtdCho de las membranas. Este cambio en las colinas es el mismo que está descrito en a las 24 horas en un análisis *ex vivo* a alta resolución mediante extracción (Yang et al. 2012). En cambio se muestra un aumento de la GPCho, que estaría relacionado con la hidrólisis de las membranas, probablemente mediada por el encima fosfolipasa A2 (PLA2) que es activado en condiciones de hipoxia. Un aumento en la GPC indica que los ácidos grasos están siendo liberados y que pueden ser convertidos a triacilgliceroles. (Delikatny et al. 2011)

5.1.2.2. Cambios en el patrón espectral en la etapa subaguda/crónica

El objetivo de determinar los cambios metabólicos que se producen en el infarto pasadas las primeras 24 horas post-isquemia era para encontrar biomarcadores que pudieran servir para evaluar la progresión de un infarto, una vez se han producido los cambios iniciales. De este modo el estudio debería emular la situación que se puede dar en la práctica clínica, cuando el infarto ya está establecido. Este estudio permitió determinar que las únicas señales que cambiaban pasada la etapa temprana del infarto eran las correspondientes al contenido lipídico del infarto detectables por ERM *in vivo*.

Así, el mayor cambio detectado entre la etapa aguda y la etapa subaguda/crónica se producía en la señal que aparece a 2,80 ppm y que en la literatura se ha asociado con PUFAs (como se desarrollará más adelante) aunque también se detectan cambios en los LM1 a 0,90 ppm que corresponde a los metilos de los ácidos grasos.

Hay que tener en cuenta que los PUFAs que originan la resonancia a 2,80 ppm también tienen señales en los metilos de 0,90 ppm y, normalmente, en los metilenos de 1,30 ppm con lo cual sería de esperar el aumento detectado, aunque en los metilenos no había cambio significativo probablemente porque *in vivo* su resonancia es difícil de diferenciar de la del lactato.

Cambios en el metabolismo lipídico determinados mediante el análisis de resonancias de LM en varias regiones del espectro han sido asociado a procesos de variación de la tasa de proliferación, de muerte, de apoptosis y de incorporación de lípidos del medio extracelular al interior celular (Barba et al. 2009) pero en el caso de la resonancia de 2,80 ppm solo a procesos de muerte (Hakumaki and Kauppinen 2000). Es por este motivo que esta resonancia se considera más adecuada como biomarcador de procesos apoptóticos que no otras resonancias lipídicas como pueden ser los LM1 (0,90 ppm).

Curiosamente, al revisar la literatura existente sobre la señal espectroscópica que aparece a 2,80 ppm han sido pocos los autores que han abordado el tema de los cambios lipídicos en el infarto cerebral:

El primer trabajo que analiza este tema es de Gasparovic y colaboradores (Gasparovic et al. 2001) que quisieron determinar el origen de las diversas señales lipídicas en un modelo animal de oclusión de la ACM permanente con un seguimiento de 1 a 5 días post-infarto. Para ello realizaron una extracción lipídica del cerebro de la zona de infarto y un análisis por cromatografía de gases en un subgrupo y en el otro una tinción con Nile Red (marcador de gotículas lipídicas). En su trabajo dichos autores atribuyeron la detección de lípidos en las preparaciones estudiadas a actividad de los macrófagos fagocíticos ya que determinaron que los lípidos contenidos en gotículas se encontraban en su interior y que las señales de lípidos neutros detectables por RMN (LM) en las preparaciones de tejido infartado estudiadas se relacionaban con las señales de los lípidos neutros y no con el de ácidos grasos libres de las muestras.

Harada y colaboradores (Harada et al. 2007) describieron un aumento de las señales lipídicas a 1,28 ppm haciendo un seguimiento por ERM *in vivo* hasta los 7 días post-isquemia en un modelo de rata con oclusión de la ACM de 45 minutos. Utilizaron además un protocolo de ERM *in vivo* a 7T (TE= 563 ms) para detectar los cambios del Lac y poderlo diferenciar de los LM a 1,28 ppm que corresponde a los metilenos de los ácidos grasos en lípidos neutros. Dichos autores detectaron que el acúmulo de Lac desaparecía a las 48 horas mientras que los LM a 1,28 ppm incrementaban desde las 6 horas y a lo largo de todo el periodo analizado, con una diferencia de 6 veces de aumento de la medición de las 6 horas con respecto a los 7 días. En este trabajo no determinaron la señal de 2,80 ppm a tiempos largos post-infarto. Atribuían las señales de los lípidos a gotículas que se detectaban intracelularmente en las primeras horas post-infarto y tanto intracelularmente como libres en el espacio extracelular a los 7 días post-isquemia. Asociaban dicha señal de LM a 1,28 ppm a procesos de fagocitosis de la membrana celular de células apoptóticas o necróticas por parte de los macrófagos. Esta hipótesis se basó también en trabajos anteriores (Brierley and Brown 1982; Gasparovic et al. 2001).

Van der Zijden y colaboradores (van der Zijden et al. 2008) determinaron la señal de los LMap en ratas Wistar machos con el mismo modelo de infarto de oclusión de la ACM que hemos utilizado en nuestros experimentos aunque ellos atribuyen la señal, en su caso a 2,70 ppm, a “macromoléculas”. También asocian a “macromoléculas” las señales de 0,8 y 1,3 ppm y citando a los anteriores trabajos mencionados (Gasparovic et al. 2001) lo asocian a degradación de productos de la membrana el interior de los macrófagos.

A nivel clínico un trabajo de Saunders y colaboradores (Saunders et al. 1997) realizado en pacientes con infarto a los que hacían un seguimiento durante 3 semanas permitió detectar en 1 de 6 pacientes la aparición de la señal de 2,80 ppm. En este estudio apuntan al posible origen de esta señal como proveniente del ácido araquidónico.

Kamada y colaboradores (Kamada et al. 2003) sin utilizar la RMN determinaron las gotículas lipídicas en un modelo tMCAO de rata con 90 minutos de oclusión. En dicho modelo mediante técnicas de inmunohistoquímica determinaron una serie de marcadores: Nile Red para determinar el contenido de lípidos neutros de las gotículas, tinción con filipin para determinar el colesterol libre, tinción con el anticuerpo anti-CD68, que es una glicoproteína presente en las membranas de los macrófagos y tinción contra la proteína asociada a microtúbulos-2 (MAP-2), que es un marcador específico de neuronas que se utiliza para determinar daño neuronal. Así, determinaron que el máximo de gotículas en el núcleo del infarto se daba a los 7 días, y posteriormente decrecían, mientras que en la zona de penumbra se mantenían en el tiempo. Concluían además que la forma de las gotículas era distinta entre el núcleo y la periferia y asociaban estos cambios con “procesos de regeneración y degeneración en la zona”. Atribuían a los macrófagos y en este caso, también, a los astrocitos un papel importante en la redistribución lipídica post-infarto. Estos autores también mencionaban un trabajo suyo anterior (Kitagawa et al. 1998) en el que determinaban la apoptosis (mediante tinción con TUNEL) que era mayoritario en el núcleo que en la periferia, aunque dichos autores no llegaron a asociar ambos procesos: apoptosis y acúmulo de gotículas conteniendo lípidos neutros.

Para determinar otros posibles trabajos donde se encontrara esta señal a 2,80 ppm, aunque no lo mencionaran explícitamente en el texto, se llevó a cabo una revisión de la literatura sobre ERM en infarto, pero no se encontraron más descripciones en este sentido. Las causas de este hecho pueden atribuirse a que: (1) la mayoría de estudios están centrados en la etapa aguda del infarto donde no aparece la señal de 2,80 ppm (Bizzi et al. 1996; Hesselbarth et al. 1998; Mlynarik et al. 2008; Lei et al. 2009; Berthet et al. 2011; Campos et al. 2011; Alf et al. 2012), (2) la localización o tamaño del infarto descrita en los artículos era distinta a un infarto de la arteria cerebral media que es el utilizado en nuestro caso. Si el infarto es menor puede tener efecto sobre el grado de apoptosis que se produce en la zona (Kang et al. 2000; van Zandvoort et al. 2005), (3) la utilización de tiempos de eco más largos del empleado en nuestro caso (TE=12 ms) sobretodo en ensayos clínicos donde el TE empleado es mayor por cuestiones instrumentales o por tener interés específico de trabajar a TE largo para separar el lactato y reducir las señales provenientes de LM o macromoléculas (Graham et al. 1995; Wardlaw et al. 1998; Federico et al. 1998), (4) no muestran imágenes de los espectros completos y no se puede determinar la presencia o ausencia de la resonancia a 2,80 ppm (Franke et al. 2000; Dreher et al. 2001; Ross et al. 2005; Munoz Maniega et al. 2008; Bar-Shir et al. 2010; Huang et al. 2010), (5) la SNR de los espectros no permite la diferenciación de las señales de resonancia del ruido de la línea de base en la región de interés (Igarashi et al. 2001; Kang et al. 2009), (7) estudiaban regiones externas a la zona del infarto (Glodzik-Sobanska et al. 2007).

Por lo tanto, en infarto, las señales de los LM han sido asociadas básicamente a actividad fagocítica. Para encontrar literatura referente a la asociación de la señal de los lípidos, especialmente 2,80 ppm, con procesos apoptóticos debemos referirnos principalmente a literatura sobre cáncer, especialmente acerca de glioblastoma.

El primer grupo en proponer una correlación entre el aumento de la detección de LM por ^1H -ERM y apoptosis fueron Blackenberg y colaboradores (Blankenberg et al. 1996) quienes detectaron un aumento de la señal de los metilenos a 1,30 ppm al inducir apoptosis en cultivo celular de células T.

Más adelante Delikatny y colaboradores (Delikatny et al. 2002) detectaron que en una línea celular de cáncer de mama (HBL-100) también se acumulan estos LM durante la necrosis. Además, el aumento de los lípidos saturados detectables por RMN, especialmente 0,9 ppm y 1,3 ppm se asociaron con procesos necróticos inducidos por agentes quimioterapéuticos.

Del mismo modo, Tugnoli y colaboradores (Tugnoli et al. 2001) detectaron un aumento de los LM a 1,30 ppm en tumores astrocíticos necróticos.

La primera referencia a la señal lipídica de 2,80 ppm aparece en Hakumaki y colaboradores (Hakumaki et al. 1999) en un estudio con un modelo de glioma transfectado con Timidina Kinasa (TK) del virus del herpes simple (HSV-TK) en rata tratada y no tratada mediante inyecciones intraperitoneales con ganciclovir que induce apoptosis. En este modelo de apoptosis detectaron un aumento de los LM, especialmente de los correspondientes a los PUFA (2,80 ppm y 5,40 ppm) y LM insaturados (5,40 ppm) (Figura 41). Dichos autores asociaron la aparición de los PUFA móviles a apoptosis ya que en los tumores iniciales, antes del tratamiento aún no presentaban signos de necrosis. Por microscopía electrónica detectaron las gotículas lipídicas clásicas que demostraron en éste y otros trabajos posteriores (Liimatainen et al. 2006; Liimatainen et al. 2008; Liimatainen et al. 2009), que se correspondían con gotículas de lípidos neutros, ricos en PUFAs esterificados en TAG.

Posteriormente, Griffin y colaboradores (Griffin et al. 2003) utilizaron HRMAS para caracterizar tanto *in vivo* como *ex vivo* esta señal a 2,80 ppm también en el modelo de glioma de células transformadas sensibles a ganciclovir sometido a apoptosis. Así, dichos autores determinaron que la señal de los PUFAs (2,80 ppm y 5,40 ppm) correspondía a fracciones de lípidos insaturados 18:1 y 18:2 presentes en gotículas lipídicas citosólicas. En su caso encontraron que estas señales son las que mejor correlacionan con apoptosis medida con TUNEL. En este trabajo también determinaron que la señal de lípidos móviles es visible aunque las células originales ya no estén presentes, es decir, donde queda la cicatriz debido a la apoptosis.

Zoula y colaboradores (Zoula et al. 2003) estudiaron un modelo de glioma por células C6 inyectadas en rata en una fase avanzada de la progresión tumoral, cuando

ya hay presencia de necrosis. En este caso también detectaron presencia de gotículas lipídicas en la zona necrótica. En cuanto al análisis mediante ERM *in vivo* no llevaron a cabo tinción para apoptosis y solo detectaron cambios en las señales lipídicas de 1,28 ppm.

Schmitz y colaboradores (Schmitz et al. 2005) también detectaron un aumento de los LMap a 2,80 ppm, después de 16–24 horas de tratamiento con etopósido en células de linfoma *in vivo* e *in vitro*. En este modelo se produce de forma concomitante apoptosis y necrosis medida por citometría de flujo.

Así mismo, en el trabajo de Opstad (Opstad et al. 2010) realizado con biopsias de glioblastomas y astrocitomas sugiere que el marcador de 2,80 ppm solo es válido para su correlación con apoptosis en el caso de que en las muestras no haya necrosis en los tumores ya que en presencia de ésta, la señal de 2,80 ppm correlaciona mejor con el porcentaje de necrosis. Sin embargo un trabajo anterior de Kuesel y colaboradores (Kuesel et al. 1994) con astrocitomas de alto grado, claramente necróticos, asociaban las señales debidas a la necrosis a los lípidos de 1,30 ppm y 0,90 ppm.

También se detectaron señales de LM a 2,80 ppm en músculo con quemaduras experimentales de ratones en un estudio realizado por Astrakas y colaboradores (Astrakas et al. 2005), en el cual la muerte celular se daba principalmente por apoptosis. Dicho estudio combinaba resonancia *in vivo*, *ex vivo*, histopatología y análisis genómico y detectó una regulación de los genes apoptóticos y desregulación de la oxidación lipídica y asociaron el aumento de las señales de 2,80 y 5,40 a estos procesos.

En resumen, los LMap a 2,80 ppm, se asocian a procesos de muerte neuronal, aunque su asignación a procesos exclusivamente apoptóticos o también necróticos no queda definida claramente ya que en los casos en que se ha atribuido a apoptosis eran en tumores que no presentaban signos de necrosis y esta diferenciación en el infarto no es fácil de llevar a cabo ya que ambos procesos tienen lugar.

En nuestro caso ya que la señal de 2,80 ppm aparece en fases tardías del infarto, de 6 a 8 días post-isquemia y no en la fase aguda se consideró que la correlación inmunohistoquímica más adecuada era para determinar apoptosis, ya que se considera que la necrosis es el tipo de muerte abundante durante la fase isquémica aguda que es cuando hay déficit energético extremo. En cambio el tipo de muerte secundaria más abundante una vez restituido el flujo sanguíneo en el modelo animal es la apoptosis, que es dependiente de energía (Ferrer 2006). Los resultados de inmunohistoquímica obtenidos en nuestras muestras indican que la apoptosis a 1 día post-isquemia ya era elevada (a los mismos niveles a los que se encontraría luego a los 7 días post-isquemia) con la diferencia que a nivel del espectro la señal de 2,80 ppm no está presente en la zona de infarto a 1 día pero sí a los 7 días. Por lo tanto, nuestros resultados, siguiendo la línea argumental planteada por Griffin y colaboradores (Griffin et al. 2003) parecería indicar que a 7 días post-isquemia se detecta una señal intensa a 2,80 ppm ya que hay una apoptosis acumulada de toda la fase anterior. Esas gotículas se mantendrían en el tejido incluso una vez que el detritus celular hubiera sido extraído de la zona, ya sea asociado a la matriz extracelular o dentro de los macrófagos atraídos a la zona de infarto.

A pesar de que esta señal a 2,80 ppm es la que muestra los mayores cambios en la evolución del infarto tanto en ERM *in vivo* como por HRMAS *ex vivo*, en el caso de la correlación inmunohistoquímica con las células TUNEL+ no fue posible esta correlación directa con la señal de apoptosis, ya que a 1 día el marcaje con TUNEL era elevado. Tampoco el uso de patrones de reconocimiento seleccionó la característica de la señal a 2,80 ppm como diferencial entre los 3 grupos comparados (tejido sano, infarto 1 día post-isquemia y 6-8 días post isquemia) probablemente por el mismo motivo que no era válido para diferenciar los grupos tejido sano y tejido a 1 día post-isquemia, donde aún no era detectable la señal a 2,80 ppm. Aunque el sistema sí utilizó para determinar la clasificación otras señales lipídicas como la de Lac+LM2 (1,30 ppm) y LM1 junto con la TCr (3,03 ppm)

En el análisis por reconocimiento de patrones no supervisado del caso analizado por mutivóxel, en cambio, se puede observar como la señal a 2,80 ppm es

reconocida por el sistema e incluida en la “fuente” que determina el patrón característico de la zona del infarto a 7 días post-isquemia (Figura 78b).

A pesar de ello, falta aún una caracterización más precisa en el campo del infarto cerebral del origen de esta señal debida a los PUFAs a 2,80 ppm. Dicha señal se puede detectar tanto en los análisis *in vivo* como *ex vivo* a TE cortos y podría considerarse un biomarcador no invasivo adecuado para la determinación de la “muerte acumulada” especialmente la apoptótica, en la zona de infarto en etapas tardías. Así, podría ser útil para llevar a cabo estudios sobre pronóstico o validación de terapias antiapoptóticas.

5.2. Análisis de las zonas subventriculares

5.2.1. Caracterización de los cambios inmunohistoquímicos en las zonas subventriculares

Para proceder al análisis de los cambios en ERM en las ZSV se muestran primero los resultados obtenidos por inmunohistoquímica para determinar la proliferación y la apoptosis en las ZSVs. Esto es debido a que actualmente es el sistema *gold standard* para determinar si dichos cambios se corresponden o no según lo esperado en la literatura previa (Tabla 3)

En la Figura 79 y la Tabla 15 se muestran los resultados para el marcaje de proliferación celular mediante Ki67+. En los animales del grupo control y 1 día post-isquemia no se hallaron diferencias significativas entre la ZSVc y la ZSVi, tal y como era de esperar. Alrededor de los 7 días post-isquemia (donde en la literatura se describe un máximo de proliferación) se halla una tendencia al aumento de la proliferación a los 6 días post-isquemia de $1,38 \pm 0,09$ veces ($p=0,07$) y un aumento estadísticamente significativo a los 7 días post-isquemia de $1,41 \pm 0,08$ veces ($p=0,03$). A los 8 días post-isquemia a pesar de que el cociente ZSVi-ZSVc es similar al de los 6 o 7 días ($1,33 \pm 0,26$ veces) ($p=0,36$) el cambio no es significativo debido a una mayor SD de los valores de la ZSVi.

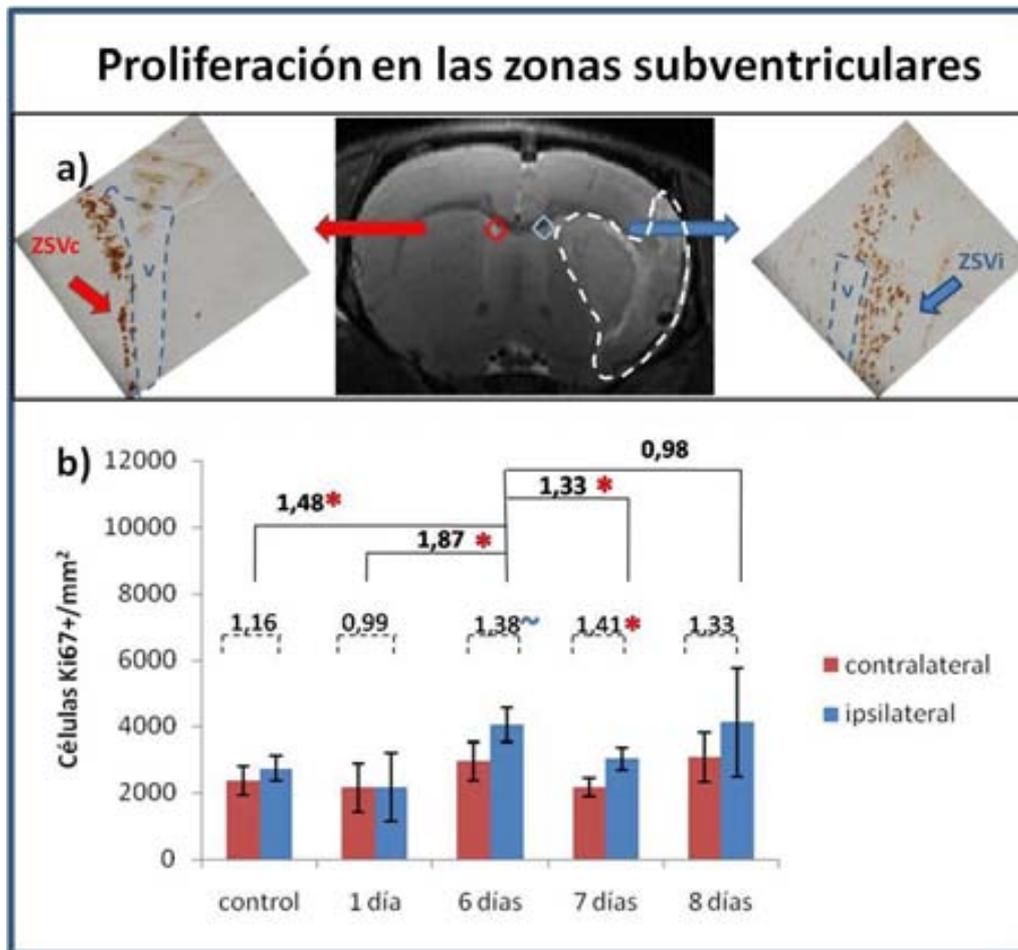


Figura 79: Análisis inmunohistoquímico de la proliferación de las CPNs en las zonas subventriculares (ZSVs) **a)** Conjunto de imágenes de la tinción inmunohistoquímica con Ki67 (células marcadas en marrón) en la ZSVi (imagen derecha) y la ZSVc (imagen izquierda). La imagen central corresponde a una imagen ponderada en T₂ de una rata a 7 días post-isquemia. Los cuadrados azul y rojo indican la posición de la muestra analizada, **b)** Gráficas promedio \pm SD para el marcaje de proliferación en las ZSVi (barra azul) y la ZSVc (barra roja) para los distintos grupos experimentales. Cada valor promedio corresponde a n=3. Sobre las líneas horizontales discontinuas se indican los VC entre la ZSVi y la ZSVc. Sobre las líneas horizontales continuas los VCT entre la ZSVi a 6 días post-isquemia y el resto de ZSVi de los otros grupos. Los cambios con significación estadística se indican con el símbolo * ($p \leq 0,05$) y los que tienen tendencia a la significación con el símbolo \sim ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado para los valores de VC: T de Student, test estadístico aplicado para los valores de VCT: ANOVA. Abreviaturas: v= ventrículo lateral (delimitado por una línea discontinua azul), ZSVi = Zona subventricular ipsilateral, ZSVc= Zonas Subventricular contralateral

Proliferación en las ZSVs (Células Ki67+/mm ²)				
Grupos	ZSVc (Promedio ± SD)	ZSVi (Promedio ± SD)	VC de la ZSVi-ZSVc (Promedio ± SD)	Significación (p < 0,05)
Control	2360,78 ± 447,38	2731,05 ± 385,49	1,16 ± 0,06	0,34
1 día	2149,76 ± 750,94	2162,57 ± 1047,89	0,99 ± 0,21	0,99
6 días	2945,79 ± 576,70	4046,60 ± 526,39	1,38 ± 0,09	0,07 ~
7 días	2157,69 ± 276,53	3036,85 ± 340,92	1,41 ± 0,08	0,03 *
8 días	3066,77 ± 727,33	4131,84 ± 1641,53	1,33 ± 0,26	0,36

Tabla 15: Valores de proliferación promedios ± SD del recuento de CPNs por inmunohistoquímica (Ki67+/mm²) en la ZSVc y la ZSVi para cada grupo. Análisis de los VC entre ambas regiones. Cada valor promedio corresponde a n=3. Los VC con significación estadística se indican con el símbolo * (p≤0,05) y los que tienen tendencia a la significación con ~ (0,05<p<0,10).. Test estadístico aplicado: T de Student

Un factor a tener en consideración a la hora de analizar la producción final de células con capacidad de migración de la ZSV a la región de infarto es también la apoptosis que se produce en estos nichos de células en proliferación.

La determinación de la apoptosis se llevó a cabo mediante tinción con TUNEL. En la Figura 80 se puede apreciar como en animales sanos la apoptosis es mayor en las ZSVs que en zonas adyacentes correspondientes al estriado de ambos hemisferios aunque no se llegue a significación debido a una elevada SD en las ZSVs. El cambio en ambas zonas entre el estriado y la ZSV correspondiente es de 65,59 ± 47,46 (p=0,07) en el hemisferio izquierdo y 67,93 ± 43,82. (p=0,08).

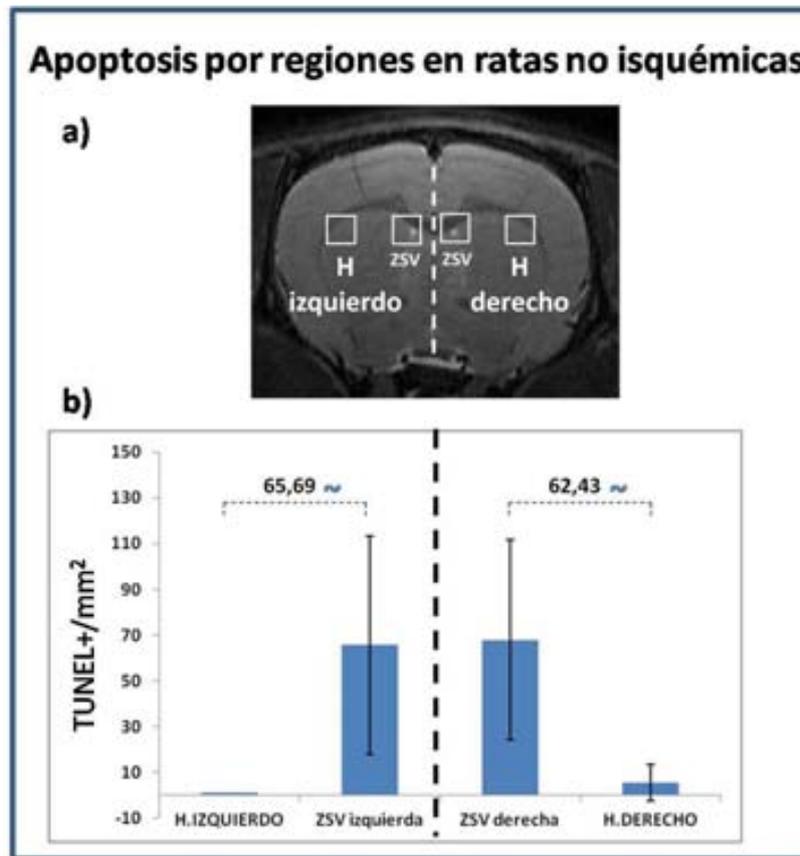


Figura 80: Análisis inmunohistoquímico de la apoptosis basal (en rata sana) en las ZSVs y en el territorio de la ACM **a)** Imagen ponderada en T₂ de una rata sana. Los cuadrados blancos indican la posición de las muestras analizadas, **b)** Gráficas promedio \pm SD para del recuento de células apoptóticas (TUNEL+/mm²). Cada valor promedio corresponde a n=3 (correspondientes a datos del grupo control no isquémico). Sobre las líneas horizontales discontinuas se indican los VC que se calculan para cada hemisferio entre la ZSV y su respectiva zona de la ACM. Los cambios con tendencia a la significación se indican con el símbolo \sim ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado: T de Student,.

En el caso de los animales con infarto (Figura 81y Tabla 16) el análisis de la apoptosis para los grupos experimentales mostró aumentos del recuento de células TUNEL+/mm² en los días 6 y 8, que son aquellos en los que la proliferación también era más elevada (Figura 79).

Únicamente en el grupo de 6 días post-isquemia hay un cambio significativo entre la ZSVi y la ZSVc. Analizando el factor de cambio, este es muy superior ($54,33 \pm 88,90$) al de los grupos de 7 ($1,73 \pm 1,58$) y 8 días ($0,50 \pm 0,42$).

La SD tan elevada indica que en todos los cocientes entre ZSVi y ZSVc, que se calcula para cada animal, hay mucha variabilidad entre los animales de un mismo

grupo. Concretamente el elevado cociente en el grupo de 6 días (n=3) es debido a que había 2 casos en los que no se detectó ninguna célula apoptótica en la ZSVc, y se le asignó el valor de 1 para poder realizar el cálculo del valor de cambio. El resultado es un cociente muy elevado. En los grupos de 6 y 7 días, donde la apoptosis es más elevada, similar a los determinados en los controles (Figura 80), el cociente es inferior.

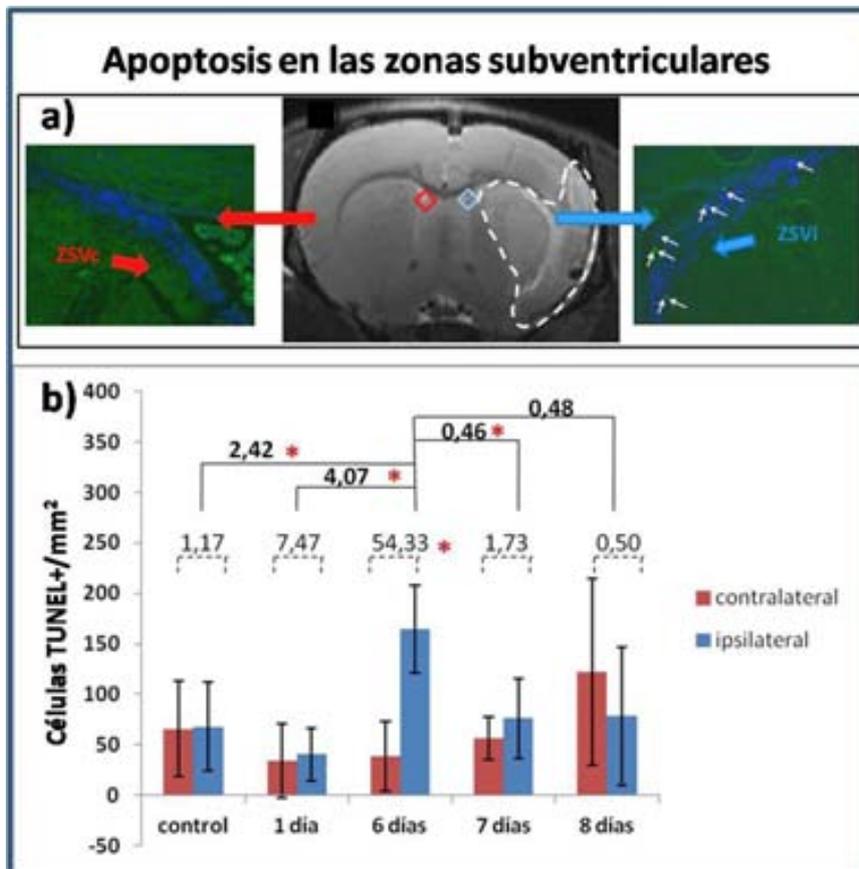


Figura 81: Análisis inmunohistoquímico de la apoptosis en las ZSVs **a)** Conjunto de imágenes de la tinción inmunohistoquímica con TUNEL (células verdes más brillantes, indicadas con una flecha blanca) en las ZSVs. La tinción con DAPI (azul) permite ver todos los núcleos de las células de la muestra. La imagen central corresponde a una imagen ponderada en T₂ de una rata a 7 días post-isquemia. Los cuadrados azul y rojo indican la posición de la muestra analizada y la línea blanca discontinua delimita la región del infarto **b)** Gráficas promedio \pm SD para el marcaje de apoptosis en la ZSVi (barra azul) y la ZSVc (barra roja) para los distintos grupos experimentales. Cada valor promedio corresponde a n=3. Sobre las barras horizontales discontinuas se indican los VC entre la ZSVi y la ZSVc. Sobre las líneas horizontales continuas se muestran los VCT de la ZSVi a 6 días post-isquemia respecto a las ZSVi del resto de grupos. Los cambios con significación estadística se indican con el símbolo * ($p \leq 0,05$). Test estadístico aplicado para los valores de VC: T de Student, test estadístico aplicado para los valores de VCT: ANOVA.

Apoptosis en las ZSVs (TUNEL +/mm ²)				
GRUPO	ZSVc (Promedio ± SD)	ZSVi (Promedio ± SD)	VC de ZSVi-ZSVc (Promedio ± SD)	Significación (p < 0,05)
Control	65,59 ± 47,56	67,93 ± 43,82	1,17 ± 0,92	0,95
1 día	34,20 ± 36,30	40,37 ± 25,76	7,47 ± 11,21 #	0,83
6 días	38,64 ± 34,40	164,47 ± 43,77	54,30 ± 88,90 #	0,02 *
7 días	56,18 ± 21,24	76,06 ± 39,95	1,73 ± 1,58	0,49
8 días	121,96 ± 92,22	78,18 ± 69,04	0,50 ± 0,42 #	0,55

Tabla 16: Valores de apoptosis promedios ± SD de las ZSVs por inmunohistoquímica (TUNEL+/mm²) en la ZSVc y la ZSVi para cada grupo. Análisis de los VC entre ambas regiones. . El símbolo # indica que para el cálculo de los VC los valores correspondientes a 0 se han convertido arbitrariamente a 1 para poder realizar el cociente. Cada valor promedio corresponde a n=3. Los VC con significación estadística se indican con el símbolo *(p<0,05). Test estadístico aplicado: T de Student

5.2.2. Caracterización de los cambios espectroscópicos en las zonas subventriculares

5.2.2.1. Análisis del patrón espectral de la ZSV en el análisis de referencia (1 día post-isquemia)

Según los criterios de inclusión determinados en el apartado 4.5.1, todos los animales seleccionados para el estudio tuvieron un análisis espectroscópico en el punto de referencia a 1 día de la zona de infarto para determinar si eran aptos para el estudio.

Durante la misma exploración de RM también se analizó por ERM las ZSVs (Figura 82) para determinar si el patrón metabólico basal era similar en todos los animales y determinar posibles diferencias en el punto de referencia entre los grupos

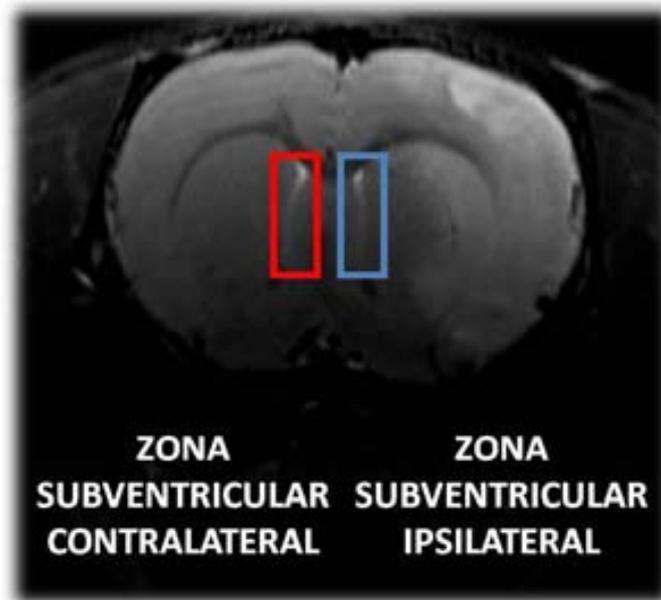


Figura 82: Imagen ponderada en T₂ con los vóxeles de análisis de la ZSVi (azul) y la ZSVc (en rojo) que se utilizaron para determinar el patrón espectroscópico de las ZSVs.

Los resultados de la exploración en el punto de referencia (a 1 día post-isquemia) se muestran en la Figura 83. En ésta se puede determinar que en el grupo de 7 días post-isquemia, el patrón espectroscópico en el punto intermedio de 1 día es distinto al del resto de grupos. Concretamente, en la ZSVi se puede observar que hay un incremento significativo de la resonancia de Lac+ LM2 (1,30 ppm) en el grupo de 7 días respecto a los grupos de 1 día post-isquemia (cociente 7 días/1 día = 1,85; $p < 0,01$) y una tendencia a 6 días post-isquemia (cociente 7 días/ 6 días) = 1,51; $p = 0,06$). Además también presenta un valor de cambio significativo de $1,87 \pm 0,33$ ($p < 0,01$) respecto a la ZSVc.

El resto de metabolitos analizados a 1 día post isquemia que son los que aparecen referenciados en la Figura 83, no mostraban diferencias significativas entre los grupos.

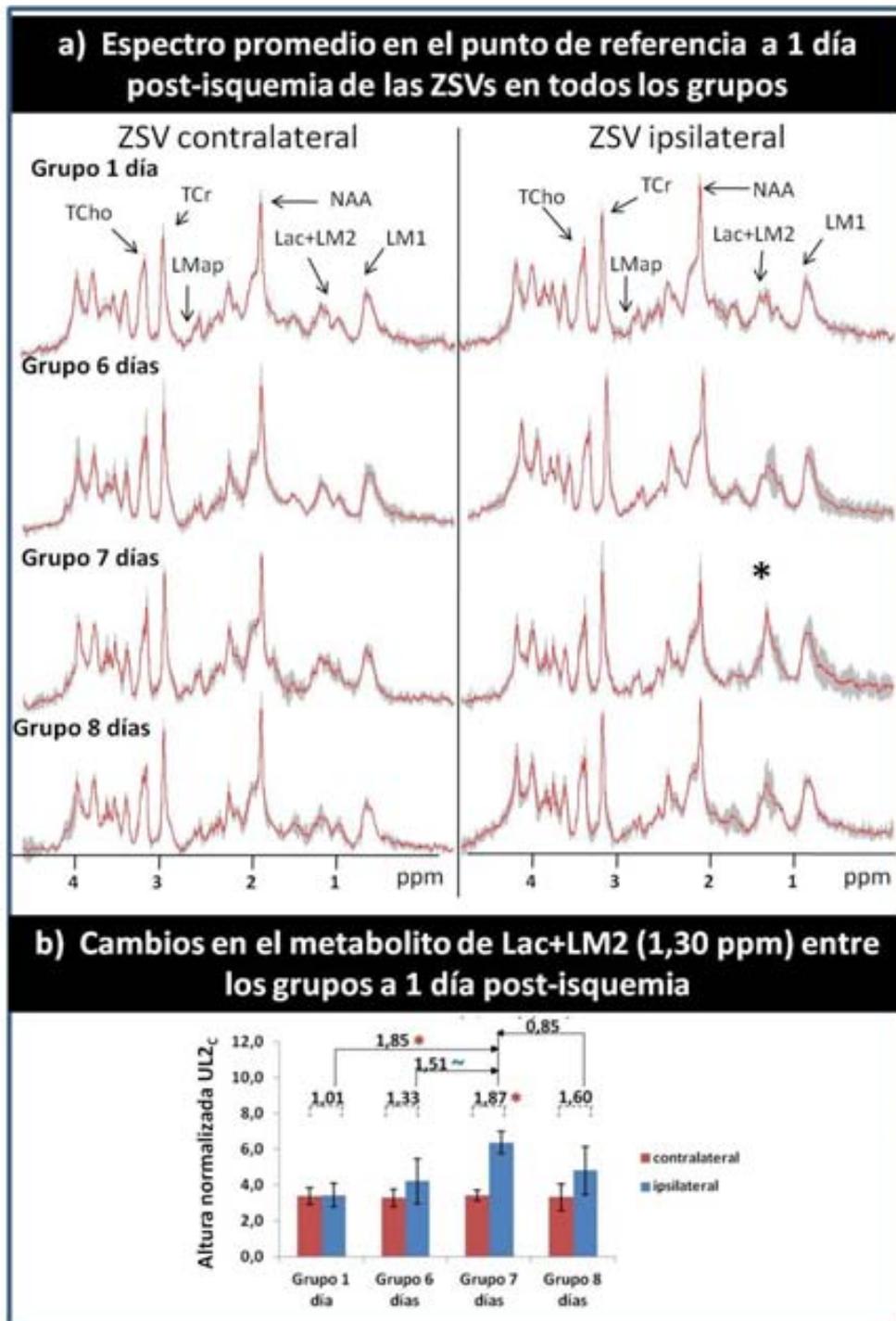


Figura 83: Análisis de la estabilidad del patrón metabólico de ERM *in vivo* a 1 día post-isquemia en las ZSVs **a)** Espectros promedio (rojo) \pm SD (sombreado en gris) de los grupos de 1,6,7,8 días en el punto de referencia de 1 día post-isquemia. **b)** Gráfica comparativa de la altura normalizada (UL2_c) del metabolito de Lac+LM2 (1,30 ppm) entre los distintos grupos. Cada valor promedio corresponde a $n=3$. Sobre las barras horizontales discontinuas se indican los VC entre la ZSVi y la ZSVc. Sobre las líneas horizontales continuas se muestran los VCT de la ZSVi a 6 días post-isquemia respecto a las ZSVi del resto de grupos. Los cambios con significación estadística se indican con el símbolo * ($p \leq 0,05$). Test estadístico aplicado para los valores de VC: T de Student, test estadístico aplicado para los valores de VCT: ANOVA

5.2.2.2. Análisis del patrón espectral de la ZSVs en los días de punto final

En los animales que cumplieron los requisitos de inclusión para el estudio (ver apartado 4.5.1) se analizó el patrón espectroscópico de las ZSVs en los días de punto final de cada grupo: controles no isquémicos, 1, 6, 7 y 8 días post-isquemia.

Los resultados se muestran en los espectros promedio de la Figura 84 y numéricamente en la Figura 85 y Tabla 17 resultado de la comparación del valor de cambio entre la ZSVi y la ZSVc fue que no se detectó ningún cambio significativo en ninguno de los grupos entre ambas ZSVs.

Sin embargo, al comparar entre distintos días sí que se puede ver en la Figura 85 cómo se producen algunos cambios tanto en la ZSVc como en la ZSVi en el tiempo. Los cambios se producen en el metabolito de TCho (3,21 ppm) en la ZSVi donde se detectó una disminución significativa a un 0,77 ($p=0,04$) entre el grupo control y el de 7 días post-isquemia y en la ZSVc que aunque no llega a significación estadística se detecta un incremento entre el control y 6 días post-isquemia ($p=0,09$).

Otro metabolito para el que se puede apreciar una variación, aunque no significativa, es en el Lac+LM2 (1,30 ppm) que se encuentra incrementado en el grupo de 7 días post-isquemia respecto al de 6 días. El cociente de 7 días/6días de 1,52 y 1,36 para la ZSVc y la ZSVi respectivamente.

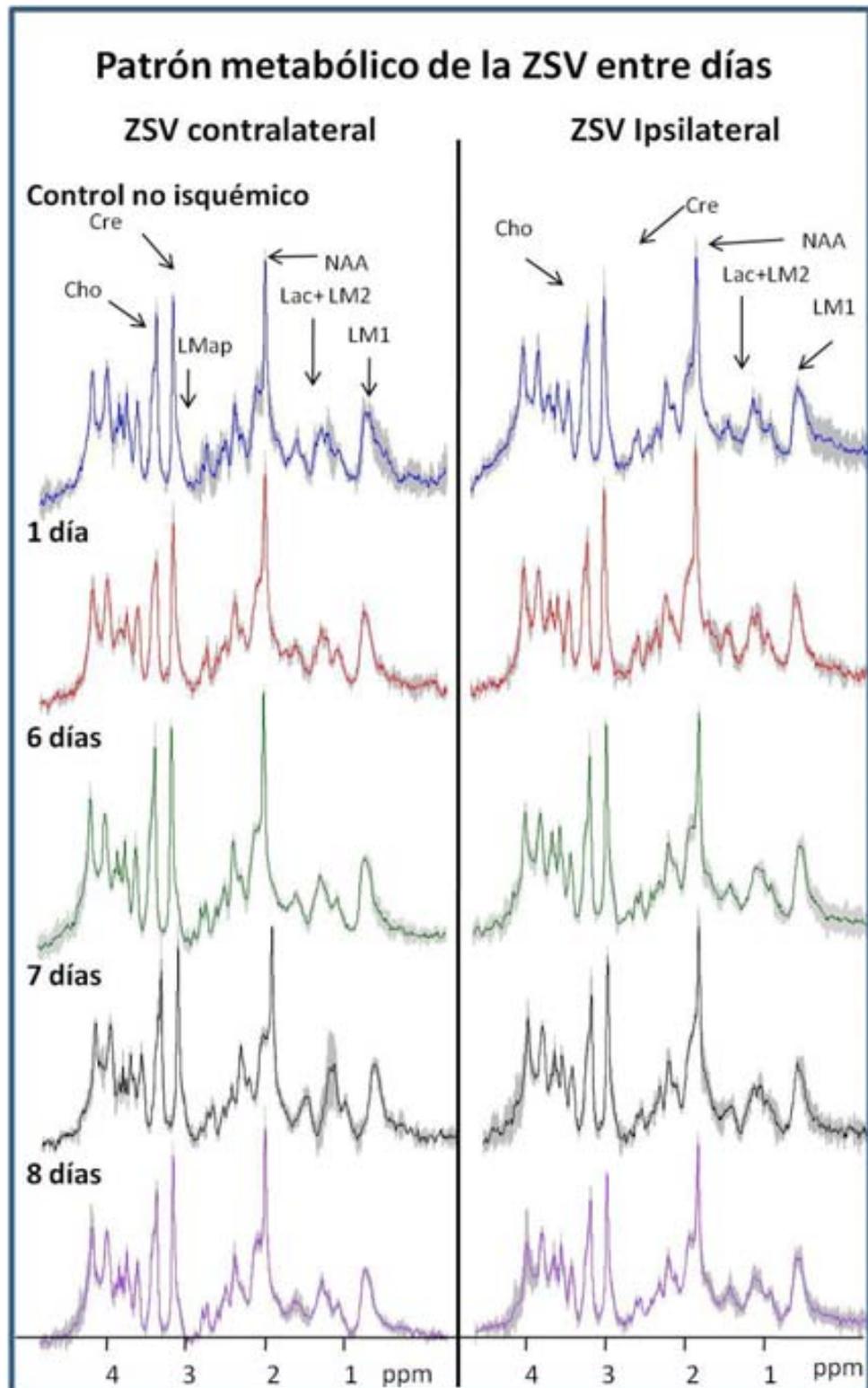


Figura 84: Espectros promedio \pm SD (sombreado en gris) de ERM *in vivo* de las ZSVs para cada grupo experimental normalizados a UL2c: control no isquémico (azul), 1 día (rojo), 6 días (verde), 7 días (negro) y 8 días (lila) post-isquemia. Cada espectro promedio corresponde a n=3. (ver

Tabla 2 para las asignaciones de las abreviaturas). En este caso no se han detectado cambios significativos entre ambas zonas al aplicar el test estadístico T de Student.

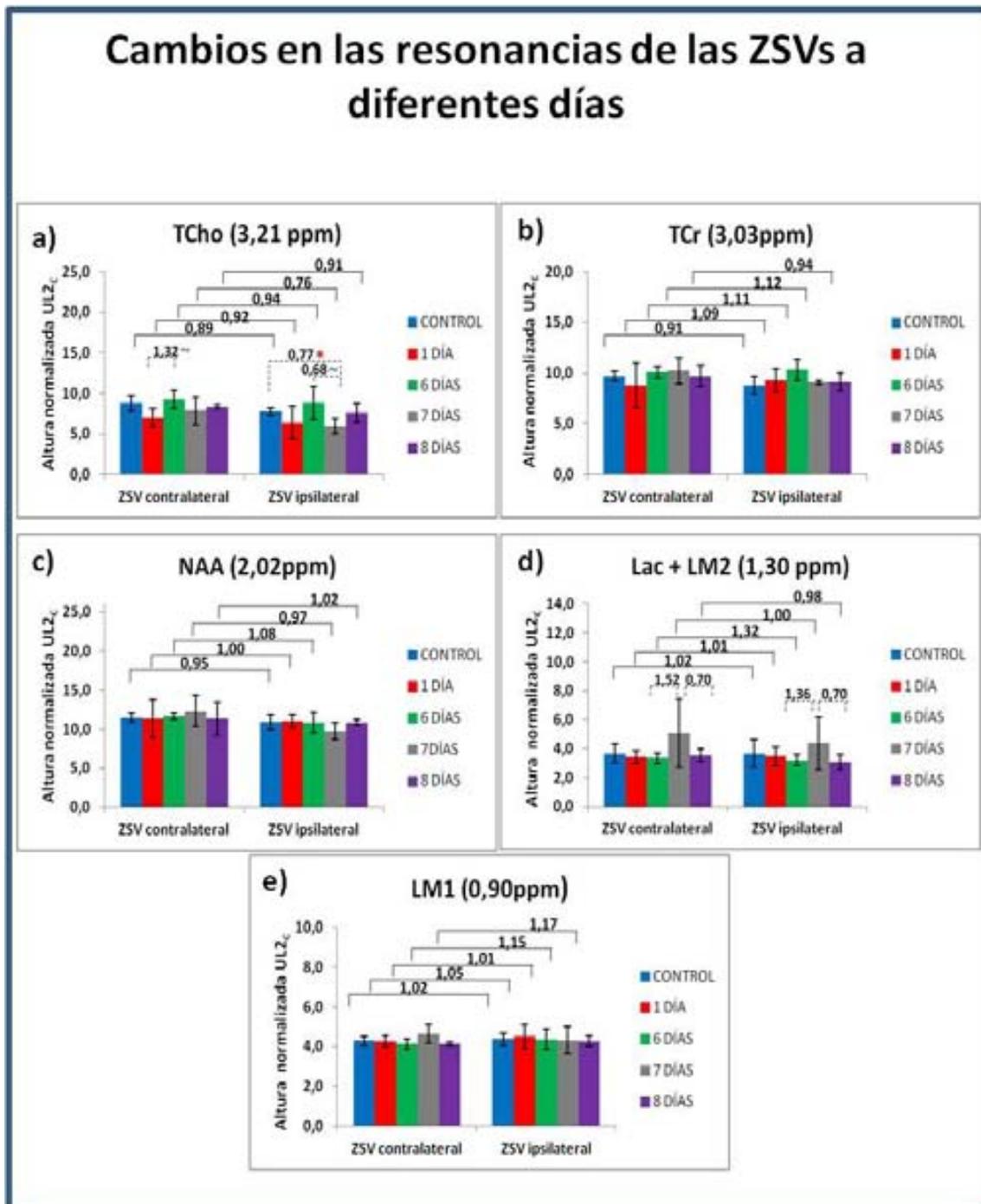


Figura 85: Gráficas promedio \pm SD de las alturas normalizadas a $UL2_c$ de las resonancias de ERM *in vivo* de las ZSVs para cada grupo experimental (control, 1 día, 6 días, 7 días y 8 días post-isquemia). Cada valor promedio corresponde a $n=3$. Sobre las líneas horizontales continuas se indican los VC entre la ZSVi y el ZSVc. Sobre las líneas horizontales discontinuas se indican los VCT entre distintos grupos. Los cambios con significación estadística se indican con el símbolo * ($p \leq 0,05$) y si tienen tendencia a la significación con el símbolo \sim ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado para VC: T de Student. Test estadístico aplicado para VCT: ANOVA.

Valores de cambio entre la ZSVc y la ZSVi							
RESO..	GRUPO	VC (promedio±SD)	Sig.	RESO.	GRUPO	VC (promedio±SD)	Sig.
TCho (3,21 ppm)	Control	0,89 ± 0,10	0,17	Lac+ LM2 (1,30 ppm)	Control	1,02 ± 0,32	1,00
	1 días	0,92 ± 0,07	0,58		1 días	1,01 ± 0,10	0,84
	6 días	0,94 ± 0,12	0,75		6 días	0,97 ± 0,17	0,71
	7 días	0,76 ± 0,06	0,16		7 días	0,99 ± 0,59	0,71
	8 días	0,91 ± 0,13	0,31		8 días	0,86 ± 0,07	0,28
TCr (3,03 ppm)	Control	0,91 ± 0,13	0,21	LM1 (0,90 ppm)	Control	1,02 ± 0,04	0,73
	1 días	1,09 ± 0,20	0,58		1 días	1,05 ± 0,07	0,91
	6 días	1,02 ± 0,10	0,76		6 días	1,06 ± 0,15	0,52
	7 días	0,89 ± 0,10	0,20		7 días	0,93 ± 0,06	0,53
	8 días	0,95 ± 0,18	0,50		8 días	1,04 ± 0,05	0,41
NAA (2,02 ppm)	Control	0,95 ± 0,10	0,45				
	1 días	1,00 ± 0,17	0,92				
	6 días	0,93 ± 0,13	0,39				
	7 días	0,79 ± 0,09	0,12				
	8 días	0,97 ± 0,17	0,69				

Tabla 17: VC promedio ± SD entre ZSVi y ZSVc obtenido a partir de las alturas normalizadas a UL_{2c} de las principales resonancias analizadas para cada grupo. Cada valor promedio corresponde a $n=3$. En este caso no se han detectado cambios significativos entre ambas zonas al aplicar el test estadístico T de Student.

5.2.2.3. Análisis del patrón espectral comparando referencia a 1 día y punto final para cada animal

Otro análisis que se realizó fue determinar la evolución de los metabolitos temporalmente entre la referencia a 1 día y el punto final para cada animal que tenía 2 exploraciones consecutivas, es decir, los animales de 6,7 y 8 días post-isquemia (Figura 86). El objetivo de este análisis fue determinar los cambios intrasujeto para intentar

disminuir la variabilidad experimental. Para enfatizar esta relación temporal, ya que se trataba de muestras en un mismo animal y en una misma zona, para la estadística se empleó el t de Student pareado. De este modo también se ajustaba cada punto final según su valor de inicio, especialmente en el caso del grupo a 7 días post-isquemia que a 1 día post-isquemia ya partía de unos niveles más elevados de Lac+LM2 (1,30 ppm) en la ZSVi.

Sin embargo, tampoco se encontraron cambios espectroscópicos estadísticamente significativos entre la referencia a 1 día post isquemia y el punto final (Figura 87 y Tabla 18) sí se detectaron tendencias a la significación en el caso de la TCho (3,21 ppm) un aumento en la ZSVc en el grupo de 8 días de $1,15 \pm 0,08$ ($p=0,08$) y en la ZSVi en el grupo de 6 días post-isquemia $1,34 \pm 0,13$ ($p=0,08$). También en el grupo de 8 días se detectó una disminución en la ZSVc de la TCr (3,03 ppm) a $0,94 \pm 0,03$ ($p=0,08$).

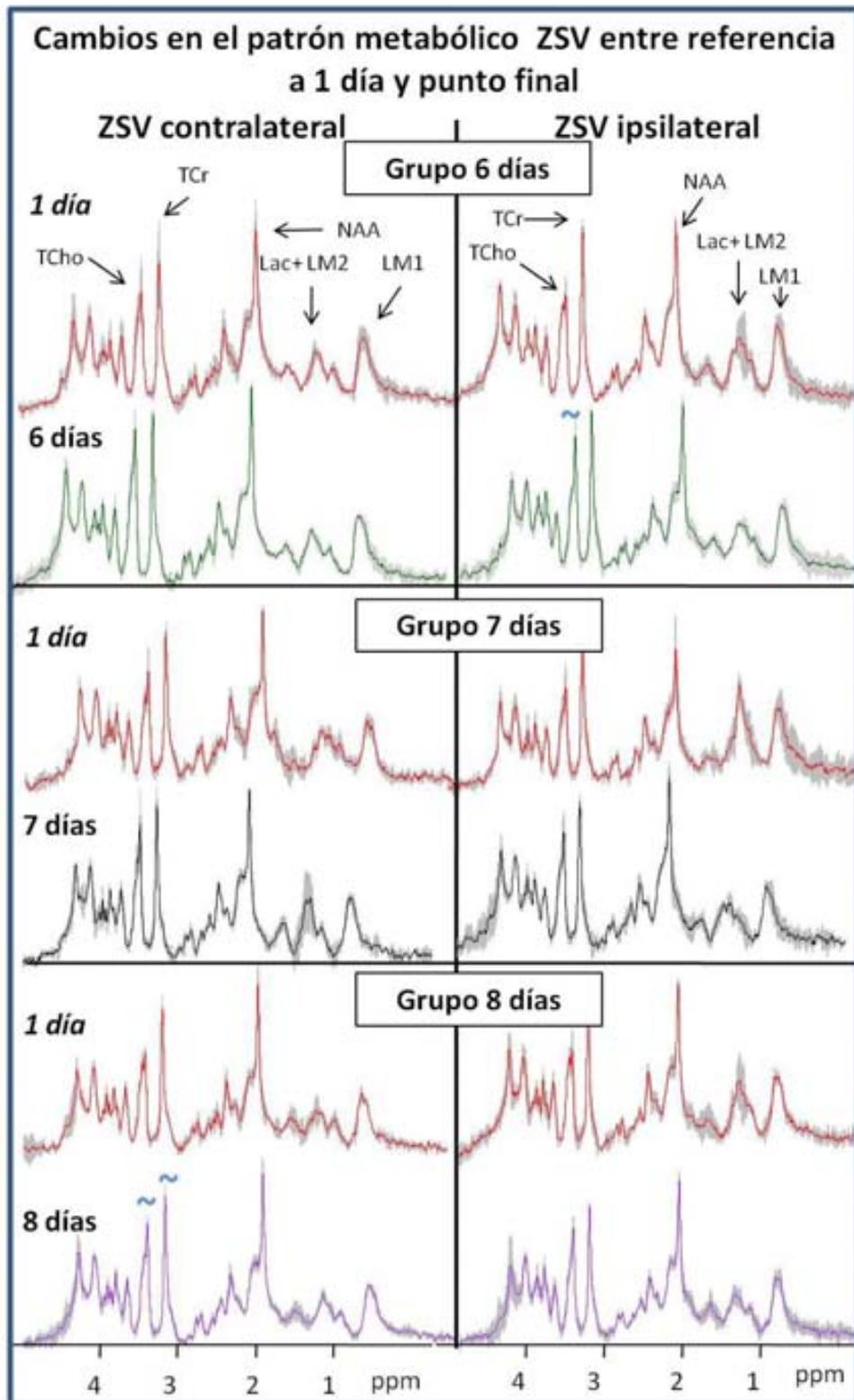


Figura 86: Espectros promedio \pm SD (sombreado en gris) de ERM *in vivo* de la evolución de las ZSVs entre la referencia a 1 día (rojo), y el punto final: 6 días (verde), 7 días (negro) y 8 días (lila) post-isquemia. Cada espectro promedio corresponde a $n=3$. (ver

Tabla 2 para las asignaciones de las abreviaturas). Los cambios entre la referencia a 1 día y el punto final se indican con el símbolo \sim si tienen tendencia a la significación ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado: T de Student pareado.

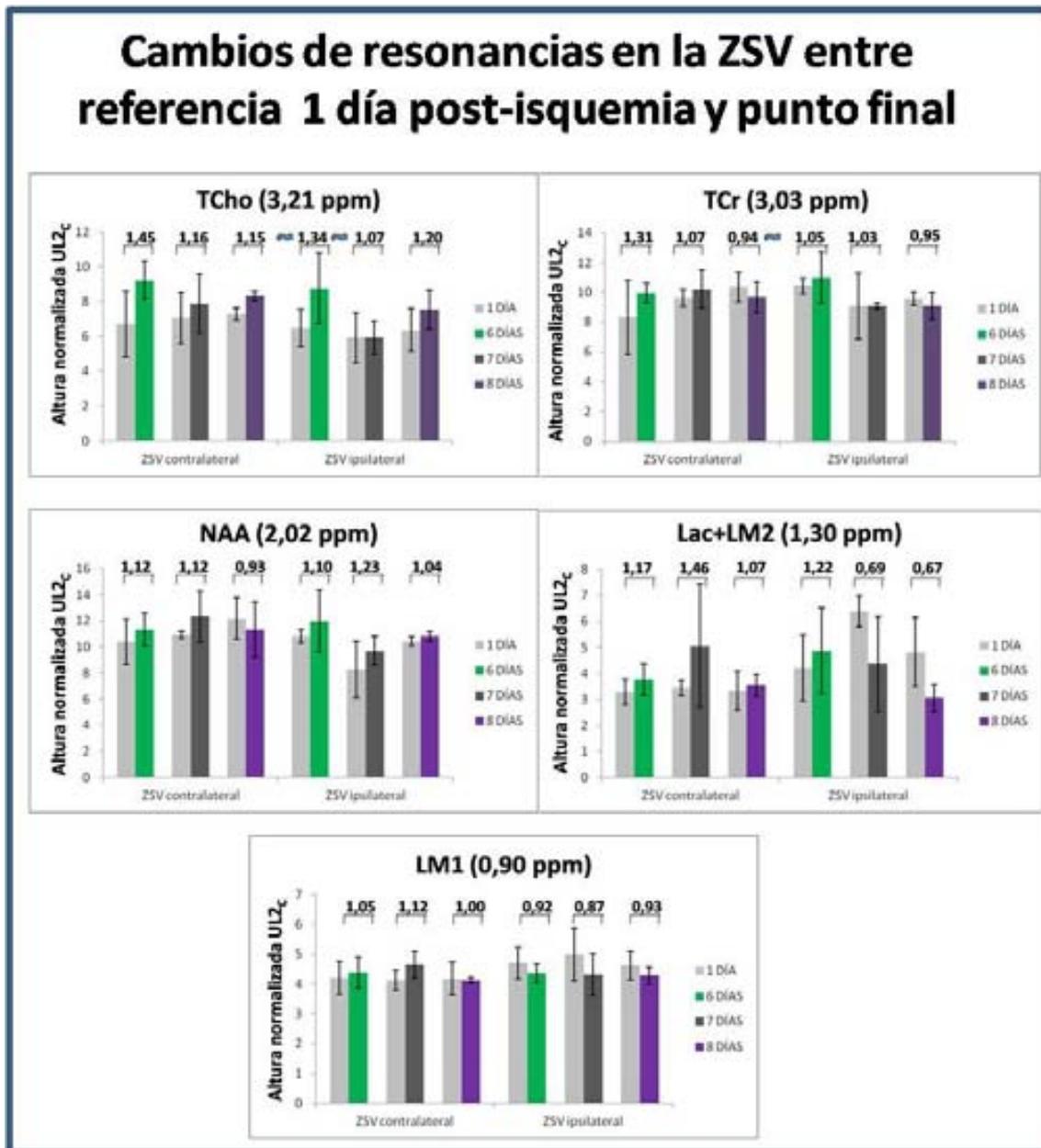


Figura 87: Gráficas promedio \pm SD de las alturas normalizadas a UL2_c de las resonancias de ERM *in vivo* de la ZSVc y la ZSVi entre la referencia 1 día (gris) y el punto final para cada grupo experimental: 6 días (verde), 7 días (negro) y 8 días (lila). Cada valor promedio corresponde a n=3. Sobre las barras horizontales continuas se indican los VC entre la referencia a 1 día y el punto final. Los VC con tendencia a la significación se indican con el símbolo \sim ($0,05 < p < 0,10$) Test estadístico aplicado: T de Student pareado.

Valores de cambio de las resonancias entre punto intermedio y punto final					
RESONANCIA	GRUPO	ZSV contralateral (Promedio \pm SD)	Significación ($p < 0,05$)	ZSV Ipsilateral (Promedio \pm SD)	Significación ($p < 0,05$)
TCho (3,21 ppm)	6 días	1,45 \pm 0,46	0,14	1,34 \pm 0,13	0,06~
	7 días	1,16 \pm 0,39	0,60	1,07 \pm 0,42	1,00
	8 días	1,15 \pm 0,08	0,07~	1,20 \pm 0,20	0,25
TCr (3,03 ppm)	6 días	1,31 \pm 0,56	0,45	1,05 \pm 0,12	0,51
	7 días	1,07 \pm 0,20	0,63	1,03 \pm 0,21	0,99
	8 días	0,94 \pm 0,03	0,08~	0,95 \pm 0,10	0,46
NAA (2,02 ppm)	6 días	1,12 \pm 0,31	0,62	1,10 \pm 0,18	0,41
	7 días	1,12 \pm 0,16	0,31	1,23 \pm 0,34	0,46
	8 días	0,93 \pm 0,09	0,31	1,04 \pm 0,06	0,37
Lac+LM2 (1,30 ppm)	6 días	1,17 \pm 0,33	0,38	1,22 \pm 0,61	0,64
	7 días	1,46 \pm 0,64	0,34	0,69 \pm 0,29	0,23
	8 días	1,07 \pm 0,11	0,40	0,67 \pm 0,24	0,16
LM1 (0,90 ppm)	6 días	1,05 \pm 0,21	0,76	0,94 \pm 0,17	0,52
	7 días	1,12 \pm 0,12	0,20	0,87 \pm 0,17	0,31
	8 días	1,00 \pm 0,11	0,85	0,93 \pm 0,14	0,49

Tabla 18: VC promedio \pm SD entre referencia a 1 día y punto final obtenido a partir de las alturas normalizadas a $UL2_c$ de las principales resonancias de ERM *in vivo* analizadas de las ZSVs. Cada valor promedio corresponde a $n=3$. Los VC con tendencia a la significación se indican con el símbolo ~ ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado: T de Student pareado.

5.2.2.4. Análisis del patrón metabólico de las ZSVs por HRMAS

Uno de los principales motivos por el cual se pensó en el uso de la espectroscopía por HRMAS fue para el análisis de los espectros de las ZSVs, por 2

motivos: 1) Al tener mejor SNR es más fácil determinar metabolitos que se encuentran en menor concentración, 2) se pueden separar con confianza la resonancia del doblete de lactato (1,35 ppm-1,33ppm) de la de los LM2 (1,28 ppm), ésta última es la resonancia que Manganas (Manganas et al. 2007) y colaboradores atribuyeron como biomarcador de las CPNs.

Para este análisis, tal y como se ha comentado en el apartado de infarto (apartado 5.1.1.6) se utilizó un subgrupo de animales destinado a la irradiación con FMW. En este caso los animales analizados eran controles-F (n=3), 1 día-F (n=3) y 7 días-F (n=3) post-isquemia

Tal y como se puede ver en la [Figura 88](#) tanto en la secuencia de Pulso-adquisición como la de *Spin Echo* hay un cambio significativo entre la ZSVi y la ZSVc que corresponde al Lac (1,33-1,35 ppm) a 1 día post-isquemia. En el resto de metabolitos no hay cambios significativos.

A continuación se analizarán algunos de los metabolitos analizados más relevantes para las ZSVs.

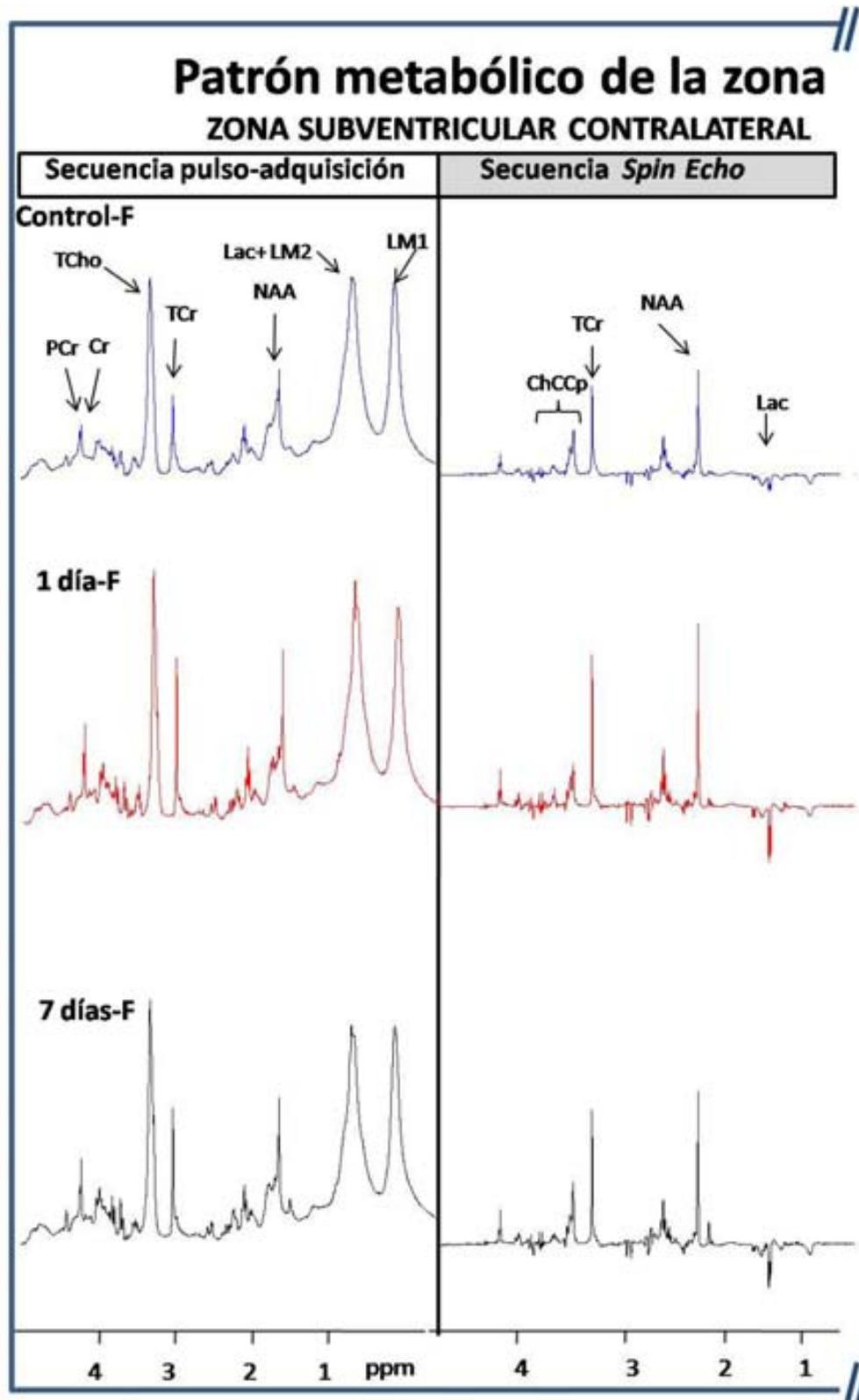
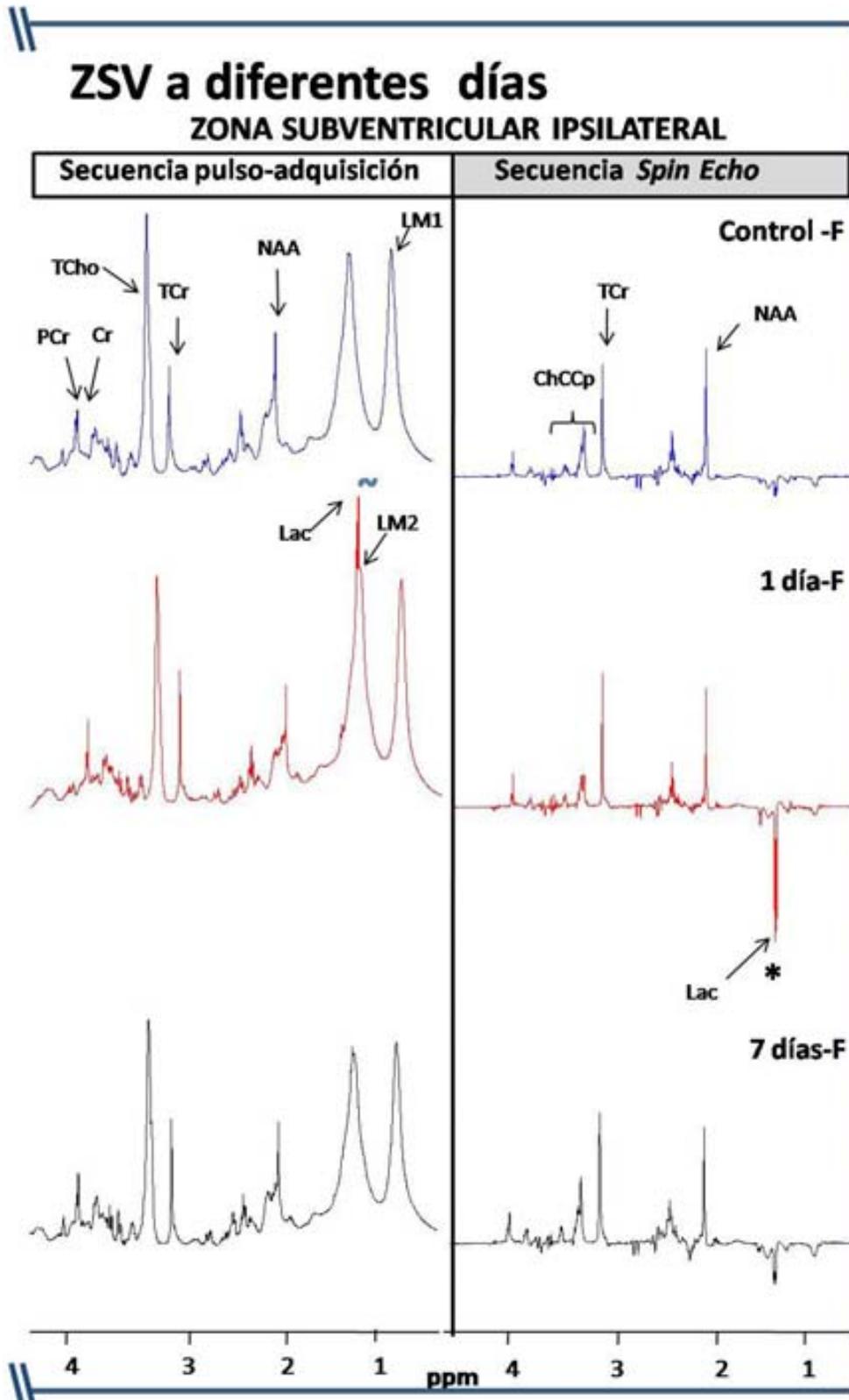


Figura 88: Espectros promedio (sin SD) de HRMAS *ex vivo* de las ZSVs para cada grupo experimental normalizados a UL2: control-F no isquémico (azul), 1 día -F (rojo), 7 días-F (negro) post-isquemia. Cada espectro promedio corresponde a n=3 (ver Tabla 2 para las asignaciones de las abreviaturas). Los cambios entre la ZSVi y la ZSVc se indican con el símbolo * si tienen significación estadística ($p \leq 0,05$). Test estadístico aplicado: T de Student



5.2.2.4.1. Lactato+ LM2

En la ERM *in vivo*, el Lac y los LM2 aparecen parcialmente superpuestos en una resonancia ancha. Sin embargo, mediante HRMAS ambas resonancias pueden diferenciarse bien sin post-procesamiento adicional. En la secuencia de pulso-adquisición se pueden medir ambos metabolitos, aunque no se puede descartar que el Lac tenga contribución de los LM2.

Por ese motivo no se amplificó la región con la secuencia de Pulso—adquisición en este apartado, únicamente se amplificó la señal con *Standard Hahn Spin Echo* (Figura 89). Esta secuencia permite cuantificar la señal del Lac, que aparece invertida, sin contribución de los LM2, con lo cual es más fiable su determinación

En los espectros promedio mostrados en la Figura 89 se puede observar que el lactato se incrementa significativamente entre la ZSVc y la ZSVi en el grupo 1 día-F post-isquemia.

Si se analizan cuantitativamente los valores en la Figura 90 y la Tabla 25 ahora comparando *in vivo*, pulso-adquisición y *Standard Hahn Spin Echo* se puede observar cómo este incremento que en *in vivo* tiene un valor de cambio de $1,44 \pm 0,41$ sin ser significativo, en la secuencia de pulso-adquisición se detecta un incremento con tendencia significativa del Lac de $1,25 \pm 0,11$ ($p=0,10$) y en la secuencia *Spin Echo*, que es la que mejor puede caracterizarlo sin contribución de LM2, el aumento es incluso mayor $2,70 \pm 0,75$ ($p=0,01$).

Es destacable que al comparar los cambios entre distintos días el aumento de la señal de Lac se produce en las 2 ZSVs. Entre control no isquémico y 1 día en la ZSVi hay un incremento del Lac de 5,86 veces ($p<0,01$) pero también en la ZSVc hay de 2,43 veces ($p=0,02$) (Figura 90).

Si se analiza la señal de LM2 en la secuencia de HRMAS de Pulso-adquisición se demuestra que no hay cambios significativos entre la ZSVc y la ZSVi $1,06 \pm 0,04$ ($p=0,43$).

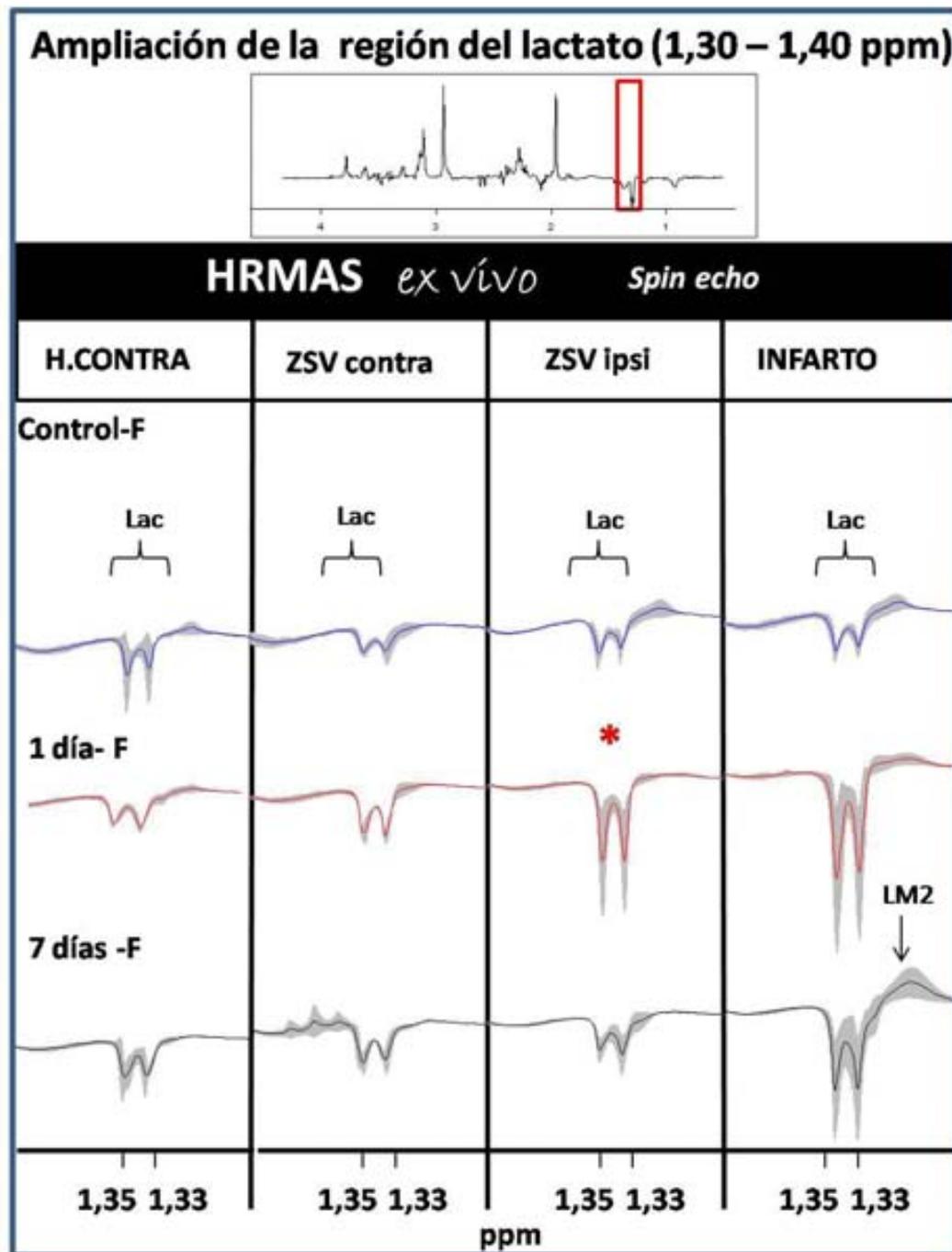


Figura 89: Ampliación de la región entre 1,30 ppm y 1,40 ppm que corresponde a la zona de los Lac (1,33-1,35 ppm) con HRMAS *ex vivo* (secuencia *Spin Echo*). Se muestran los espectros promedio \pm SD (sombreado en gris) para las distintas zonas del cerebro: H.contralateral, ZSVc, ZSVi e infarto. El color corresponde a control-F (azul), 1 día-F (rojo) y rata 7 días-F (negro) post isquemia. Cada espectro promedio corresponde a $n=3$. Los VC entre la ZSVi y la ZSVc con significación estadística se indican con el símbolo * ($p < 0,05$) Test estadístico aplicado: T de Student.

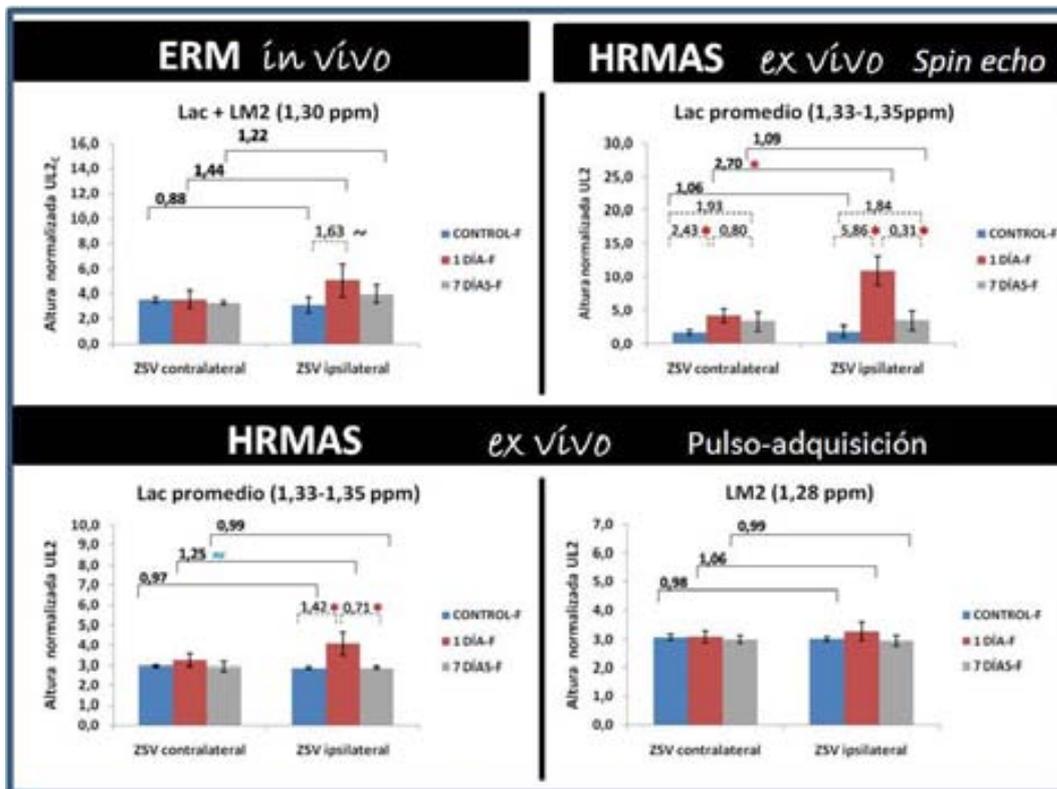


Figura 90: Gráficas promedio \pm SD para la resonancia de Lac+LM2 (1,30 ppm) de las alturas normalizadas a UL_{2c} en el caso de la ERM *in vivo* y normalizadas a UL₂ en el caso del HRMAS *ex vivo* para cada grupo experimental (control-F, 1 día-F, 7 días-F post-isquemia). Cada valor promedio corresponde a n=3. Sobre las líneas horizontales continuas se indican los VC entre la ZSVi y la ZSVc. Sobre las líneas horizontales discontinuas los VCT. Los cambios con significación estadística se indican con el símbolo * ($p \leq 0,05$) y los que muestran tendencia a la significación ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado para los valores de VC: T de Student, test estadístico aplicado para los valores de VCT: ANOVA.

Valores de cambio de Lac+ LM2 entre ZSVc y ZSVi						
ERM <i>in vivo</i>	METAB	GRUPO	PRESS	Sig.		
	Lac +LM2	Control	0,88 ± 0,12	0,34		
		1 día	1,44 ± 0,41	0,15		
		7 días	1,22 ± 0,22	0,17		
HRMAS <i>ex vivo</i>	METAB	GRUPO	P&A	Sig.	<i>Spin echo</i>	Sig.
	Lac	Control	0,97 ± 0,02	1,00	1,06 ± 0,24	0,80
		1 día	1,25 ± 0,11	0,10 ~	2,70 ± 0,75	0,01*
		7 días	0,99 ± 0,09	0,76	1,09 ± 0,31	0,92
	LM2	Control	0,98 ± 0,03	0,41		
			1,06 ± 0,04	0,43		
			0,99 ± 0,12	0,79		

Tabla 19: VC promedio \pm SD entre la ZSVi y la ZSVc para la resonancia de Lac+LM2 (1,30 ppm) tanto por ERM *in vivo* como por HRMAS *ex vivo* utilizando la secuencia de pulso y adquisición y *Spin Echo*. El VC se calculó a partir de las alturas normalizadas a UL2 para ERM *in vivo* y UL2C para ERM *ex vivo*. Cada valor promedio corresponde a n=3. Los VC con significación estadística se indican con el símbolo * ($p \leq 0,05$) y con tendencia a la significación con el símbolo ~ ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado: T de Student.

5.2.2.4.2. Colina

Uno de los grupos de metabolitos que mejora su resolución con HRMAS con la secuencia Standard Hahn Spin Echo son los compuestos de colina (Figura 91). La colina analizada como TCho indica que hay cambios en el metabolismo de fosfolípidos de membrana, pero en cambio, analizada en sus distintos componentes Cho, PCho, GPCho, PtdCho puede ofrecer información más específica sobre los procesos que tienen lugar en dicha membrana, por ejemplo, si se trata de proliferación o de destrucción de membranas

Al analizar los compuestos de colina de forma individual no mostraron diferencias significativas entre la ZSVc y la ZSVi como se puede ver en la Figura 92 y la

Tabla 20.

Sin embargo, en el análisis a distintos días se puede observar una disminución significativa de los compuestos de Cho (3,19 ppm), PCho (3,20 ppm) y GPCho (3,21 ppm) entre el grupo 1 día-F post-isquemia y el grupo control-F no isquémico, a excepción de la PtdCho (3,25 ppm). Aunque a los 7 días prácticamente todos los valores han recuperado el mismo nivel que en el grupo control-F.

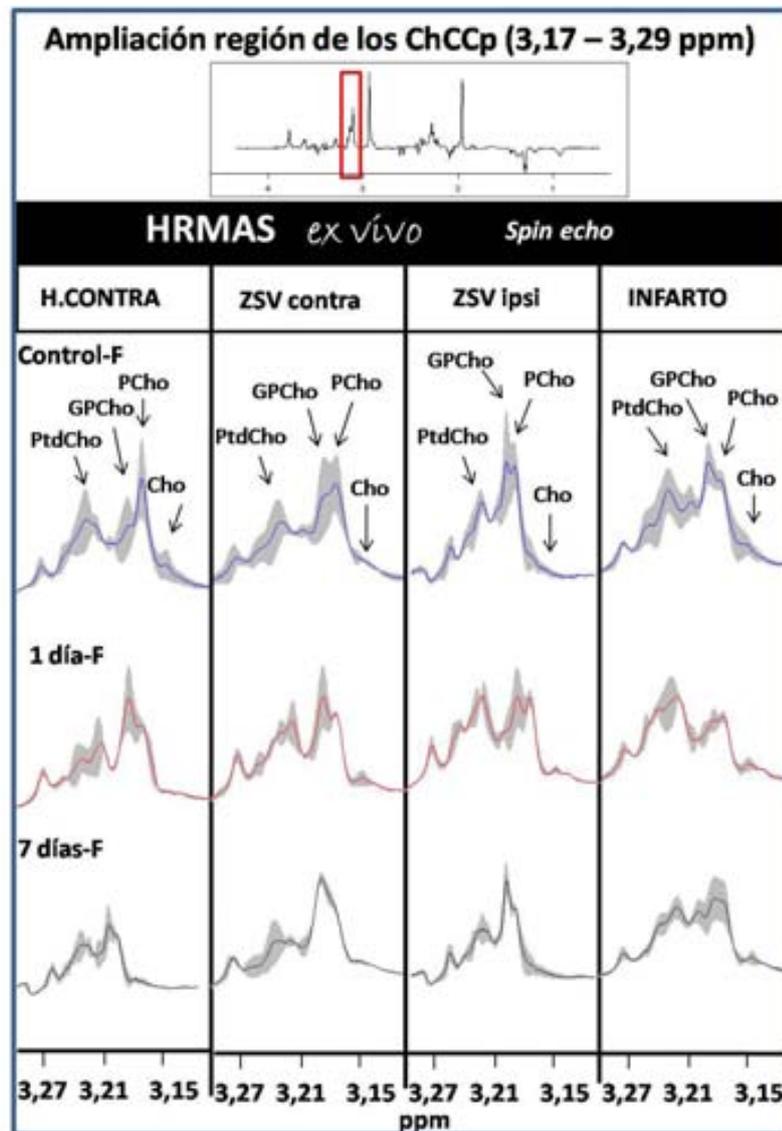


Figura 91: Ampliación de la región entre 3,17 ppm y 3,29 ppm que corresponde a la zona de los ChCCp (3,19-3,25 ppm) con HRMAS *ex vivo* (secuencia *Spin Echo*). Se muestran los espectros promedio \pm SD (sombreado en gris) para las distintas zonas del cerebro: H.contralateral, ZSVc, ZSVi e infarto. El color corresponde a control-F (azul), 1 día-F (rojo) y rata 7 días-F (negro) post isquemia. Cada espectro promedio corresponde a $n=3$. En este caso no se han detectado VC entre la ZSVi y la ZSVc con significación estadística aplicando el test estadístico T de Student.

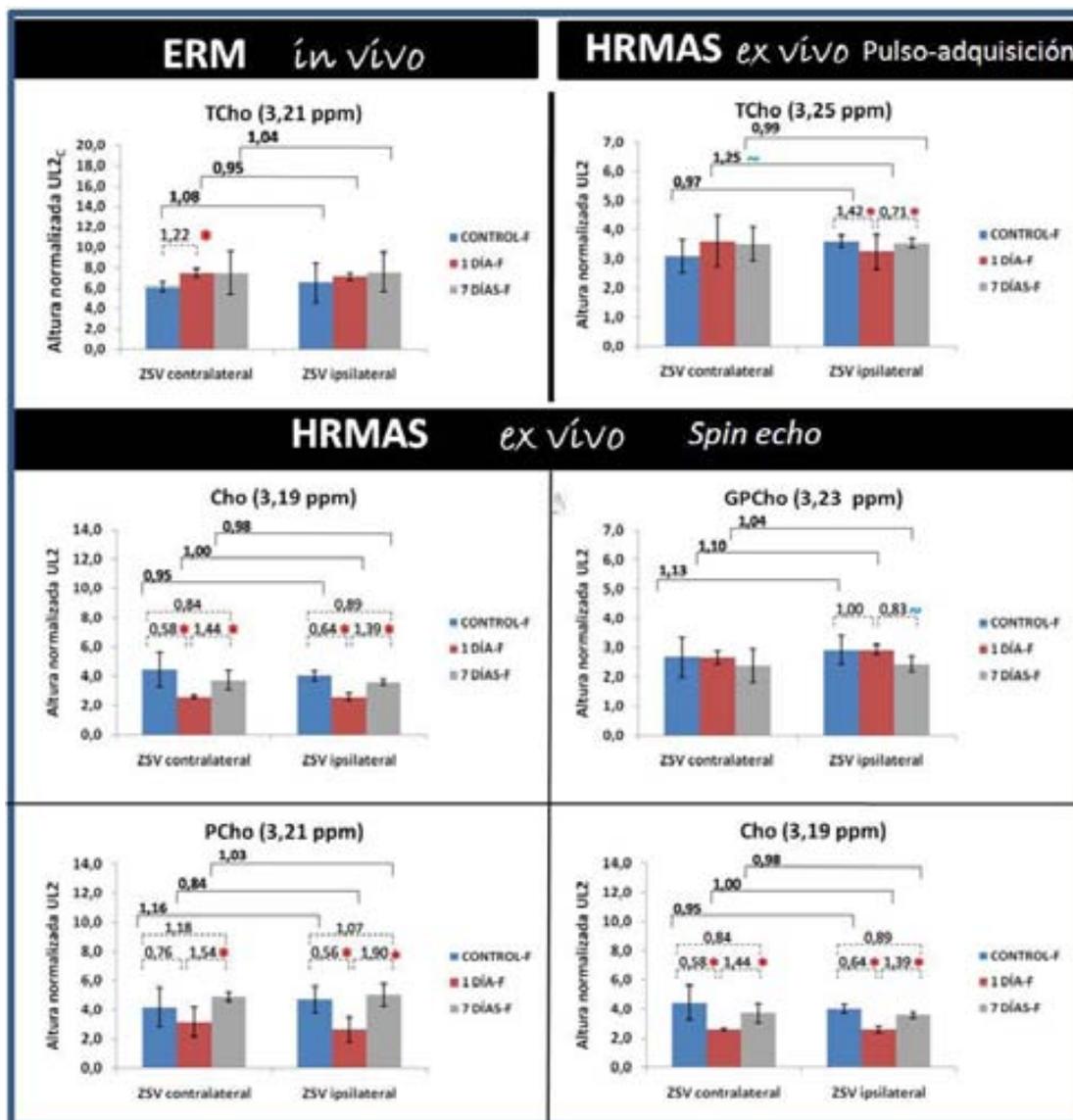


Figura 92: Gráficas promedio \pm SD para la resonancia de los ChCCp (3,19-3,25 ppm) de las alturas normalizadas a UL2_c en el caso de la ERM *in vivo* y normalizadas a UL2 en el caso del HRMAS *ex vivo* para cada grupo experimental (control-F, 1 día-F, 7 días-F post-isquemia). Cada valor promedio corresponde a n=3. Sobre las líneas horizontales continuas se indican los VC entre la ZSVi y la ZSVc. Sobre las líneas horizontales discontinuas los VCT. Los cambios con significación estadística se indican con el símbolo * ($p < 0,05$) y los que muestran tendencia a la significación ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado para los valores de VC: T de Student, test estadístico aplicado para los valores de VCT: ANOVA.

Valores de cambio de Colina entre ZSVc y ZSVi							
	ERM <i>in vivo</i>		HRMAS <i>ex vivo</i>				
GRUPO	PRESS TCho (3,21 ppm)	Sig. (p<0,05)	Pulso- adquisición TCho (3,25ppm)	Sig.	METAB	<i>Spin echo</i>	Sig. (p<0,05)
Control	1,08 ± 0,38	0,77	0,94 ± 0,35	0,24	PtdCho (3,25 ppm)	1,09 ± 0,30	0,85
1 día	0,95 ± 0,08	0,29	1,28 ± 0,14	0,58		1,14 ± 0,06	0,45
7 días	1,04 ± 0,25	0,97	1,14 ± 0,13	0,95		1,70 ± 0,89	0,36
Control					GPCHo (3,21 ppm)	1,13 ± 0,26	0,59
1 día						0,84 ± 0,09	0,54
7 días						1,05 ± 0,21	0,72
Control					PCho (3,20 ppm)	0,97 ± 0,34	0,69
1 día						0,99 ± 0,07	0,95
7 días						1,01 ± 0,06	0,86
Control					Cho (3,19 ppm)	0,66 ± 0,33	0,37
1 día						1,18 ± 0,50	0,95
7 días						0,95 ± 0,74	0,74

Tabla 20: VC promedio \pm SD entre la ZSVi y la ZSVc para la resonancia de los ChCCp (3,19-3,25 ppm) tanto por ERM *in vivo* como por HRMAS *ex vivo* utilizando la secuencia de pulso y adquisición y *Spin Echo*. El VC se calculó a partir de las alturas normalizadas a UL2 para ERM *in vivo* y UL2C para ERM *ex vivo*. Cada valor promedio corresponde a n=3. En este caso no se han determinado VC estadísticamente significativos aplicando el test estadístico T de Student.

5.2.2.4.3. Correlación inmunohistoquímica en las zonas subventriculares

Para la correlación de las intensidades de los metabolitos obtenidos mediante ERM *in vivo* con la inmunohistoquímica se procedió a determinar en primer lugar la distribución de los valores de Ki67+/ mm^2 en un total de 42 casos que incluían los recuentos de todos los animales que tenían datos inmunohistoquímicos, independientemente del grupo al que pertenecieran.

En el caso de los recuentos de $Ki67+/mm^2$, la distribución de los valores mostraba 2 valores *outliers*, es decir valores atípicos considerando el resto de valores del conjunto (Figura 93). Concretamente ambos valores corresponden a la ZSVi: la OFA 107 ($6025 \text{ céls}/mm^2$) del grupo de 8 días post-isquemia y la OFA 102 ($4617 \text{ céls}/mm^2$) del grupo de 6 días post-isquemia

Para evitar introducir ruido en el cálculo de la correlación con $Ki67+/mm^2$ debida a estos valores anómalos se aplicó el test de Grubbs para determinar si alguno de estos *outlier* será significativo y se podía retirar. Para una muestra de 42 casos, según el test, el valor crítico para descartar un punto se establece en una puntuación de Z de 3,057. Como el punto correspondiente a $6025 \text{ céls}/mm^2$ tenía una puntuación de Z de 3,66 se consideró descartable, el punto de $4617 \text{ céls}/mm^2$ no pudo ser descartado ya que su puntuación de Z era 2,08.

Por lo tanto, se procedió a calcular la correlación de los metabolitos respecto a $Ki67+/mm^2$ con un valor menos, en este caso $n = 41$.

En el caso de la correlación con los valores de $TUNEL+/mm^2$ para determinar apoptosis, se utilizaron los 42 casos ya que no se detectaron valores atípicos.

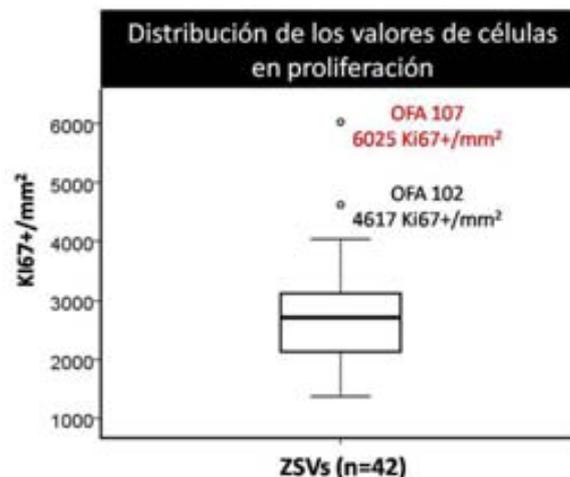


Figura 93: Distribución de los valores de proliferación ($Ki67/mm^2$) en las ZSVs mostrado en un diagrama de caja. Los círculos abiertos representan los valores *outliers*. Para determinarlos *outlier* el programa SPSS multiplica 1,5 por la distancia entre los cuartiles 1 y 3 (rango intercuartílico) y el valor resultante se suma al cuartil 3 y se resta al cuartil 1. Los números que sobrepasen los valores obtenidos serán representados como *outliers*. Sin embargo según el test de Grubbs únicamente el outlier marcado en rojo indicado en rojo puede ser descartado.

Se llevó a cabo un estudio de correlación de los valores de las alturas normalizadas según $UL2_c$ de los principales metabolitos de los valores *in vivo* con los recuentos de células en proliferación y apoptosis utilizando el test de correlación de Pearson (Tabla 21).

Los resultados de la correlación inmunohistoquímica muestran que únicamente el TCho (3,21 ppm) muestra una correlación positiva con el número de $Ki67+/mm^2$ que aunque no llega a significación muestra una tendencia ($p=0,08$). El coeficiente de Pearson en este caso es de 0,142 (Figura 94).

En el caso del ajuste con el metabolito de Lactato+LM2 (1,30ppm) con la proliferación medida con $Ki67/mm^2$ que era el propuesto por Manganas y colaboradores (Manganas et al. 2007) como biomarcador de proliferación nuestros resultados no muestran una correlación significativa (coeficiente de Pearson= -0,209) ($p=0,19$) aunque los resultados obtenidos parecen indicar que, en todo caso, la correlación sería negativa, a mayor valor Lac+LM2, menos número de células $Ki67+/mm^2$.

Correlación inmunohistoquímica de los metabolitos <i>in vivo</i> en las ZSVs				
METABOLITO	Ki67+ (n=41)		TUNEL+ (n=42)	
	Coefficiente de Pearson (r)	Significación (p < 0,05)	Coefficiente de Pearson (r)	Significación (p < 0,05)
Colina(3,21 ppm)	0,142	0,08~	0,18	0,25
Creatina(3,03 ppm)	0,247	0,19	0,01	0,96
LMap(2,80 ppm)	0,181	0,25	-0,20	0,20
NAA(2,02 ppm)	-0,370	0,82	-0,22	0,15
Lactato+LM2(1,30 ppm)	-0,209	0,19	-0,05	0,77
LM1(0,90 ppm)	-0,09	0,59	-0,18	0,24

Tabla 21: Valores de correlación de Pearson (r) y sus valores de significación (p). para Ki67 (marcador de proliferación) y TUNEL+ (marcador de apoptosis).El símbolo ~ indica tendencia a la significación estadística ($0,05 < p < 0,10$)

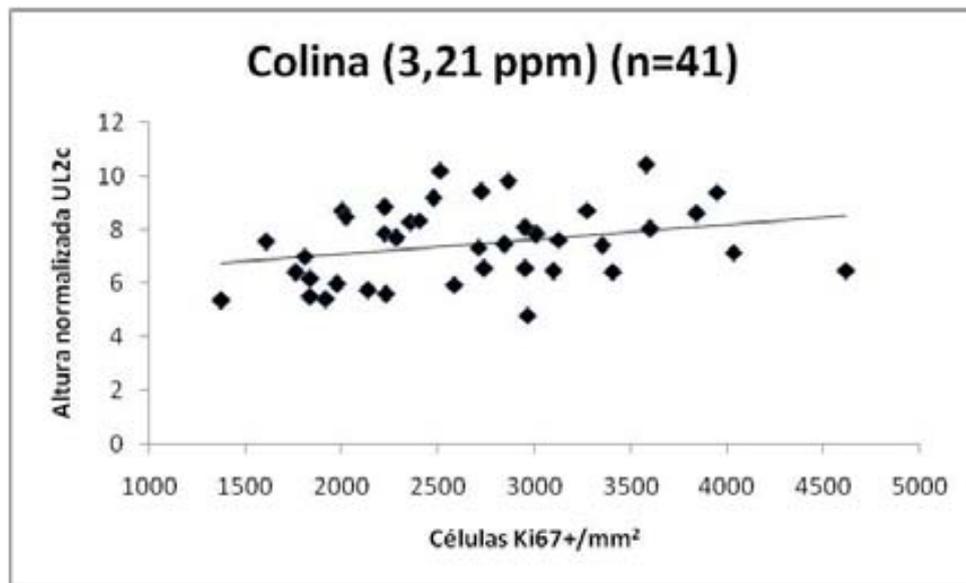


Figura 94: Representación de la correlación de Pearson para la proliferación ($\text{Ki67+}/\text{mm}^2$) y la intensidad normalizada a UL2c de la resonancia colina total (3,21ppm) de la ERM *in vivo*. La distribución fue ajustada a una recta (línea continua).

5.2.2.5. Métodos de reconocimientos de patrones de patrones *in vivo*

En este caso el objetivo de los clasificadores era determinar las diferencias entre las distintas regiones analizadas del cerebro (H.contralateral, ZSVc, ZSVi e infarto) así como su capacidad de ser reconocidos matemáticamente de modo semi-automatizado.

Para aumentar el número de casos dentro de cada clase para poder realizar un clasificador en base a más características y mejorar su posible robustez, se unieron todos los casos de cada zona en una misma clase, independientemente del punto temporal al que pertenecieran. La desventaja de esta opción es que podía añadir más variabilidad a cada grupo y complicar el reconocimiento diferencial. Sin embargo como se mostrará a continuación las clasificaciones se pudieron realizar con bastante precisión.

El primer clasificador constaba de 4 clases correspondientes a H.contralateral, ZSVc, ZSVi e infarto. Los casos incluidos fueron asignados a sus respectivas clases y a grupo de *test* o entrenamiento (Figura 95). El sistema realizó una evaluación y en base

al BER de los casos de *test* independiente el número óptimo de características para éste clasificador fue de 6, ya que era el que menos porcentaje de error daba. Las 6 características que el sistema determinó que eran las que mejor permitían la clasificación eran, por orden de importancia, las que se muestran en la Tabla 22.

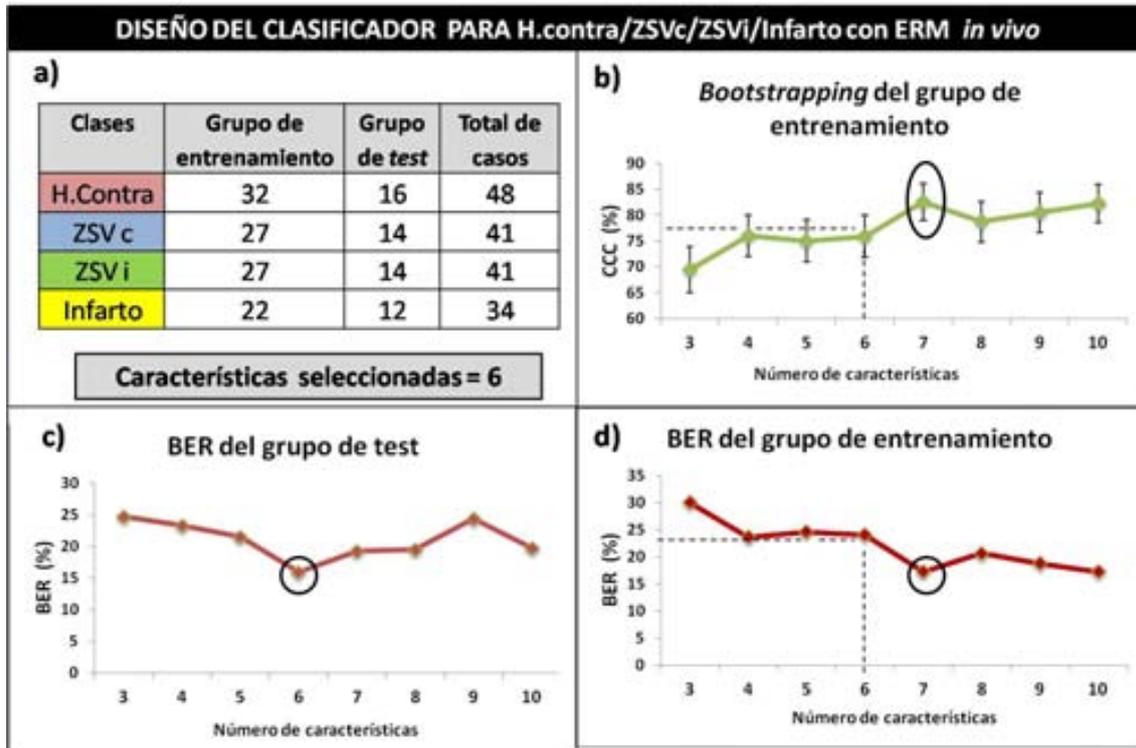


Figura 95: Clasificador desarrollado para el análisis de los cambios para clasificar 4 zonas del cerebro: H.contralateral, ZSVc, ZSVi e Infarto. **a)** En la tabla se muestra el número de casos incluidos en cada clase y su asignación a grupo de entrenamiento o grupo de test independiente. El número de características seleccionadas mostrado en el recuadro gris se calcula en base a la combinación que ofrece un mínimo BER en el grupo de test. **b)** El clasificador fue evaluado en sus características descriptivas utilizando el método estadístico de *Bootstrapping* con 1000 repeticiones. En la gráfica se puede observar los casos correctamente asignados (CCC) \pm SD de los casos del grupo de entrenamiento. **c)** El clasificador fue evaluado en sus características predictivas utilizando el *Balanced Error Rate* (BER) del grupo de test independiente según el número de características seleccionadas. En la gráfica el círculo negro indica el número de características que ofrece menor BER, **d)** BER del grupo de entrenamiento según el número de características seleccionadas. El círculo negro indica cual sería el número de características idóneo según el grupo de entrenamiento, la línea discontinua indica el BER según el número de características finalmente seleccionado en base al grupo de test.

Característica	Desplazamiento químico	Asignación tentativa de metabolitos
1	3,0445	Creatina (3,03ppm)
2	1,2926	Lactato + LM2 (1,29 ppm)
3	3,6208	Mioinositol+ Valina (3,61 ppm)
4	2,4876	NAA + glutamina (2,49/2,44ppm)
5	1,3187	Lactato (1,33 ppm)+ LM2
6	1,5662	LM (1,59 ppm) + macromoléculas

Tabla 22: Selección de las 6 características utilizadas para la generación del clasificador organizadas de la característica más a menos relevante con las asignaciones que se les han realizado según fuente consultada: (Martinez-Bisbal et al. 2004; Valverde-Saubi et al. 2010; Yang et al. 2012)

En base a las características seleccionadas el sistema determina una distribución en el espacio latente (Figura 96). En este caso, al ser 4 grupos la distribución es en 3 dimensiones y debe visualizarse directamente por pantalla. En la figura aparece la proyección para la visualización en 2Dy en consecuencia no aparecen las fronteras divisorias (líneas) entre cada grupo. De todos modos la distribución permite detectar que los casos de infarto se diferencian claramente del resto (como era de esperar) mientras que el resto de casos son más similares entre sí con respecto a los de infarto. A pesar de dichas similitudes parece que el sistema consigue diferenciar de una forma bastante precisa los casos que corresponden al hemisferio contralateral (sano) con respecto a los casos de las ZSVs que se solapan extensamente.

Analizando los resultados mostrados en el clasificador se determinó el tanto por ciento de acierto del clasificador evaluado por Bootstrapping para los casos de entrenamiento que fue de $76,07 \pm 4,10\%$ siendo los grupos del hemisferio contralateral y el infarto los mejor clasificados con $93,85 \pm 4,30\%$ y $95,51 \pm 4,40\%$ respectivamente. En cambio las ZSVs (azul y verde) mostraron una clasificación peor: $55,58 \pm 9,83\%$ en la ZSVc y $59,47 \pm 9,57\%$ en la ZSVi. El valor predictivo del clasificador se evalúa mediante el BER, que indicaría los posibles casos que se clasificarían mal al entrarlos en el sistema (casos de test) y fue del 15,9%. En este sentido un valor de BER bajo indica que el clasificador desarrollado tiene buenas propiedades predictivas.

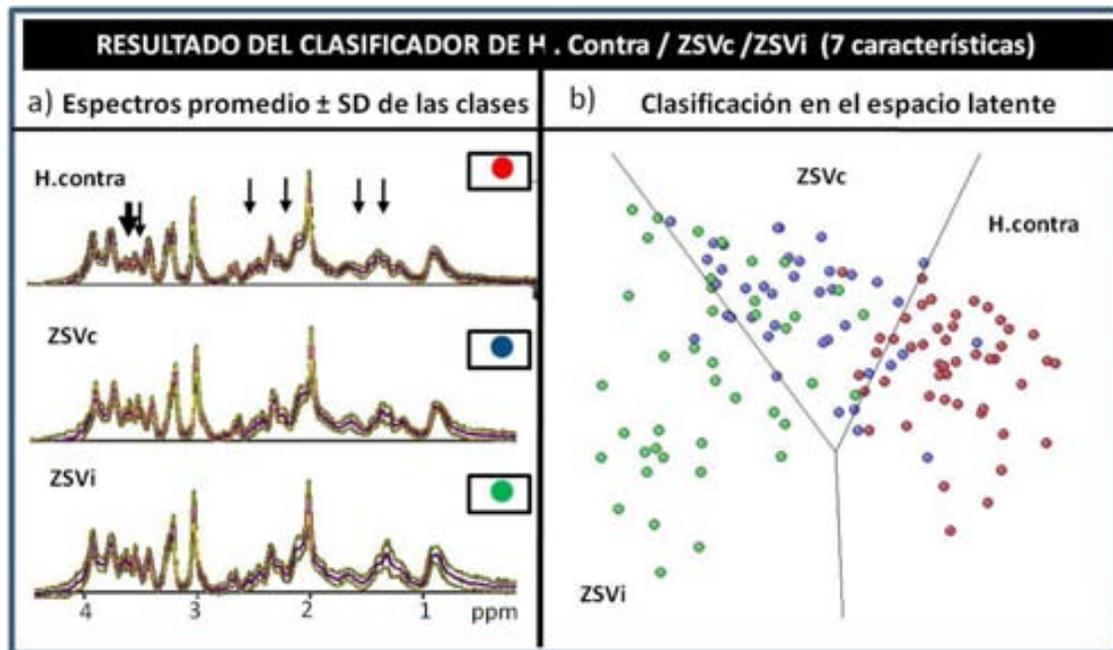


Figura 96: Representación de la clasificación realizada por el sistema SpectraClassifier para la separación de los grupos (HContra, ZSVc, ZSVi, Infarto). **a)** Espectros promedio \pm SD para cada una de las clases generadas. Las flechas blancas indica la posición de las características diferenciales. Las bolas rojas corresponden a aquellas a las que el investigador ha asignado a H.contralateral, las bolas azules a ZSVc, las bolas verdes a ZSVi y las bolas amarillas a infarto. **b)** Clasificación que hace el sistema de los casos de *training* +test utilizados para análisis. En este caso no se muestran fronteras divisorias entre grupos, pero se muestra mediante etiquetación la zona que el sistema otorga a cada grupo dentro del espacio latente.

En base a los resultados obtenidos en el clasificador anterior, y ya que ZSVc y ZSVi compartían características se procedió a realizar un clasificador en el cual ZSVc y ZSVi se unieron en la misma clase. El objetivo en este caso fue diferenciar las ZSVs del hemisferio contralateral y de la zona de infarto (Figura 97).

En este clasificador los mejores resultados (en base al menor BER y el mayor porcentaje de casos bien clasificados) se producían utilizando únicamente 3 características que son las que se relacionan en la Tabla 20.

De este modo el tanto por ciento de acierto del clasificador evaluado por Bootstrapping fue de $86,10 \pm 3,30\%$. El BER para los casos de test independiente en este caso fue de 7,2% que era mejor que el BER del clasificador anterior.

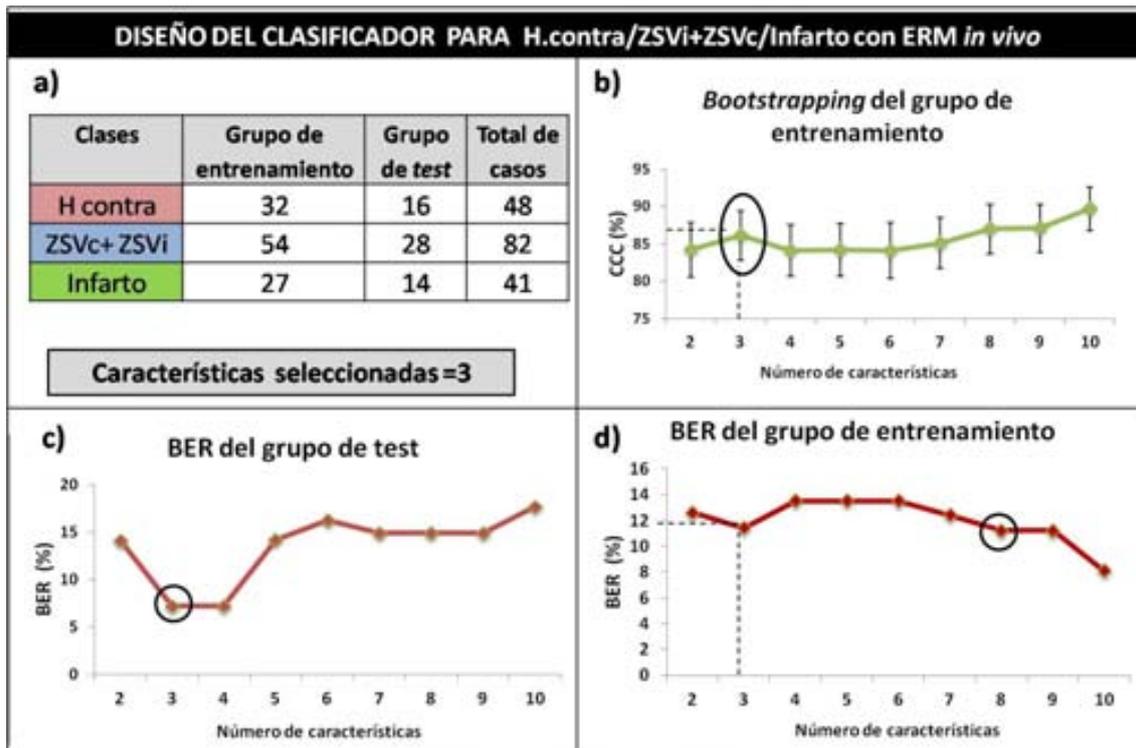


Figura 97: Clasificador desarrollado para diferenciar: H.contralateral, ZSVc+ ZSVi e Infarto. **a)** En la tabla se muestra el número de casos incluidos en cada clase y su asignación a grupo de entrenamiento o grupo de test independiente. El número de características seleccionadas mostrado en el recuadro gris se calcula en base a la combinación que ofrece un mínimo BER en el grupo de test. **b)** El clasificador fue evaluado en sus características descriptivas utilizando el método estadístico de *Bootstrapping* con 1000 repeticiones. En la gráfica se puede observar los casos correctamente asignados (CCC) \pm SD de los casos del grupo de entrenamiento. **c)** El clasificador fue evaluado en sus características predictivas utilizando el *Balanced Error Rate* (BER) del grupo de test independiente según el número de características seleccionadas. En la gráfica el círculo negro indica el número de características que ofrece menor VER **d)** BER del grupo de entrenamiento según el número de características seleccionadas. El círculo negro indica cual sería el número de características idóneo según el grupo de entrenamiento, la línea discontinua indica el BER según el número de características finalmente seleccionado en base al grupo de test.

Característica	Desplazamiento químico	Asignación tentativa de metabolitos
1	3,0445	Creatina (3,03 ppm)
2	3,6208	Mioinositol + valina (3,61 ppm)
3	3,0412	Creatina (3,03 ppm)

Tabla 23: Selección de las 3 características utilizadas para la generación del clasificador organizadas de la característica más a menos relevante con la correspondiente asignación tentativa que se les ha realizado según fuentes consultadas:(Martinez-Bisbal et al. 2004; Valverde-Saubi et al. 2010; Yang et al. 2012)

La distribución en el espacio latente de los casos de entrenamiento y de test en este caso sí muestra las fronteras divisorias (líneas continuas) para cada clase, y tal y como se puede observar, no hay muchos casos que el sistema asigne a otro grupo que no haya sido el asignado por el investigador (Figura 98).

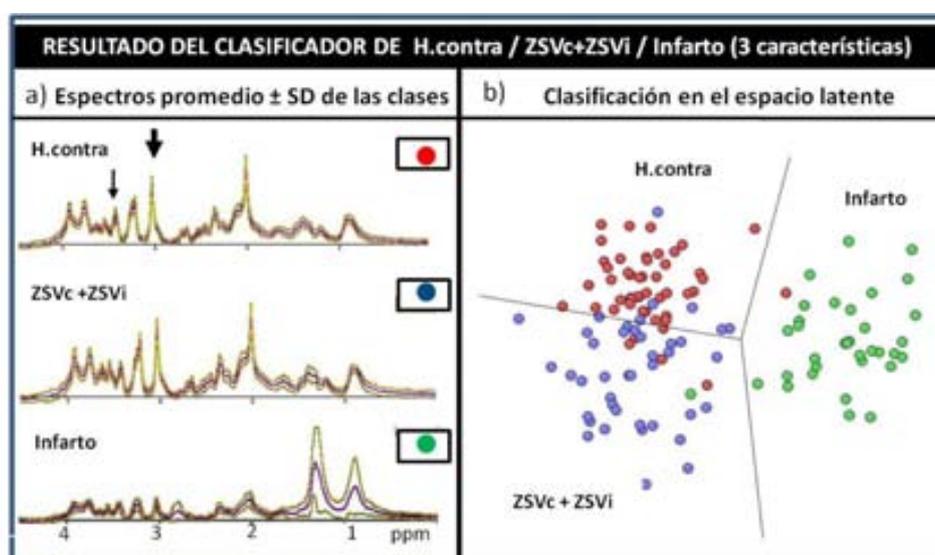


Figura 98: Representación de la clasificación realizada por el sistema Spectra Classifier para la separación de los grupos (HContra, ZSVc+ ZSVi e Infarto). **a)** Espectros promedio \pm SD para cada una de las clases generadas. Las flechas blancas indica la posición de las características diferenciales. Las bolas rojas corresponden a las que el investigador ha asignado a H.contralateral, las bolas azules a ZSVc+ZSVi y las bolas verdes a infarto, **b)** Clasificación que hace el sistema de los casos de entrenamiento +test utilizados para análisis. Cada línea divisoria son los límites en el espacio latente del espacio que el sistema adjudica a cada clase, indicado por su correspondiente etiqueta.

En los 2 clasificadores anteriores el hecho de incluir el grupo de infarto, que a nivel espectroscópico es muy distinto al del H.contralateral o de las ZSVs puede que sea determinante a la hora de elegir las características diferenciadoras del sistema. Por ese motivo, se decidió probar un último clasificador en el que no se incluyera el grupo de infarto para intentar una posible discriminación entre la ZSVc respecto a la ZSVi y el tejido sano.

En este clasificador el mínimo error en los casos de test se producía con 7 características así que este fue el número de características seleccionado (Figura 99)

El tanto por ciento de acierto del clasificador evaluado por Bootstrapping para los casos de entrenamiento fue de $79,02 \pm 4,36\%$ que era ligeramente superior al anterior clasificador donde se intentaban separar las 2 ZSVs. Sin embargo, el BER del clasificador fue superior al anterior, en este caso del 25,6%. El grupo correspondiente al hemisferio contralateral fue el mejor clasificado con un $87,54 \pm 6,00\%$. En la clasificación de las ZSVs fue donde mejoró la calidad del clasificador mostrando una clasificación correcta del $74,19 \pm 8,5\%$ en la ZSVc y la ZSVi de $73,68 \pm 8,84\%$.

Las 7 características diferenciales seleccionadas se muestran en la Tabla 24.

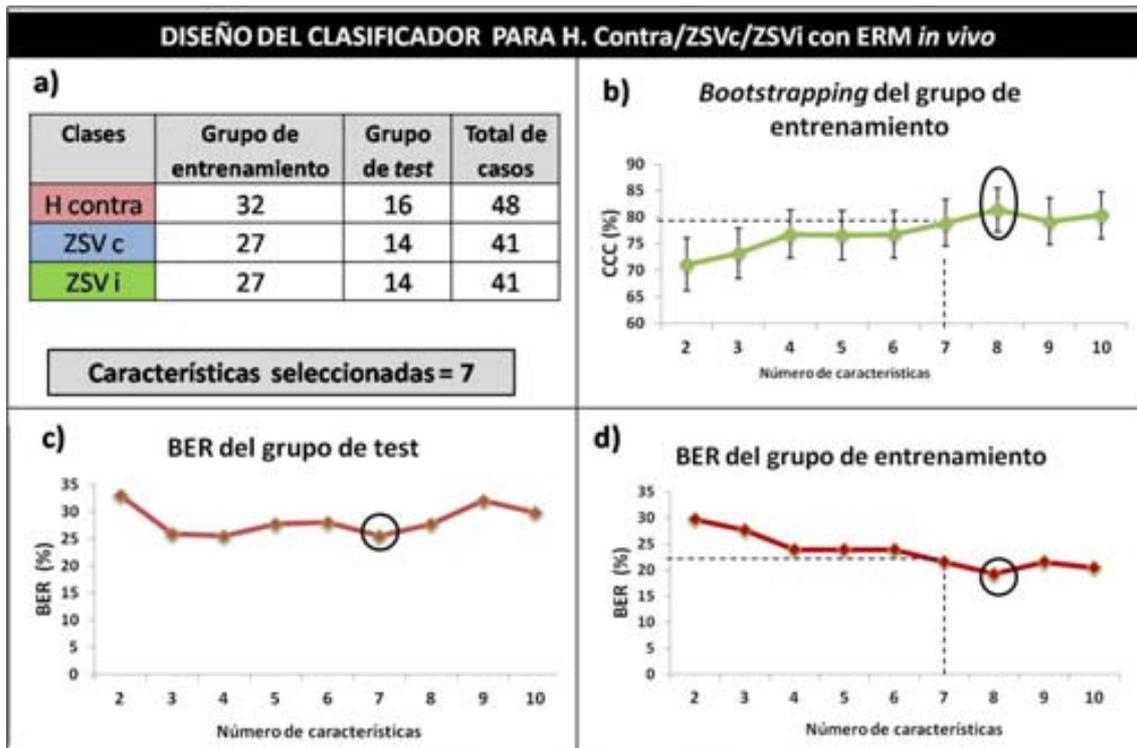


Figura 99: Clasificador desarrollado para diferenciar: H.contralateral, ZSVc y ZSVi. **a)** En la tabla se muestra el número de casos incluidos en cada clase y su asignación a grupo de entrenamiento o grupo de test independiente. El número de características seleccionadas mostrado en el recuadro gris se calcula en base a la combinación que ofrece un mínimo BER en el grupo de test. **b)** El clasificador fue evaluado en sus características descriptivas utilizando el método estadístico de *Bootstrapping* con 1000 repeticiones. En la gráfica se puede observar los casos correctamente asignados (CCC) \pm SD de los casos del grupo de entrenamiento. **c)** El clasificador fue evaluado en sus características predictivas utilizando el *Balanced Error Rate* (BER) del grupo de test independiente según el número de características seleccionadas. En la gráfica el círculo negro indica el número de características que ofrece menor BER **d)** BER del grupo de entrenamiento según el número de características seleccionadas. El círculo negro indica cual sería el número de características idóneo según el grupo de entrenamiento, la línea discontinua indica el BER según el número de características finalmente seleccionado en base al grupo de test.

Característica	Desplazamiento químico	Asignación tentativa de metabolitos
1	3,6208	Mioinositol + valina (3,61ppm)
2	1,2926	Lactato + LM2 (1,29 ppm)
3	2,4876	NAA+ glutamina (2,49/2,44 ppm)
4	1,5629	LM + macromoléculas (1,59 ppm)
5	3,5524	Mioinositol+glicina (3,53/3,55 ppm)
6	2,1848	Metionina (2,19 ppm)
7	3,6501	Mioinositol+ glucosa(3,64 ppm)

Tabla 24: Selección de las 7 características utilizadas para la generación del clasificador organizadas de la característica más a menos relevante con las asignaciones que se les han otorgado según fuente consultada: (Martinez-Bisbal et al. 2004; Valverde-Saubi et al. 2010; Yang et al. 2012)

Ya que se mezclaron en las distintas clases grupos a distintos tiempos se procedió a analizar los casos que se clasifican mal en la Figura 100 entre la ZSVc y la ZSVi para determinar si pertenecían a un punto temporal concreto. Sin embargo, ese no fue el caso, y los casos mal clasificados pertenecían a varios puntos temporales. Se puede determinar como a nivel de ZSVs las que más se mezclan son las ZSVis que son caracterizadas como ZSVc, prácticamente el doble que en el caso contrario (ZSVc que son caracterizadas como ZSVi). También es destacable que no hay ningún caso correspondiente a la ZSVi que se clasifique como H. contralateral.

En este clasificador se puede observar que el grupo peor clasificado es el ZSVi, aunque en ningún caso hay un caso etiquetado como ZSVi que se clasifique como patrón de tejido sano, esto únicamente ocurre en algunos casos de ZSVc. Por lo tanto, el sistema de reconocimiento de patrones permite un cierto nivel de discriminación de las ZSVs entre sí.

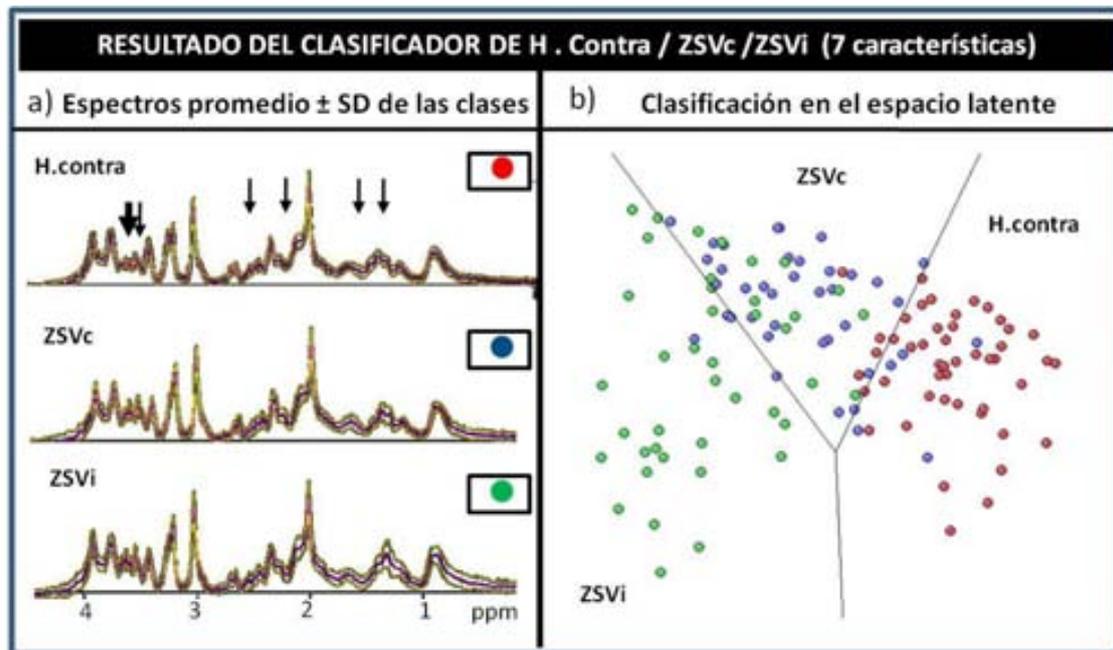


Figura 100: Representación de la clasificación realizada por el sistema SpectraClassifier para la separación de los grupos (HContra, ZSVc+ ZSVi). **a)** Espectros promedio \pm SD para cada una de las clases generadas. Las flechas blancas indica la posición de las características diferenciales. Las bolas rojas corresponden a las que el investigador ha asignado a H.contralateral, las bolas azules a ZSVc y las bolas verdes a ZSVi . **b)** Clasificación que hace el sistema de los casos de entrenamiento + test utilizados para el análisis. Cada línea divisoria son los límites en el espacio latente del espacio que el sistema adjudica a cada clase, indicado por su correspondiente etiqueta.

Un factor a tener en cuenta es la repetición de algunos metabolitos de forma sistemática en los 3 clasificadores (Tabla 25). La característica del mioinositol a 3,62 ppm se selecciona en todos los clasificadores como característica diferencial. Otro metabolito importante en los clasificadores en los que se separa la ZSVi de la ZSVc es el de Lactato+LM2 a 1,29 ppm, el NAA a 2,48 ppm y los LM+ macromoléculas a 1,57 ppm. Mientras que en los clasificadores que contienen datos de infarto un elemento claramente diferenciador es la creatina (3,04 ppm) que también fue destacado en la separación de los datos del infarto a distintos tiempos (Tabla 14).

Metabolitos repetidos en los 3 clasificadores				
Metabolitos	ppm	CLAS Inf/ZSVi/ZSVc/ H.contra	CLAS Inf/ ZSVs/H.contra	CLAS H.contra/ZSVc/ZSVi
Mioinositol + valina	3,62	X	X	X
Creatina	3,04	X	X	
Lactato+LM2	1,29	X		X
NAA + Gln	2,48	X		X
LM + macromoléculas	1,57	X		X

Tabla 25: Tabla resumen de las características diferenciales que se repiten en más de un clasificador en base los resultados obtenidos para los 3 clasificadores desarrollados (Tabla 22 a la Tabla 24).

5.2.3. DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS EN LAS ZONAS SUBVENTRICULARES

Las ZSVs son los principales reservorios de células madre del cerebro. Su capacidad proliferativa se ve afectada por una lesión cerebral. Se ha demostrado un aumento de la proliferación celular como respuesta al daño cerebral, uno de los cuales es la isquemia. En este caso, el aumento es especialmente notable en la ZSVi, siendo la respuesta máxima alrededor de los 7 días, según se indica en el análisis de la literatura que se realizó de forma previa al inicio del trabajo de Tesis (Tabla 3) . Sin embargo, en los animales con oclusión de la ACM evaluados la magnitud del cambio en las ZSVs, especialmente la ZSVi, no fue muy elevada. El único grupo que mostró una proliferación más aumentada en la ZSVi que en la ZSVc, con significación estadística, fue el de 7 días post-isquemia que fue de $1,41 \pm 0,08$ ($p=0,03$). Nuestro resultado estaría en consonancia con los descritos por (Zhang et al. 2001; Zhang et al. 2008a) en los que detectan un aumento de 1,5 veces entre la proliferación a en la ZSVi a 7 días respecto a ratas controles y que es inferior a los descritos por otros autores (recogidos en la Tabla 3 del inicio de esta tesis).

Sin embargo en los otros 2 grupos temporales investigados por nosotros el VC fue inferior: $1,38 \pm 0,09$ para el grupo de 6 días y $1,33 \pm 0,26$ para el grupo de 8 días. Un valor de cambio superior habría permitido esperar diferencias metabólicas mayores entre la ZSVi y la ZSVc.

En cuanto al análisis por ERM, el intento de abordar la detección de CPNs en división de forma no invasiva en el cerebro es una tarea que presenta determinadas limitaciones, una de las principales es que las CPNs están en contacto con otros tipos de células como neuronas, astrocitos... con lo cual el vóxel incluye también estos tipos celulares, por lo tanto, *in vivo*, no se puede obtener un patrón exclusivamente asociado a CPNs.

Por este motivo aparte del estudio de Manganas y colaboradores que se realizó *in vivo* (Manganas et al. 2007) la mayoría de estudios sobre CPNs están realizados en

células en cultivo, para determinar los metabolitos asociados únicamente a este tipo celular (Ramm Sander et al. 2013b).

Hay metabolitos que han sido atribuidos a las CPNs como posibles biomarcadores específicos como son los LM a 1,28 ppm (Manganas et al. 2007). Sin embargo, algunos autores como Ramm y colaboradores (Ramm et al. 2009) han descrito que según la fase de cultivo celular en la que estén las células puede haber variabilidad en la visibilidad aparente de dichos LM, hecho ya descrito también para células tumorales en cultivo (Barba et al. 1999).

Otro hecho diferencial de las CPNs en cultivo es que no hay marcadores de maduración, especialmente NAA (que estaría hacia 2,02 ppm) (Ramm Sander et al. 2013b). En los espectros obtenidos, tanto *in vivo* como *ex vivo* en nuestros resultados se aprecia este metabolito. Esto implica, como era de esperar, que en el *vóxel* o en la muestra de tejido analizada se están promediando otros tipos celulares como neuronas diferenciadas (ya que el NAA es un marcador de neurona madura) que se encuentran adyacentes a la ZSV y que contribuyen al patrón metabólico obtenido.

En nuestros resultados acerca del análisis de la señal de los LM2 por ERM *in vivo* (1,28 ppm), como ya se comentó en el apartado de discusión del infarto (sección 5.1.2), puede relacionarse con cambios debidos a muerte celular, como la que se produce en el infarto. Sin embargo estos LM también fueron propuestos como asociados a procesos de proliferación en el caso de Manganas y colaboradores (Manganas et al. 2007). Así, en dicho artículo, tal como se mencionaba, la resonancia de 1,28 ppm fue propuesta como un marcador específico de las CPNs tanto *in vitro* como *in vivo*. Este artículo, tal y como se comentó también en la introducción (sección 1.7), fue muy cuestionado, ya que otros trabajos especialmente de Ramm y colaboradores (Ramm et al. 2009) asociaron la detección de LM a estrés celular (como confluencia o apoptosis), trabajando con CPNs en cultivo a distintas fases de su curva de crecimiento. Así, en la fase de proliferación exponencial (fase log) los LM no estaban presentes, mientras que aparecían en la fase de confluencia. Además estos LM también se han encontrado en otros tipos de células madre como células madre embrionarias (Ramm et al. 2011) o también en células de glioblastoma (Barba et al.

1999; Ramm et al. 2011). Así mismo, en el trabajo de Lowenbrück y colaboradores (Loewenbruck et al. 2011) asocian la señal de 1,28 ppm a presencia de apoptosis en estas células, ya sea inducida por agentes químicos o la propia existente en pequeño porcentaje entre las células en proliferación.

En los resultados obtenidos en nuestro caso no se encontró correlación entre la detección de la señal de Lac+LM2 a 1,30 ppm *in vivo* en la ZSV con la presencia de células en proliferación (determinadas por Ki67+/mm²), lo cual estaría de acuerdo con los artículos de (Ramm et al. 2009; Loewenbruck et al. 2011; Ramm Sander et al. 2013a) que cuestionan la interpretación de los resultados por ellos obtenidos propuesta por Manganas y colaboradores.

Tampoco se encontró correlación entre las señales de ERM con la apoptosis medible en la zona (TUNEL+/mm²). Ello pudo ser debido probablemente al relativo bajo número de células apoptóticas (en comparación con el número de células en proliferación) en esta zona que hacen que su señal no pueda contribuir apreciablemente al patrón espectroscópico global detectable *in vivo*. Sin embargo, después de varios días de proceso apoptótico (días 6-8 post-infarto) las gotículas lipídicas resultantes de todas las muertes apoptóticas pueden llegar a acumularse, sea en células en apoptosis y de manera extracelular en caso de producirse procesos necroapoptóticos, o en macrófagos que hayan fagocitado a las células anteriormente apoptóticas, posibilitando la detección de los LMap tanto *in vivo* y *ex vivo*.

Por otra parte, en nuestros resultados obtenidos *ex vivo* con la secuencia *Spin echo* en HRMAS, en que se puede analizar el lactato sin la presencia de LM, se detectó un aumento significativo, precisamente en el lactato, a 1 día-F post-infarto en ambas ZSVs respecto a los controles-F no isquémicos, y de forma más prominente en la ZSVi (5,86 veces) que en la ZSVc (2,43 veces).

En la literatura la detección de lactato de las CPNs se ha atribuido a una de las características más significativas de la proliferación celular, su metabolismo energético glicolítico (Candelario et al. 2013). En el cerebro la vía preferente de obtención de energía es la fosforilación oxidativa mitocondrial, que es la vía que permite maximizar la generación de ATP por mol de carbono consumido. Sin embargo, en estudios de

tumores en proliferación se determinó que la vía de obtención energética es otra, lo que se denominó el efecto Warburg (Vander Heiden et al. 2009; Lunt and Vander Heiden 2011). Esta vía implica que las células en proliferación tienden a fermentar la glucosa hasta lactato incluso en presencia de oxígeno suficiente para llevar a cabo la fosforilación oxidativa. Esta vía es relevante para la proliferación ya que Fantin y colaboradores (Fantin et al. 2006) determinaron que la inhibición de la enzima lactato deshidrogenasa, que es la que reduce el lactato a piruvato, impide la proliferación celular en tumores. El requerimiento de la vía glicolítica se hace extensible a cualquier proceso de proliferación y ha sido caracterizada también para células hematopoiéticas (HSCs)(Simsek et al. 2010), en células embrionarias (ESC) y en células pluripotentes inducidas (IPSCs)(Varum et al. 2011).

Sin embargo, al trabajar con un modelo de infarto, que tiene su máximo aumento del lactato a 1 día post-isquemia y el hecho de que la ZSVi tenga el lactato mucho más elevado que la ZSVc podría deberse a un aumento de la proliferación de las CPNs, aunque no se puede descartar también que el aumento de lactato detectado sea por difusión desde la zona de infarto.

Al analizar los datos inmunohistoquímicos también se puede detectar que la proliferación es mayor a los 6-8 días que a 1 día con lo que el aumento del lactato no sería proporcional al número de CPNs, tal y como se puede apreciar en la regresión logística negativa entre Lac+LM2 y células Ki67+/mm² (aunque no sea significativa su relación) (Tabla 21). Por lo tanto, es plausible que su origen en la ZSVi tenga contribución por difusión del lactato de la zona de infarto.

En este caso, sería interesante determinar cómo podría afectar un aumento del lactato extracelular a la proliferación en la zona subventricular. Lampe y colaboradores (Lampe et al. 2009) describieron que el ácido láctico en cultivos de CPNs podría proteger a las células del daño producido por la isquemia de dos maneras: (1) En cultivos con presencia de ácido láctico, que contenían radicales libres el lactato actúa como un secuestrador de éstos y (2) la entrada del ácido láctico a la célula con su posterior conversión a piruvato, es también antioxidante. Además se vio que en los cultivos con presencia de ácido láctico durante 5 días a diferentes concentraciones (en

un rango de 0 a 5 mg/ml), se aumentaba la proliferación celular de manera dosis dependiente medido en contenido de DNA.

Además, es bien sabido que el lactato no es únicamente un producto final de la glicólisis sino que se ha determinado que tiene una función en el mantenimiento energético, ya que puede ser convertido en piruvato y su carbono utilizado en la fosforilación oxidativa. Este uso del lactato ha sido demostrado en el caso de los sistemas astrocitos-neuronas y también respecto al mantenimiento axonal por parte de la oligodendroglía (Sims et al. 2009; Funfschilling et al. 2012). Por lo tanto, a pesar de que no se ha descrito específicamente para las CPNs, podría ser que el lactato influyera en el metabolismo energético que permite esta proliferación (Brooks 2009) y que actuara como molécula señalizadora del aumento de proliferación en la ZSV para contrarrestar los efectos de la isquemia en la zona de infarto (Barros 2013). De este modo, tendría sentido que los mayores niveles de lactato se encontraran a 1 día post-isquemia en la ZSVi. Desde un punto de vista opuesto, Chen y colaboradores (Chen et al.) han demostrado recientemente que un aumento de la concentración de glucosa (fenómeno contrario a un aumento de la concentración de lactato) aumenta la apoptosis y disminuye las células madre neuronales (NSCs) de rata en cultivo

Otro metabolito relevante en casos de evaluación de la variación de la tasa de proliferación es la TCho (3,21 ppm) que en nuestros resultados es el único metabolito que correlaciona con un coeficiente de Pearson de 0,142 con los resultados de proliferación determinados por inmunohistoquímica (Ki67+/mm²) mostrando una tendencia a la significación (p=0,08). La TCho tiene un papel importante como marcador de proliferación celular, estudiada especialmente en el campo de los tumores (Herminghaus et al. 2002). El estudio de la TCho (3,21 ppm) *in vivo* sólo puede ser adscrito de manera genérica a procesos de recambio de membrana sin distinguir sus etapas específicamente (Ramm Sander et al. 2013b).

Al analizar los datos *ex vivo* con HRMAS se pueden detectar todos los compuestos de colina que contribuyen a la señal de TCho *in vivo*. En nuestro caso no se han detectado variaciones aparentes en los compuestos de colina entre ambas ZSVs, en la misma línea de sus correspondientes espectros *in vivo*, en que no hay diferencias

significativas en TCho. En la literatura, algunos estudios apuntaban a un patrón diferencial en las células progenitoras: Jansen y colaboradores (Jansen et al. 2006) compararon cultivos de células madre embrionarias (ESCs) y NSCs y encontraron que en ESCs la señal de PCho era muy elevada y en NSCs no lo era tanto pero igualmente era elevada y prácticamente doblaba la de GPCho, aunque en nuestros resultados no se ha podido detectar un fenómeno parecido en las ratas analizadas por HRMAS post-FMW.

Otro punto destacable de los resultados es que la utilización del análisis de reconocimiento de patrones aplicado a la caracterización de las ZSVs permite distinguirlas con bastante acierto del tejido sano e infartado e incluso producir una discriminación con bastante porcentaje de acierto entre ambas ZSVs. Ello supone un avance claro respecto al análisis metabólico individual *in vivo* que no mostraba ninguna diferencia significativa entre la ZSVc y la ZSVi basándose en un único metabolito. Aunque, de todos modos, el clasificador con mejor resultado global es el que considera las 2 ZSVs como una única clase y las diferencia del tejido sano y del infarto con un acierto de los casos de entrenamiento del $86,10 \pm 3,30\%$ y un valor predictivo medido con el BER para los casos de test independiente de $7,2\%$.

El clasificador que mejor separa las 2 zonas subventriculares es el que separa 3 clases: H.contralateral/ZSVc/ZSVi ya que mostró una clasificación correcta de los casos de entrenamiento del $74,19 \pm 8,5\%$ para la ZSVc y del $73,68 \pm 8,84\%$ para la ZSVi que mejoraba la separación de ambas zonas ya que en el clasificador H.contralateral/ZSVc/ZSVi/Infarto era de $55,58 \pm 9,83\%$ en la ZSVc y $59,47 \pm 9,57\%$ en la ZSVi. Sin embargo a la hora de analizar casos de test independiente el valor del BER es elevado ($25,6\%$). Esto es debido a que al ser las 3 clases similares a nivel espectroscópico, en todas las clases establecidas en el clasificador hay casos de test que se clasifican mal y esto aumenta el porcentaje de error global, aun así son las características diferenciales más optimizadas.

Aunque la clasificación se establece en base a la variación de diferentes características de forma conjunta, el análisis de los metabolitos implicados puede poner de relieve algunos metabolitos clave en el metabolismo de las CPNs. Así, algunas

de las características espectrales que ha determinado el sistema de RP y que no han sido analizados de forma individual en la discusión precedente son:

El mioinositol: Su resonancia a 3,62 ppm es seleccionada en los 3 clasificadores para la separación de clases. El mioinositol es un compuesto orgánico presente en el citosol celular. Sus funciones en la actualidad no están totalmente claras pero está considerado un marcador de células gliales maduras, funciona como un osmolito y su concentración se encuentra alterada en varias patologías cerebrales, como por ejemplo, a causa de la hipoxia (Cirstea et al. 2012). Actúa como osmolito ya que, durante los procesos de estrés osmótico el equilibrio osmótico se preserva por su transporte a través de membrana y también participa en la formación de mielina. Cuando se daña la mielina, el mioinositol libre se encuentra incrementado (Haris et al. 2011). El hecho de que sea clave en la separación por RP de las ZSVs con respecto a la zona de infarto y tejido sano puede estar relacionado con el hecho de que las células madre tienen marcadores astrocíticos (Doetsch et al. 1999). En un artículo de Jansen y colaboradores (Jansen et al. 2006) éstos determinaron que en preparaciones de células madre neuronales éstas tenían un contenido elevado en mioinositol. Aparte, los astrocitos son componentes importantes de los nichos neurogénicos (Cao et al. 2013) cosa que también puede ser causa de un incremento en los niveles de mioinositol que tal y como se puede apreciar en la Figura 98, en nuestros resultados aparecen elevados en los espectros promedio de las ZSVs comparados con el hemisferio contralateral y el infarto.

El lactato + LM2 (1,29 ppm) también permite separar las distintas clases pero, curiosamente, únicamente en los clasificadores en que la ZSVi se encuentra separada de la ZSVc. En cambio, cuando las 2 ZSV se analizan conjuntamente este metabolito no es seleccionado para diferenciarlas del infarto o del hemisferio contralateral. Este resultado está en la misma línea de los resultados mostrados por HRMAS en que el único metabolito que variaba entre la ZSVc y la ZSVi era el lactato. La posible explicación de este hecho es que la ZSVi recibe mayor contribución del lactato, por ejemplo, proveniente del infarto que la ZSVc, tal y como hemos comentado anteriormente.

Los otros metabolitos que se repiten en los 2 clasificadores que separan ZSVc de ZSVi son:

El NAA+ Gln (2,48 ppm) que corresponden a las resonancias del aspartato del NAA y de un metileno de la Gln respectivamente. Su intensidad es relativamente baja. Las variaciones tanto del NAA como de la Gln podrían estar relacionadas con el metabolismo de las CPNs. Sin embargo, el hecho de que la diferencia no se haya detectado en sus resonancias principales, es decir, los cambios en el NAA a 2,02 ppm que corresponde a la parte acetyl de la molécula y es la de mayor intensidad en un espectro de cerebro sano. O detectar cambios en la glutamina en las resonancias de 2,10 ppm o 3,75 ppm que son otras más intensas que la de 2,44 ppm parece indicar que el cambio es fruto de una combinación de ambas e incluso de otras resonancias, por lo tanto, no se considera que su función como metabolito diferenciador de zona de células en proliferación esté muy claro.

Los LM a 1,57 ppm, cuya resonancia corresponde a la segunda posición del metilo desde el extremo carboxilo de la molécula $\text{CH}_2(2)\text{-CH}_2(1)\text{-COOH}$ (Figura 41). Esta característica indica que puede haber cambios en el contenido lipídico de la célula aunque de igual modo que en el caso de la resonancia de NAA+Gln, no es la resonancia más visible de LM como puede ser la de 1,28 ppm, por lo tanto el cambio detectado en esta posición, puede ser debido a la contribución de varias sustancias simultáneamente, por ejemplo de aminoácidos en algunas proteínas de bajo peso molecular (Kauppinen et al. 1992).

En resumen, no se ha podido corroborar que la señal a 1,28 ppm sea un biomarcador de CPNs como propusieron Manganas y colaboradores (Manganas et al. 2007). Los cambios en la resonancia de Lac+LM2 (1,28 ppm) en todo caso serían atribuibles al lactato más que a LM2, como se ha podido demostrar mediante los estudios de HRMAS. Así mismo, no sería un biomarcador de proliferación de CPNs, sino que podrían actuar quizás como causa, más que como efecto, del aumento de la proliferación en nuestro modelo de infarto cerebral en rata. El metabolito analizado en nuestros resultados que más se ajusta a un posible biomarcador de proliferación de CPNs sería la TCho (3,21 ppm) que muestra una correlación con tendencia a la

significación y en caso de tumores es utilizada como un biomarcador de proliferación (Herminghaus et al. 2002). Finalmente, el uso de técnicas de RP, basadas en el análisis simultáneo de varios metabolitos, permite establecer diferencias entre las ZSVc y la ZSVi que no son posibles mediante el análisis metabólico individual.

5.3. Administración de terapia

Una de las aplicaciones más interesantes que puede tener la espectroscopía a nivel clínico es el ser una herramienta útil para valorar los cambios bioquímicos que se producen en el cerebro de forma longitudinal, por ejemplo, en el caso de la administración de una terapia concreta.

Es por ese motivo que, una vez caracterizado por imagen y espectroscópicamente el modelo de rata con infarto, se procedió a administrar terapia y valorar tanto por ERM como por inmunohistoquímica las diferencias entre los animales tratados y no tratados.

La terapia administrada fue el fármaco Citicolina (CDP-Colina) suministrado por la empresa Ferrer Internacional S.A., que estaba valorando en pacientes los efectos del fármaco administrado en la etapa aguda del ictus.

En la bibliografía (Secades 2012) estaba descrito que la Citicolina tenía efectos sobre la proliferación de las células progenitoras neuronales en las ZSVs y también en el tamaño final de la lesión.

A los animales a los que se les administró terapia se marcó el grupo con una C (de Citicolina). Los 2 grupos experimentales fueron a 1 día-C post-isquemia y a 7 días-C post-isquemia. La administración de Citicolina se realizó según se ha descrito en el apartado 4.2.

5.3.1. Análisis comparativo por imagen de resonancia magnética

En primer lugar se realizó el análisis por IRM para determinar si había variaciones en el volumen de infarto y el edema entre el grupo tratado y no tratado. Los resultados de la Figura 101y Tabla 26indican que no hay cambios significativos entre los animales tratados y los no tratados en ninguno de los 2 parámetros. Se detecta en el volumen de infarto del grupo 7 días-C una mayor variabilidad del tamaño

de infarto, que incluye infartos menores y mayores que el grupo control. A pesar de no ser estadísticamente significativos los cocientes animales tratados/no tratados indican que los animales tratados tienen ligeramente mayor volumen y mayor edema que los no tratados.

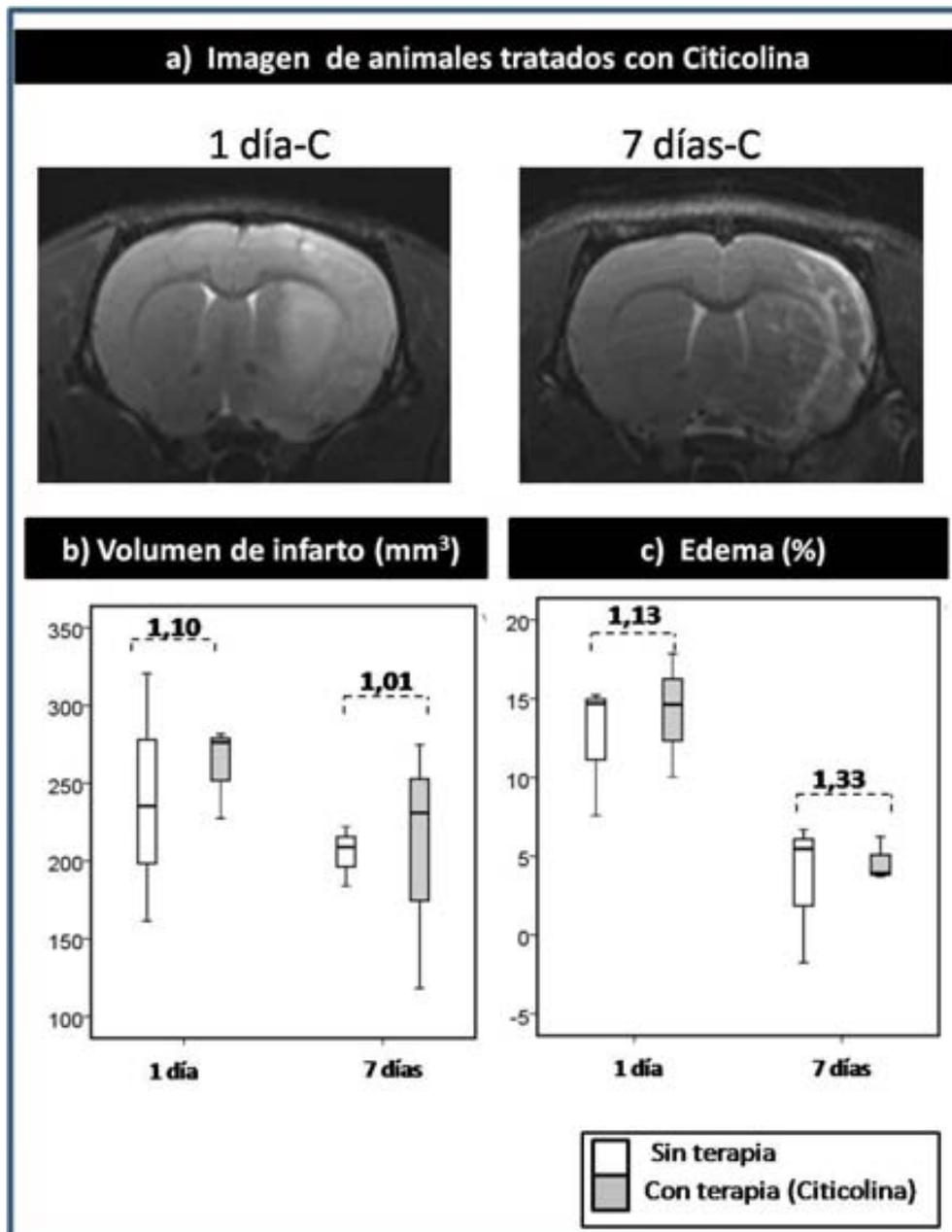


Figura 101: Características de los animales tratados con Citicolina. **a)** Imagen T₂ donde se puede evaluar la reducción del volumen de infarto de un animal del grupo 1 día-C y del grupo 7 días-C. **b)** Diagramas de caja comparativos del análisis de los volúmenes de infarto y del porcentaje de edema a 1 día y 7 días para los grupos tratados con Citicolina (gris) y no tratados (blanco). En este caso no se determinaron diferencias significativas entre los animales tratados y no tratados utilizando el test estadístico T de Student.

GRUPO	VARIABLE	Sin Terapia (promedio±SD)	Con Terapia (promedio±SD)	Cociente (Terapia/Si n Terapia)	Significación (p<0,05)
1 día	Volumen (mm ³)	239,16 ± 79,66	261,71 ± 29,80	1,10	0,67
	Edema (%)	12,50 ± 4,27	14,18 ± 3,93	1,13	0,64
7 días	Volumen (mm ³)	204,98± 29,80	207,93 ± 80,77	1,01	0,96
	Edema (%)	3,48 ± 4,57	4,64 ± 1,41	1,33	0,70

Tabla 26: Tabla comparativa de valores de volumen de infarto y edema de los análisis de las imágenes de infarto en los animales tratados con Citicolina y no tratados a 1 y 7 días. Se analizaron los parámetros de volumen de infarto y % de edema y se expresaron los cocientes entre los animales tratados y sin tratar. En este caso no se hallaron diferencias significativas entre los animales tratados y no tratados utilizando el test estadístico T de Student.

5.3.2. Análisis de las Zonas Subventriculares

El objetivo del análisis de las ZSVs era determinar si el tratamiento con Citicolina aumentaba el número de CPNs en proliferación en comparación con el grupo no tratado. Para determinarlo se llevó a cabo el análisis mediante inmunohistoquímica para determinar las células en proliferación y también las células en apoptosis en la ZSV.

5.3.2.1. Análisis inmunohistoquímico en las zonas subventriculares

En el análisis inmunohistoquímico de las ZSVs (Figura 102 y Tabla 27) en la proliferación de las CPNs detectada por marcaje celular con Ki67 no hubo cambios significativos entre los animales tratados con Citicolina y los no tratados. Además los valores de la proliferación eran muy similares a la detectada en los animales sanos (barra azul en la gráfica de la Figura 102 y que se podría considerar apoptosis basal).

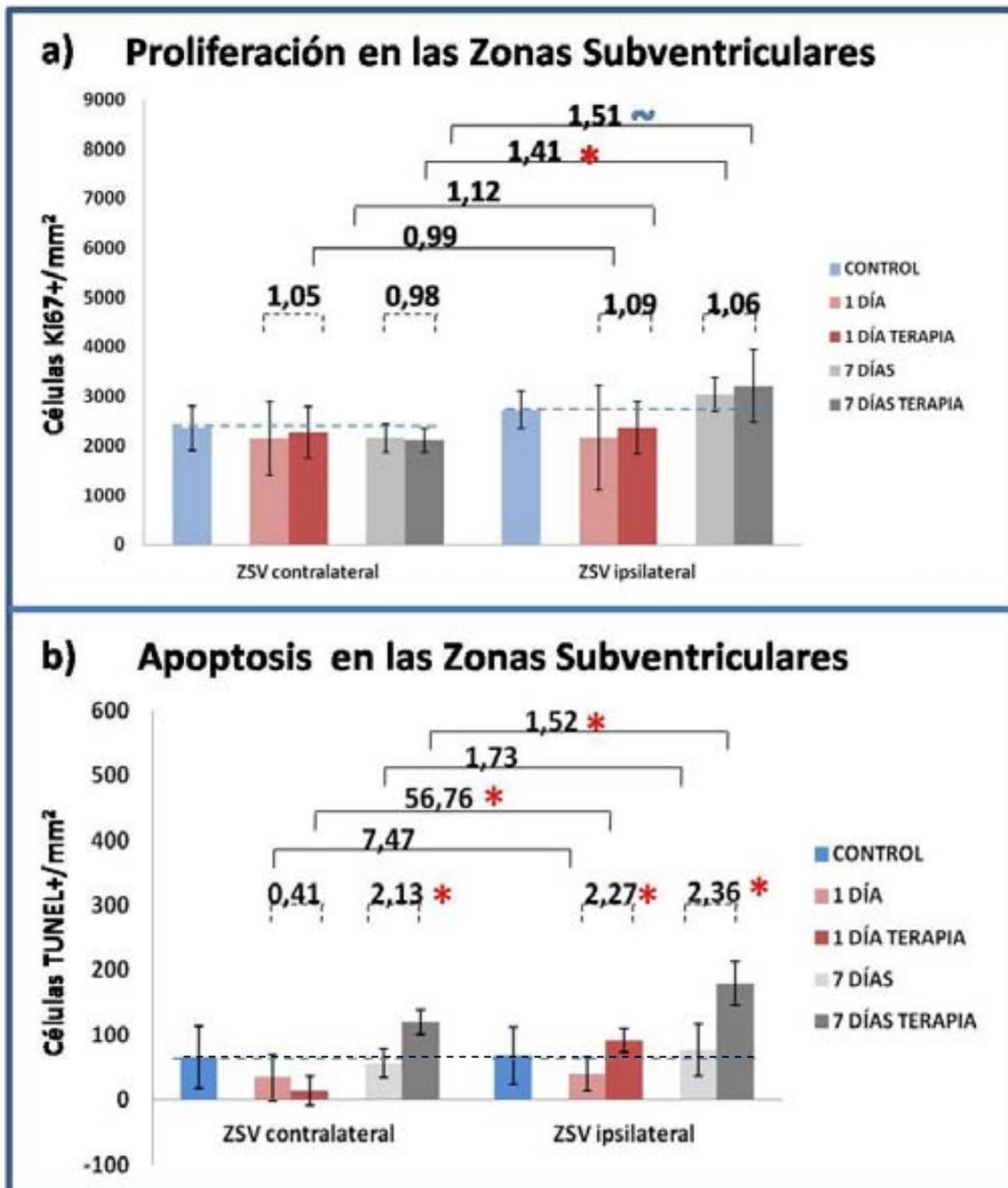
A los 7 días post-isquemia se observó tanto para los animales tratados como no tratados un aumento de la proliferación en la ZSVi respecto a la ZSVc (como era de

esperar). En el caso de los animales no tratados el valor de cambio era de $1,41 \pm 0,08$ ($p=0,02$) y en los tratados, el cambio no era significativo, pero tenía tendencia a la significación y era de $1,51 \pm 0,22$ ($p=0,08$).

En cuanto a los datos de apoptosis (determinados por tinción con TUNEL+) el efecto de la Citicolina aumenta la apoptosis de forma significativa en ambas ZSVs a los 7 días post-isquemia y en la ZSVi a 1 día post-isquemia. En todos los casos la apoptosis estaba aumentada un poco más del doble en los animales tratados respecto a los no tratados: cociente de 2,27 en la ZSVi a 1 día, cociente de 2,13 en la ZSVc a 7 días y 2,36 a 7 días en la ZSVi.

Sin embargo en valores absolutos era similar a la que podía haber en la ZSV de los animales sanos indicada por la línea discontinua de la Figura 102b) a excepción de los valores de apoptosis más elevados que se encontraron a los 7 días post-infarto, especialmente en la ZSVi.

En cuanto al análisis de los valores de cambio entre la ZSVi y la ZSVc para cada grupo se puede observar cómo la apoptosis es más elevada en la ZSVi que en la ZSVc a 1 día y a 7 días tanto en los animales tratados como no tratados (hay un valor de cambio en el grupo 1 día-C que es muy elevado en comparación con el resto de grupos es de $56,76 \pm 48,70$ ($p=0,01$) (Figura 102b). El cociente tan elevado es debido a que en 2 de los 3 animales utilizados en el análisis inmunohistoquímico no se detectaron células apoptóticas en la ZSVc y se le asignó el valor de 1 para calcular el valor de cambio. Esto implica que en esos 2 animales los valores de cambio eran muy elevados y como consecuencia el valor final del promedio sea muy elevado y, probablemente, es una sobrevaloración del valor de cambio real.



Inmunohistoquímica de las zonas subventriculares (células /mm ²)						
TINCIÓN	DÍA	ZONA	Sin terapia	Con Terapia	Cociente (terapia/ sin terapia)	Significación (p< 0,05)
Ki67	1 día	ZSV contra	2150 ± 751	2264 ± 531	1,05	0,84
		ZSV ipsi	2163 ± 1048	2368 ± 531	1,09	0,78
	7 días	ZSV contra	2158 ± 277	2115 ± 243	0,98	0,85
		ZSV ipsi	3037 ± 341	3209 ± 744	1,06	0,73
TUNEL	1 día	ZSV contra	35 ± 36	14 ± 23	0,41	0,45
		ZSV ipsi	40 ± 26	92 ± 19	2,27	0,05 *
	7 días	ZSV contra	56 ± 21	120 ± 19	2,13	0,02 *
		ZSV ipsi	76 ± 40	179 ± 34	2,36	0,03 *

Tabla 27: Recuentos inmunohistoquímicos para las ZSVs en cuanto a nivel de proliferación (Ki67+/mm²) y apoptosis (TUNEL+/mm²). Cálculo del cociente entre los animales tratados y no tratados. Los cambios significativos se indican con * (p<0,05). Test estadístico aplicado: T de Student.

5.3.2.2. Análisis del patrón metabólico de las zonas subventriculares

Se analizaron los cambios detectados en los metabolitos en las ZSVs entre animales tratados y no tratados (Figura 103, Figura 104 y Tabla 28) y sólo se determinaron 2 cambios significativos. Concretamente, un aumento en los animales tratados de Lac + LM2 (1,30 ppm) de 1,66 (p=0,01) a 1 día post-isquemia en la ZSVi y a los 7 días post-isquemia en la ZSVc una disminución de los LMap de 0,40 (p=0,04).

Si se comparan estos resultados con los obtenidos por inmunohistoquímica en la Figura 102: coincide en que en estos puntos experimentales se detectan diferencias significativas en la apoptosis de las células. Concretamente la apoptosis en la ZSVi a 1 día post-isquemia aumenta en 2,27 respecto a animales no tratados y en la ZSVc en 2,13 veces a los 7 días post-isquemia. En este sentido el cambio en la señal del Lactato + LM2 (1,30 ppm) podría estar relacionado con el aumento de la apoptosis y, en

cambio, la variación en la señal de los LMap (2,80 ppm) iría en sentido inverso al esperado, ya que a más apoptosis disminuye la señal.

Sin embargo para determinar si los cambios en la señal de ERM eran específicos habría que tener en cuenta 3 factores:

- En los estudios de correlación inmunohistoquímica realizados en apartados anteriores se consideró que la apoptosis en la ZSV, que sucede en un número relativamente bajo de células comparándolo con el número de células en proliferación. probablemente esté por debajo del nivel de detección de la técnica y no se detectó que ninguna señal correlacionara con apoptosis en la ZSV.

- La señal de los LMap (2,80 ppm) en la ZSV analizada con ERM *in vivo* es muy cercana a la señal del ruido, con lo que su valor puede ser equívoco. Además a 1 día post-isquemia es difícil determinar si la contribución diferencial a la resonancia es debida a los LMap o al aspartato que aparece en la misma región del espectro.

- Hay también un cambio significativo en cuanto al aumento de la apoptosis en los animales a lo que se ha administrado terapia (Figura 102) que es del 2,36 veces ($p=0,03$) en la ZSVi a los 7 días post-isquemia. Sin embargo, para este caso, no se ha detectado ningún cambio espectroscópico significativo en los metabolitos (ni en Lac+LM2a 1,30 ppm ni en LMap 2,80 ppm).

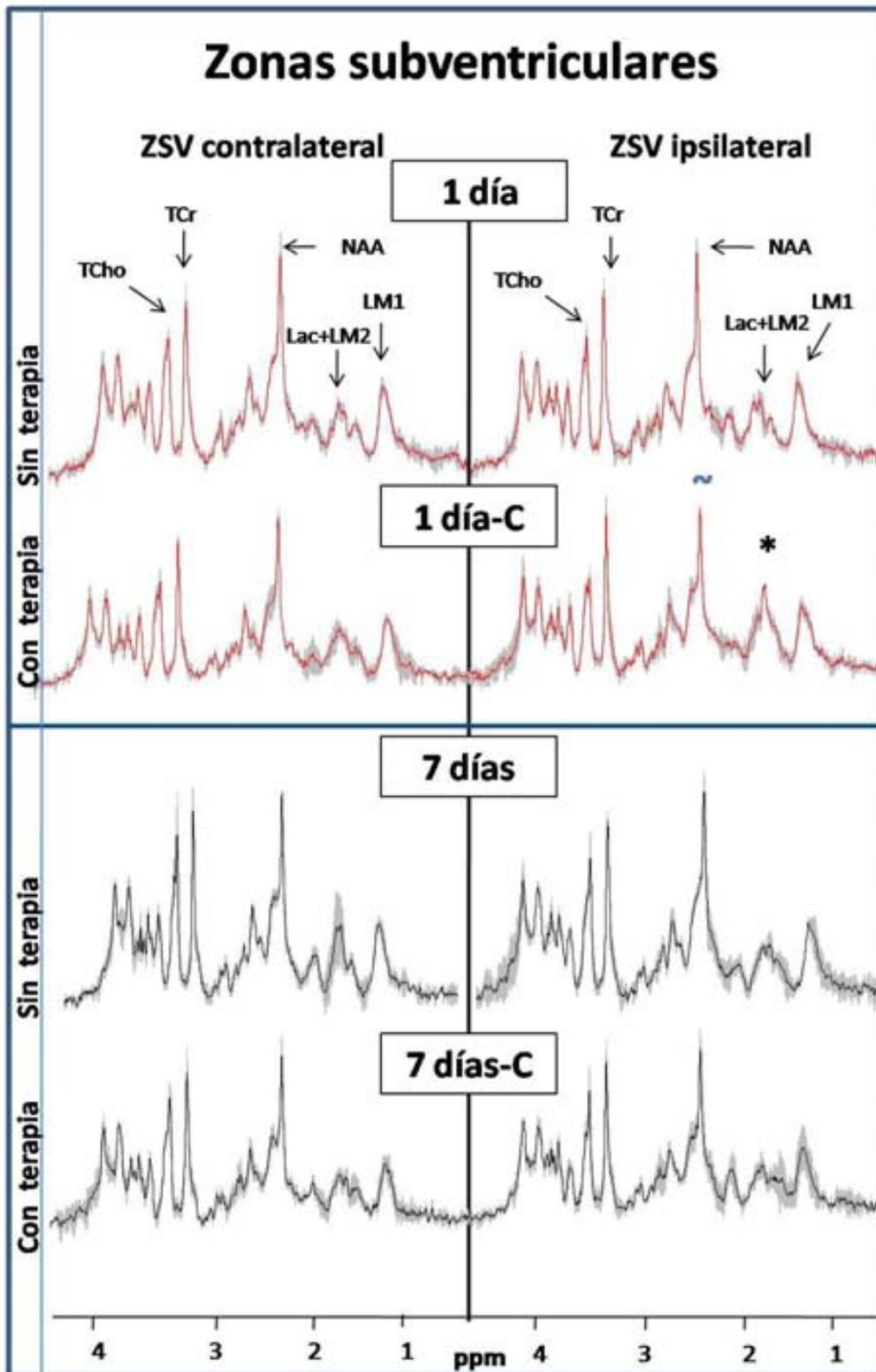


Figura 103: Espectro promedio \pm SD (sombreado en gris) de las ZSVs para los animales no tratados y tratados con Citicolina a 1 y 7 días post-infarto. Se comparan las resonancias entre los animales tratados y no tratados. El símbolo * indica cambio significativo ($p \leq 0,05$) y el símbolo ~ indica tendencia a la significación ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico utilizado: T de Student. .

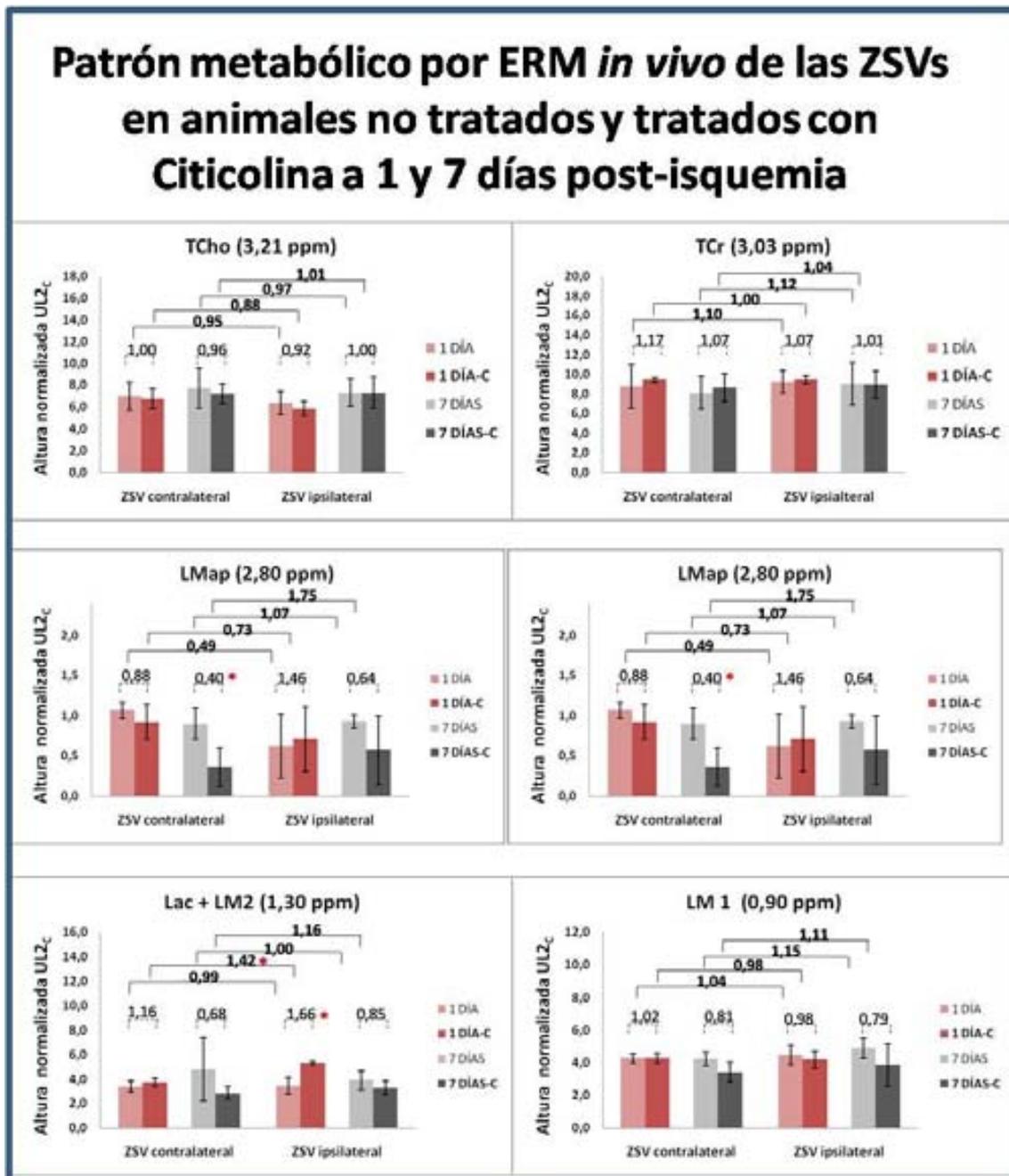


Figura 104: Gráficas promedio \pm SD de las ZSVs para los animales no tratados y tratados con Citicolina a 1 y 7 días post-infarto . Las líneas continuas horizontales indican los valores de cambio entre la ZSVc y la ZSVi. Las líneas horizontales discontinuas indican los cambios entre terapia y no terapia .Se comparon los metabolitos con variación entre los no tratados y tratados. El símbolo * indica cambio significativo ($p < 0,05$) y el símbolo ~ indica tendencia a la significación ($0,05 < p < 0,10$).

Cocientes de los metabolitos en las ZSVs entre: promedio animales tratados /promedio animales no tratados					
METABOLITO	GRUPO	ZSV contralateral	Significación (p < 0,05)	ZSV ipsilateral	Significación (p < 0,05)
Colina (3,21 ppm)	1 día	1,00	0,26	0,92	0,48
	7 días	0,96	0,71	1,00	0,99
Creatina (3,03 ppm)	1 día	1,17	0,65	1,07	0,84
	7 días	1,07	0,70	1,01	0,96
LMap (2,80 ppm)	1 día	0,88	0,14	1,46	0,36
	7 días	0,40	0,04*	0,64	0,23
NAA (2,02 ppm)	1 día	1,05	0,90	0,92	0,15
	7 días	0,95	0,60	1,01	1,00
Lactato+LM2 (1,30 ppm)	1 día	1,16	0,36	1,66	0,01 *
	7 días	0,68	0,27	0,85	0,33
LM1 (0,90 ppm)	1 día	1,02	0,53	0,98	0,97
	7 días	0,81	0,13	0,79	0,29

Tabla 28: Valores promedio \pm SD de las ZSVs para los animales no tratados y tratados con Citicolina a 1 y 7 días post-infarto. Los datos están expresados en cocientes entre los animales tratados y no tratados. El símbolo * indica cambio significativo ($p < 0,05$). Test estadístico aplicado: T de Student.

Para determinar mejor los cambios bioquímicos que se producían en estas zonas también se analizaron los valores de cambio entre la ZSVi y la ZSVc en animales tratados y no tratados para ver las señales que se modificaban (Tabla 29).

En los resultados del análisis de los valores de cambio entre la ZSVi y la ZSVc para cada grupo sólo hay un metabolito que cambie de forma significativa que es el Lac+LM2 (1,30 ppm) a 1 día post-isquemia en los animales tratados con Citicolina, con un aumento del $1,42 \pm 0,13$ ($p < 0,01$) respecto a la ZSVc. En esta misma zona también se detectó una tendencia de cambio en el N-acetilaspártato (2,02 ppm) que disminuía a $0,89 \pm 0,05$ ($p = 0,08$). Este valor de cambio con significación estadística se produce en el animal con un cambio en la apoptosis medido en $56,76 \pm 48,70$ ($p = 0,01$).

Es importante resaltar que los cambios significativos o con tendencia a la significación en el patrón metabólico son en los únicos casos en los que se detectan diferencias significativas entre la ZSVi y la ZSVc en el número de células apoptóticas (Figura 102b).

Valores de cambio entre zona ZSVi y ZSVc en animales no tratados y tratados con Citicolina					
METAB.	DÍA	NO TRATADOS	Sig. (p<0,05)	TRATADOS	Sig. (p< 0,05)
TCho (3,21ppm)	1 día	0,95 ± 0,03	0,58	0,88 ± 0,13	0,23
	7 días	0,97 ± 0,17	0,77	1,01 ± 0,11	0,94
TCr (3,03 ppm)	1 día	1,10 ± 0,20	0,76	1,00 ± 0,10	0,97
	7 días	1,12 ± 0,15	0,59	1,04 ± 0,09	0,79
LMap (2,80 ppm)	1 día	0,49 ± 0,28	0,97	0,73 ± 0,27	0,14
	7 días	1,07 ± 0,29	0,09 ~	1,75 ± 1,53	0,79
NAA (2,02 ppm)	1 día	1,01 ± 0,17	0,84	0,89 ± 0,05	0,08 ~
	7 días	0,97 ± 0,09	0,77	1,02 ± 0,04	0,68
Lac+LM2 (1,30 ppm)	1 día	0,99 ± 0,08	0,91	1,42 ± 0,13	<0,01 *
	7 días	1,00 ± 0,53	0,59	1,16 ± 0,13	0,40
LM1 (0,90 ppm)	1 día	1,04 ± 0,06	0,60	0,98 ± 0,18	0,78
	7 días	1,15 ± 0,12	0,20	1,11 ± 0,23	0,63

Tabla 29: Valores de cambio promedio ± SD de los principales metabolitos en las zonas subventriculares para los animales no tratados y tratados con Citicolina a 1 y 7 días post-infarto. Los datos están expresados en cocientes entre los animales tratados y no tratados. EL símbolo * indica cambio significativo (p<0,05) y el símbolo ~ indica tendencia a la significación (0,05<p<0,10).

5.3.3. Análisis de la zona de infarto

Los resultados por imagen MRI mostraron que no había diferencias significativas entre animales tratados y no tratados en cuanto a datos de volumen de infarto y edema.

Se realizaron los estudios de inmunohistoquímica y ERM en la zona de infarto para ver si se detectaban diferencias debidas a la administración de Citicolina que no eran apreciables mediante MRI.

5.3.3.1. Análisis inmunohistoquímico en el territorio de la ACM

En la zona de infarto y en el hemisferio contralateral el análisis inmunohistoquímico que se llevó a cabo fue para determinar la apoptosis mediante tinción con TUNEL.

En los resultados obtenidos para la cuantificación de la apoptosis en el territorio de la ACM mostrados en la Figura 105 y la Tabla 30 el cambio más remarcable es el que se produce en la zona del infarto a los 7 días post-isquemia, en el que a pesar de la gran variabilidad de la apoptosis en los animales del grupo a los que se les administró la terapia, se observó que había una disminución significativa de la apoptosis de unas 3 veces (cociente de animales tratados/no tratados= 0,31) ($p=0,04$).

En cambio en el grupo de 1 día post-isquemia tratado a pesar de no haber diferencias significativas debido a una elevada SD del grupo sin terapia, ello sugeriría que en los animales tratados pudiera haber más apoptosis, 1,67 veces ($p=0,27$).

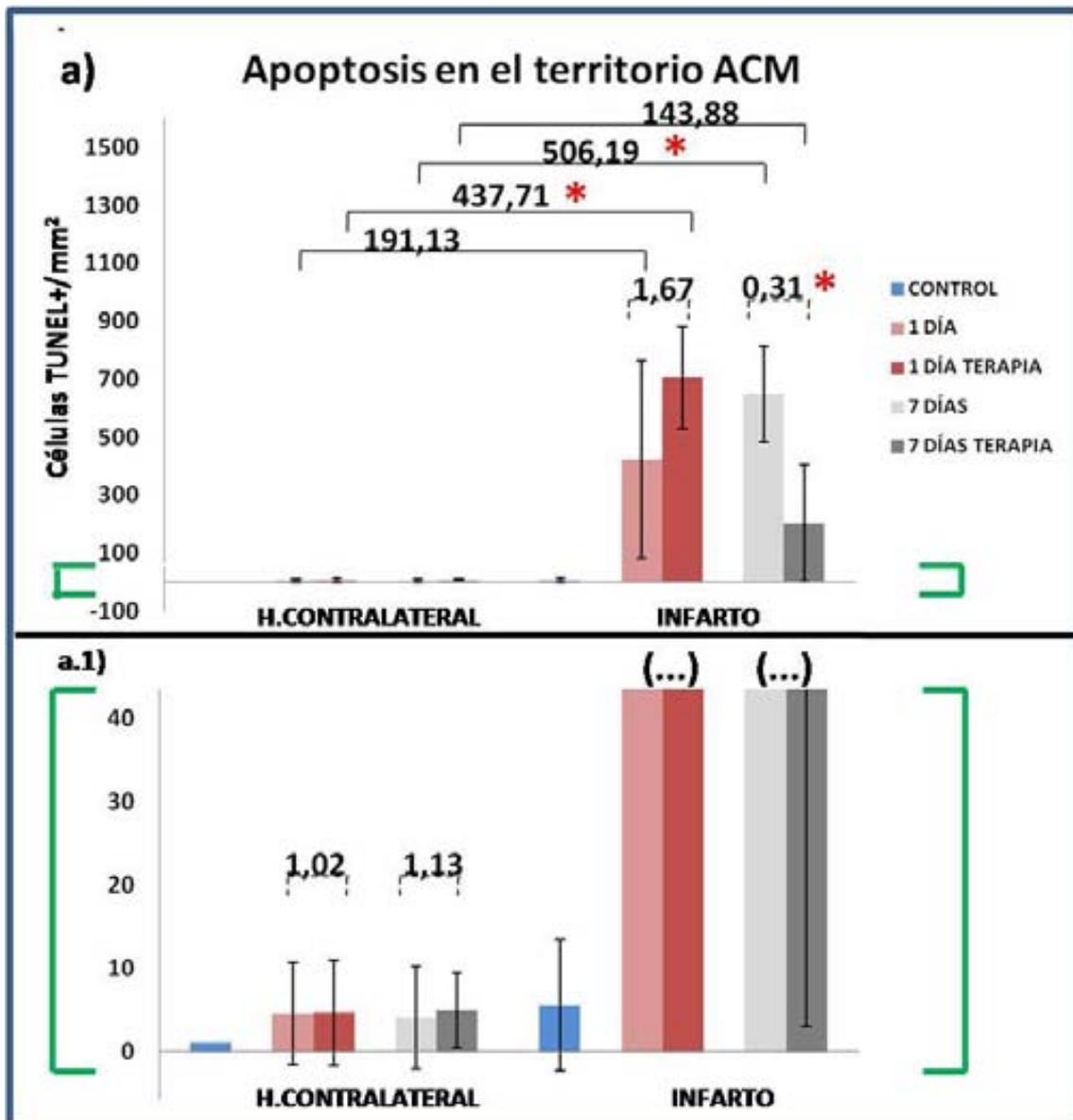


Figura 105: Gráfica de los resultados de apoptosis obtenidos por inmunohistoquímica **a)** Valores de apoptosis promedios \pm SD (TUNEL +/mm²) en la ZSVi y la ZSVc. Cálculo de los valores de cambio entre la región de la ZSVi y la ZSVc. Los cambios significativos se expresan como * ($p < 0,05$),. **a.1)** Expansión de la gráfica en la región correspondiente a la señalada en la región marcada en verde en a) En los gráficos se ha incluido una barra de histograma azul que corresponde a datos en animales sanos para determinar si los valores en animales tratados o no son eran muy distintos a los de un animal sano.

Inmunohistoquímica del territorio de la arteria cerebral media						
TINCIÓN	DÍA	ZONA	No tratados	Tratados	Cociente (tratados/no tratados)	Significación (p< 0,05)
TUNEL	1 día	H.contra	5 ± 6	5 ± 6	1,02	0,98
		Infarto	422 ± 340	706 ± 177	1,67	0,27
	7 días	H.contra	4 ± 6	5 ± 5	1,13	0,90
		Infarto	649 ± 165	204 ± 201	0,31	0,04 *

Tabla 30: Valores de apoptosis promedio \pm SD (TUNEL+/mm²) en el territorio de la ACM. Cálculo de los valores de cambio entre la región del infarto y del hemisferio contralateral. Los cambios significativos se expresan como * (p<0,05). Test estadístico aplicado: T de Student.

5.3.3.2. Análisis metabólico en el territorio de la ACM

El análisis de los principales metabolitos mediante ERM no mostró diferencias significativas entre los animales tratados y no tratados a excepción de un caso: a 1 día post-isquemia se detectó un aumento significativo de 1,54 veces (p= 0,01) en los niveles de Lac+LM2 (1,30 ppm) en los animales tratados con Citicolina (espectros en la Figura 106, gráficas en la Figura 107 y cocientes animales tratados/no tratados en la Tabla 31).

Este cambio detectado en la zona de infarto corresponde al grupo que a nivel inmunohistoquímico presentaba un aumento no significativo de la apoptosis en la zona de infarto de 1,67 veces (p=0,27) (Tabla 30) y que a nivel de imagen por MRI tenía un aumento del volumen de infarto no significativo de 1,10 veces y del edema de 1,13 veces (Tabla 26). Por lo tanto parece indicar que pudiera haber una relación proporcional entre la apoptosis y los niveles de lactato + LM2.

Esta relación entre el Lactato+LM2 y la apoptosis también se puede evidenciar en el grupo de 7 días post-isquemia en que, a pesar de no ser significativo, hay una disminución de los niveles de lactato del 0,57 (p=0,17) entre los animales tratados y no

tratados que es donde analizando los resultados de apoptosis hay una disminución significativa de la apoptosis del 0,31 ($p=0,04$).

Otro metabolito que disminuye en la zona de infarto a los 7 días post-isquemia, son los LMap (2,80 ppm), el marcador que en el apartado 5.1.2 se ha propuesto como biomarcador de la apoptosis acumulativa en la etapa subaguda/crónica. En este caso la disminución tampoco es significativa debido a una elevada SD pero el cociente es de 0,58 ($p=0,34$).

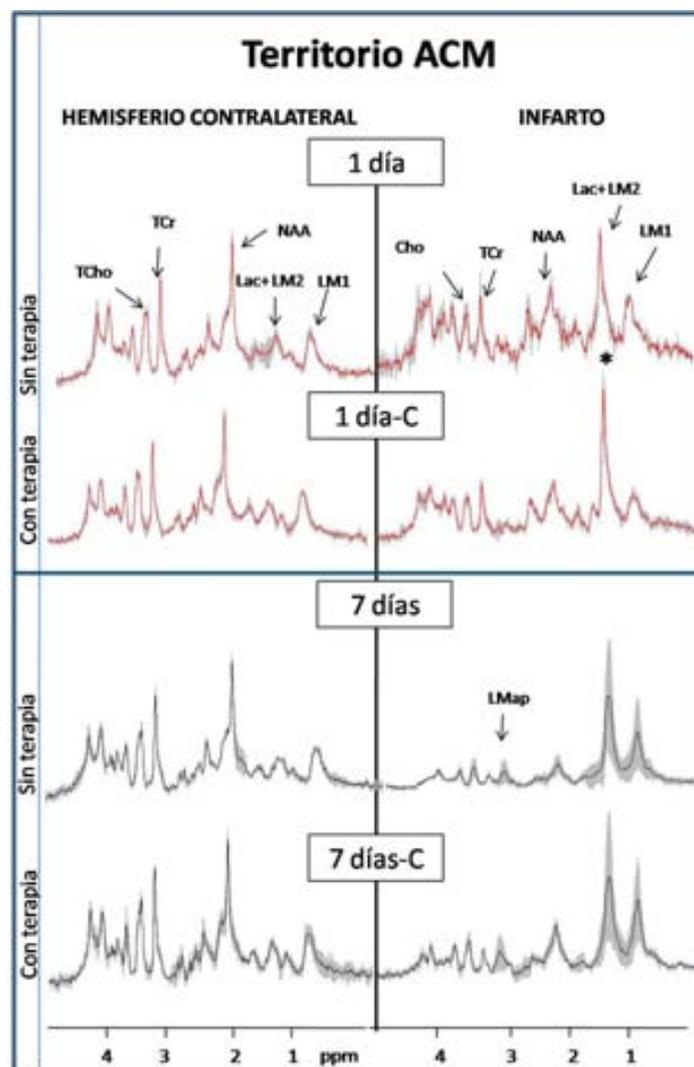


Figura 106: Espectros promedio \pm SD en gris de las zonas del territorio de la ACM para los animales no tratados y tratados con Citicolina a 1 y 7 días post-infarto. Se comparan los metabolitos con variación entre los no tratados y tratados. El símbolo * indica cambio significativo ($p<0,05$). Test estadístico aplicado: T de student.

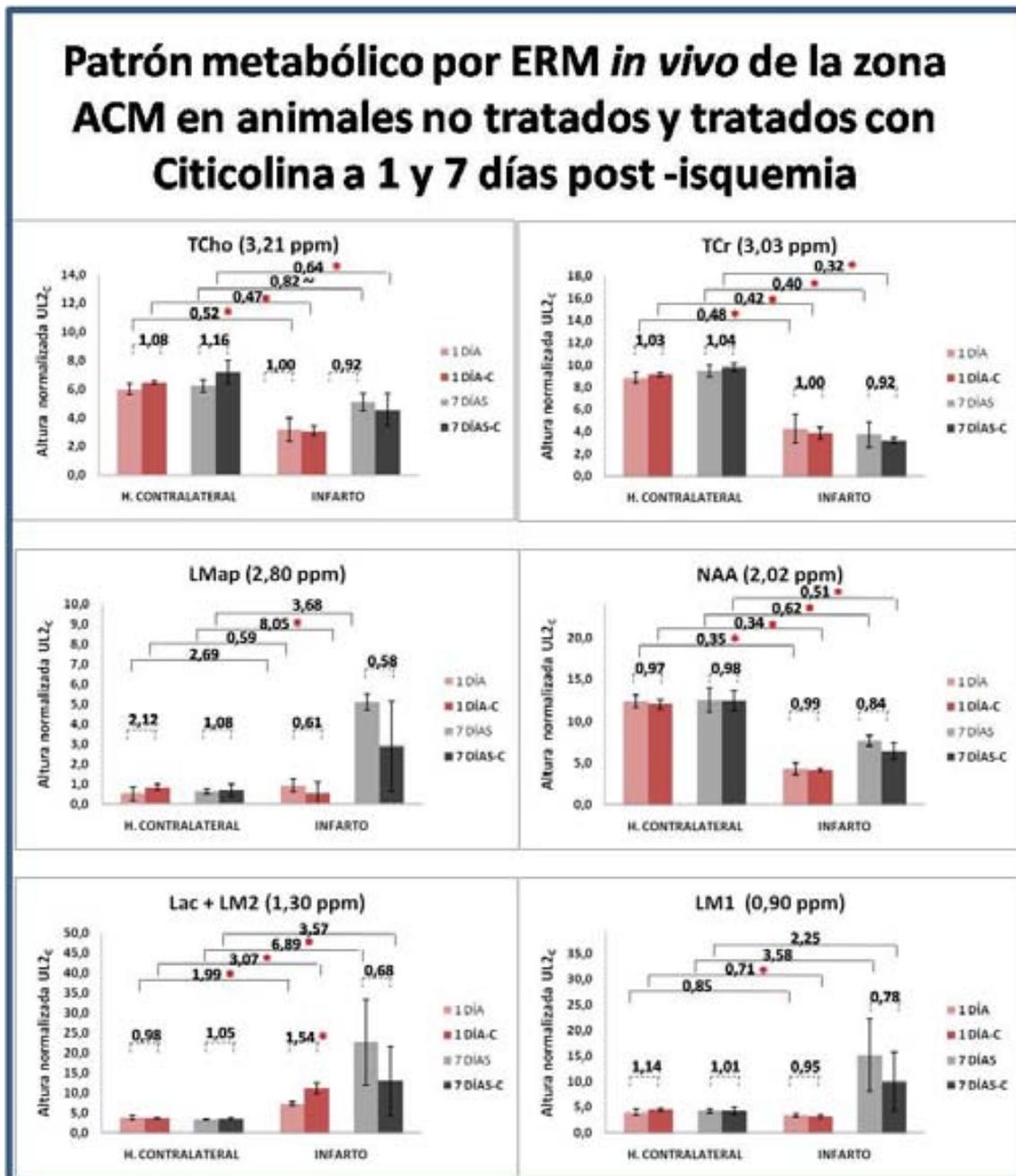


Figura 107: Gráficas promedio \pm SD de las zonas del territorio de la ACM para los animales no tratados y tratados con Citicolina a 1 y 7 días post-infarto. Las líneas horizontales continuas expresan el valor de cambio entre la zona contralateral y el infarto, las líneas discontinuas el cociente entre animales tratados y no tratados. Se comparan los metabolitos con variación entre los no tratados y tratados. El símbolo * indica cambio significativo ($p < 0,05$) y ~ tendencia a la significación ($0,05 < p < 0,10$). Test estadístico aplicado: T de Student.

Cocientes de los metabolitos de la zona ACM entre: promedio animales tratados /promedio animales no tratados					
METABOLITO	GRUPO	H.contralateral	Significación (p < 0,05)	Infarto	Significación (p < 0,05)
Colina (3,21 ppm)	1 día	1,08	0,12	0,96	0,84
	7 días	1,15	0,16	0,89	0,52
Creatina (3,03 ppm)	1 día	1,03	0,40	0,90	0,62
	7 días	1,04	0,40	0,86	0,47
LMap (2,80 ppm)	1 día	1,63	0,21	0,58	0,34
	7 días	1,10	0,74	0,57	0,17
NAA (2,02 ppm)	1 día	0,97	0,54	0,96	0,70
	7 días	0,99	0,92	0,83	0,14
Lactato+LM2 (1,30 ppm)	1 día	0,96	0,74	1,54	0,01 *
	7 días	1,04	0,57	0,57	0,29
LM1 (0,90 ppm)	1 día	1,13	0,23	0,94	0,55
	7 días	1,02	0,89	0,66	0,37

Tabla 31: Valores de cocientes entre animales tratados y no tratados con Citicolina para determinar los cambios que se producen a nivel metabólico. El símbolo * indica cambio significativo (p<0,05).

En la Figura 107 y posteriormente en la Tabla 32 se muestran los valores de cambio entre la zona de infarto y el hemisferio contralateral para animales no tratados y tratados con Citicolina. Algunos valores de cambio con relevancia se detallan a continuación:

Lípidos móviles apoptóticos (2,80 ppm) a 7 días post-isquemia: Se puede observar que en los animales no tratados hay diferencias significativas entre la zona del infarto y el H.contralateral, concretamente un cambio de $8,05 \pm 1,36$ (p<0,01) (como es habitual en los infartos en la etapa subaguda/crónica (ver apartado 5.1.1.6.1). En cambio, en los animales tratados con Citicolina, el aumento de LMap es inferior, es de $3,68 \pm 1,88$ (p=0,23) y en este caso las diferencias no son significativas entre ambos hemisferios.

Este cambio estaría en acuerdo con la disminución que se detecta en la zona del infarto en el número de células apoptóticas que se reducen de forma significativa, a una tercera parte (cociente células apoptóticas animales tratados/animales no tratados=0,31) ($p=0,04$) (Figura 105).

Colina total (3,21 ppm) a 7 días post-isquemia: Si se comparan las diferencias entre los niveles del metabolito entre la zona de infarto y el H.contralateral en los animales no tratados parece que muestra solamente una tendencia a la disminución (valor de cambio= $0,82 \pm 0,12$; $p=0,06$), mientras que en el caso de los animales tratados la disminución es significativa (valor de cambio = $0,64 \pm 0,20$) ($p=0,03$) (Tabla 32).

Lactato + LM2 (1,30 ppm): En el caso del lactato+LM2 a 1 día post-isquemia, es donde se encontraron diferencias significativas en la zona de infarto entre animales tratados y no tratados. Concretamente los animales tratados tienen 1,54 veces ($p=0,01$) más Lac+LM2 que los no tratados (Tabla 31). También se observa este aumento del Lactato+LM2 en los animales tratados a 1 día post-isquemia al hacer la comparación entre el infarto y el H.contralateral. En los animales no tratados el factor de cambio entre la zona de infarto y el hemisferio contralateral es de aproximadamente el doble ($p<0,01$) y en los animales tratados el triple ($p=0,01$)

.A los 7 días post-isquemia en los animales no tratados el metabolito está elevado en la zona de infarto aunque no de forma significativa debido a una elevada variabilidad $6,89 \pm 3,45$ ($p=0,09$). En el caso de los animales tratados no hay diferencias significativas entre ambos hemisferios aunque también se encuentra aumentado $3,57 \pm 2,07$ ($p=0,20$) aunque en menor medida.

Lípidos móviles 1 (0,90 ppm) a 1 día post-isquemia: Al comparar los niveles de LM1 en animales tratados y no tratados no hay diferencias significativas (Tabla 31). Si se analiza el factor de cambio entre la zona de infarto y el H.contralateral, en ambos casos el nivel de LM1 es inferior en la zona de infarto a 1 día post-isquemia. En los animales tratados esta disminución es significativa $0,71 \pm 0,09$ ($p=0,01$) mientras que en los no tratados no es significativa $0,85 \pm 0,04$ ($p=0,22$) (Tabla 32).

Valores de cambio entre infarto y H.contralateral en animales no tratados y tratados con Citicolina					
Citicolina					
METAB.	DÍA	Valor de cambio NO TRATADOS	Sig. (p<0,05)	Valor de cambio TRATADOS	Sig. (p< 0,05)
TCho (3,21ppm)	1 día	0,52 ± 0,10	0,01 *	0,47 ± 0,05	< 0,01 *
	7 días	0,82 ± 0,12	0,06 ~	0,64 ± 0,20	0,03 *
TCr (3,03 ppm)	1 día	0,48 ± 0,13	< 0,01 *	0,42 ± 0,07	< 0,01 *
	7 días	0,40 ± 0,14	< 0,01 *	0,32 ± 0,03	< 0,01 *
LMap (2,80 ppm)	1 día	2,69 ± 2,55	0,20	0,59 ± 0,49	0,42
	7 días	8,05 ± 1,36	< 0,01 *	3,68 ± 1,86	0,23
NAA (2,02 ppm)	1 día	0,35 ± 0,05	< 0,01 *	0,34 ± 0,01	< 0,01 *
	7 días	0,62 ± 0,13	0,01	0,51 ± 0,07	< 0,01 *
Lac+LM2 (1,30 ppm)	1 día	1,99 ± 0,47	< 0,01 *	3,07 ± 0,19	0,01*
	7 días	6,89 ± 3,45	0,09 ~	3,57 ± 2,07	0,20
LM1 (0,90 ppm)	1 día	0,85 ± 0,04	0,22	0,71 ± 0,09	0,01 *
	7 días	3,58 ± 1,62	0,11	2,25 ± 0,99	0,23

Tabla 32: Valores de cambio promedio ± SD de los principales metabolitos entre la zona de infarto y el H.contralateral para los animales no tratados y tratados con Citicolina a 1 y 7 días post-infarto. Los datos están expresados en cocientes entre los animales tratados y no tratados. El símbolo * indica cambio significativo (p<0,05) y el símbolo ~ indica tendencia a la significación (0,05<p<0,10).

5.3.4. Discusión de la terapia con Citicolina

Los resultados obtenidos en este apartado muestran que, a pesar de no encontrar diferencias significativas a nivel de imagen en cuanto a volumen de infarto, a nivel inmunohistoquímico sí que se detectan diferencias significativas y, adicionalmente, hay algunos parámetros espectroscópicos que varían y que pueden ayudar a entender la naturaleza de estos cambios.

A nivel del análisis del volumen de infarto nuestros resultados en los animales tratados con Citicolina difieren del de otros grupos en los que sí se ha demostrado una reducción del volumen de infarto. En general, según datos publicados en un reciente meta-análisis de Bustamante y colaboradores (Bustamante et al. 2012) de los ensayos preclínicos realizados con Citicolina, la reducción del volumen del infarto es de un 31,4% (rango de 21,5% a 41,4%) aunque las dosis empleadas y el modelo animal puede presentar diferencias. En esta misma revisión ajustan las reducciones de volumen según el sesgo que pueden suponer los estudios menores, es decir, con bajo número animales y en ese caso, la reducción del infarto es únicamente de 19,17% (rango de 10,62% a 27,72%).

Sin embargo, de forma similar a nuestros resultados, hay algunas publicaciones en las que no encuentran reducciones en el volumen de infarto. El trabajo de Aronowski y colaboradores (Aronowski et al. 1996) en el que con un modelo tMCAO en ratas espontáneamente hipertensas con oclusiones en el rango de 30 a 120 minutos y administración de Citicolina con dosis de 500 mg/kg/día durante 14 días no detectaban diferencias significativas en el volumen máximo de infarto aunque sí veían diferencias en el tiempo de isquemia necesario para producir la mitad del daño (T50).

También cabe destacar un trabajo de Gutiérrez y colaboradores presentado en un congreso y revisado en (Secades 2012) en que no encuentran diferencias en el volumen del infarto entre el grupo control y los animales tratados con Citicolina a 500 mg/kg/día por vía intraperitoneal analizados a los 14 días post-isquemia.

En la literatura también se ha descrito que la Citicolina contribuye a una reabsorción más rápida del edema citotóxico (Secades 2012). El edema se puede

apreciar en el grupo de 1 día post-isquemia ya que a los 7 días prácticamente ya se ha reabsorbido el edema en todos los casos. Nuestros resultados a 1 día post-isquemia muestran que no hay diferencias detectables por IRM en cuanto al porcentaje de edema calculado respecto al hemisferio contralateral entre los animales tratados y no tratados.

En el análisis de los cambios a nivel celular determinados por inmunohistoquímica nuestros resultados muestran cambios tanto a nivel de la zona de infarto como en las ZSVs:

En la zona del infarto se determinó que a los 7 días post-isquemia (Figura 101) hay cambios en el número de células apoptóticas (células TUNEL+/mm²) en los animales tratados con Citicolina respecto a los no tratados llegando a producirse una reducción promedio del 70% en los niveles de apoptosis a 7 días post-isquemia (Figura 105). Esta disminución en la apoptosis ha sido determinada también en otros trabajos aunque no se han encontrado trabajos que determinen la apoptosis a los 7 días post-isquemia. Únicamente se encontraron dos trabajos que determinan la apoptosis en la etapa aguda (hasta las 24 horas) y un artículo hasta las 72 horas: Krupinski y colaboradores (Krupinski et al. 2002) determinaron que en ratas con infarto con una oclusión permanente de la ACM con administración de una dosis de 500 mg/kg por vía intraperitoneal de CDP-colina a los 30 minutos y 23 horas post-isquemia. Al determinar la apoptosis medida mediante TUNEL se reducía respecto a los controles isquémicos aproximadamente en un 45% a las 12 horas post-isquemia y un 16% a las 24 horas post-isquemia (calculado a partir de los valores promedio mostrados en el artículo entre el grupo control y el grupo con administración de Citicolina post-infarto). Por su parte, Sahin y colaboradores (Sahin et al. 2010) con un modelo de rata con oclusión transitoria de la ACM durante 2 horas y administración de 400 mg/kg/i.p. de Citicolina a las 2 horas de la reperusión detectaron un 30% de reducción en la expresión de caspasa-3 a las 24 horas. En etapas más tardías, 72 horas, Sobrado y colaboradores (Sobrado et al. 2003) determinaron, en un modelo de infarto cortical con reperusión a los 60 minutos de la ACM e iniciando el tratamiento con Citicolina 45 minutos después de la reperusión con una dosis diaria de 250 mg/kg/i.p. que a los 3 días post-isquemia

había una reducción de apoptosis medida por tinción con TUNEL aproximadamente de un 30%.

Comparando con los datos de la literatura, nosotros no apreciamos diferencias significativas en los niveles de apoptosis a 1 día post-isquemia como hubiera sido de esperar. En cambio se determinó una reducción de la apoptosis del 70% a los 7 días post-isquemia. Aunque no se encontraron trabajos que determinaran la reducción de la apoptosis debido a la Citicolina a los 7 días post-isquemia, en base a los artículos antes mencionados que sí detectaban disminución de apoptosis a 1 día y 3 días, también sería de esperar que la Citicolina redujese el número de células apoptóticas a los 7 días.

La diferencia entre la no reducción de la apoptosis a 1 día y la reducción a 7 días puede significar que el tratamiento prolongado en el tiempo con Citicolina permite que ésta tenga más efecto tal y como sugieren los estudios que observan un mayor efecto de la Citicolina administrada con multidosis que con dosis única (Bustamante et al. 2012). En nuestro caso en los animales sacrificados a 1 día post-isquemia sólo se les había administrado 2 dosis de 500 mg/kg, mientras que a los sacrificados a los 7 días post-isquemia se les administró multidosis diarias (aparte de las 2 dosis iniciales, 4 dosis de 250mg/kg/i.p. del día 1 al 6) en lugar de 1 diaria como hacen la mayoría de ensayos. Este protocolo de multidosis se diseñó para intentar maximizar el efecto de la disponibilidad de la colina en el cerebro.

Nuestros resultados en cuanto al análisis de las ZSVs no detectaron cambios significativos en los niveles de proliferación celular detectada por Ki67 entre los animales tratados con Citicolina y no tratados. En este sentido, nuestros resultados contradicen algunos de los que aparecen en la bibliografía, aunque obtenidos en condiciones no exactamente comparables a las de este estudio: Gutierrez-Fernandez y colaboradores (Gutierrez-Fernandez et al. 2012) en un modelo animal de rata con oclusión de la ACM extracraneal y administración de Citicolina de 1 dosis de 500 mg/kg/día/i.p. durante 14 días hallaron cambios en cuanto al número de neuroblastos detectables en la zona peri-infarto marcados con BrdU a los 14 días post-infarto, que aumentan unas 3 veces en los animales tratados. En la misma línea Diederich y

colaboradores (Diederich et al. 2012) en un modelo de isquemia fototrombótica con Rosa de Bengala con administración de Citicolina 100 mg/kg/día durante 10 días empezando a las 24 horas post-isquemia detectaron a los 28 días un aumento de un factor de 3 veces en las células en proliferación (marcadas con BrdU) en la ZSV.

Sin embargo, en la apoptosis sí se determinaron cambios significativos en ambas ZSVs en las ratas tratadas, que presentaban más apoptosis en la región de las ZSVs que las no tratadas. La apoptosis es un proceso ligado a la proliferación, con una función de control y limitación de la capacidad proliferaría globalmente considerada, en el seno de un tejido sano. Una parte de las células nuevas que se forman en el cerebro cada día mueren de forma prácticamente inmediata (Levison et al. 2000). Esto concuerda con que en el cerebro sano el número de células proliferarías medibles en las ZSVs resulta de un equilibrio entre la división celular, la migración rostral y la muerte celular por apoptosis y, en caso de patología, la migración radial hacia el lugar dañado. Esto es crítico para prevenir, por ejemplo, una progresión tumoral (Gotts and Chesselet 2005). Aunque el mecanismo aún no está del todo definido se ha detectado que en condiciones normales hay correlación positiva entre un aumento en la apoptosis y de la proliferación pero que en caso de patología esta correlación disminuye y se puede llegar a una expansión de la ZSV o a una disminución (Farioli-Vecchioli et al.).

La acción de la Citicolina, analizando únicamente las ZSVs, parecería que aumentaría la apoptosis ya que ésta es superior al doble en los animales tratados que no tratados y, por lo tanto, conllevaría a una menor producción global de CPNs. Sin embargo, a pesar de detectar estos cambios entre tratados y no tratados tanto a 1 día post-isquemia en la ZSVi como a los 7 días en ambas ZSVs, únicamente a 7 días post-isquemia en la ZSVi los niveles de apoptosis medida por TUNEL+/mm² aumentan por encima de los valores detectados en los controles no isquémicos, por lo tanto por encima de lo que se consideraría dentro de la normalidad (Figura 105). Por otra parte, si se analizan los cambios en la zona de infarto de forma concomitante a los 7 días post-isquemia en los animales tratados es cuando los animales presentan una disminución significativa de la apoptosis en la zona de infarto. La migración de las CPNs está dirigida básicamente por estímulos generados por la patología o en el caso del

cerebro sano por los lugares de migración, como puede ser el bulbo olfatorio. Mandairon y colaboradores (Mandairon et al. 2003) determinaron en un modelo de ratón que en el caso del tracto migratorio rostral la desaferentización sensorial aumentaba la apoptosis de las células que migran hacia el bulbo, determinando que la señales estimuladoras del bulbo son necesarias para la supervivencia de las nuevas células. Por lo tanto, nuestra hipótesis sería que una reducción en la severidad del infarto debida a la acción del fármaco Citicolina en el territorio ACM podría traducirse en una menor señalización para la migración de las CPNs desde la ZSVi. Esto podría modular la proliferación neuronal hacia una menor producción de nuevas CPNs ya que la cantidad de tejido a reparar sería menor que en el caso del grupo no tratado. Esta regulación vendría mediada por el aumento de la apoptosis en la ZSV.

La administración con Citicolina se esperaba inicialmente que modulara el nivel de proliferación en la ZSV de los animales y detectar luego dichos cambios mediante biomarcadores espectroscópicos de diferencia en proliferación (como el de TCh_o, 3,21 ppm), pero en nuestros animales no hubo diferencias en proliferación, contrariamente a lo esperado. Las diferencias en apoptosis son de un número bastante reducido de células (en comparación con las proliferantes) con lo cual los cambios probablemente están por debajo del límite de detección directo de la técnica de la ERM, aunque se detectaron diferencias en las resonancias de Lac+LM2 (1,30 ppm) y LMap (2,80 ppm) en las zonas donde había cambios significativos en apoptosis (Tabla 28).

Sin embargo, debido a la poca intensidad de las señales analizadas en la región de las ZSVs estos cambios significativos deberían ser considerados con precaución.

El análisis espectroscópico de la zona de infarto, muestra que a 1 día post-isquemia hay significativamente más lactato+LM2 en los animales tratados que en los no tratados. Sin embargo en el grupo de 7 días esta tendencia se invierte y a pesar de no mostrar diferencias significativas debido a que hay una elevada variabilidad en la desviación estándar, a nivel de promedios, la diferencia entre los animales tratados/no tratados del 0,58 en los LMap (2,80 ppm) y del 0,68 en el Lac+LM2 (1,30 ppm) siguen la tendencia de la reducción en la apoptosis detectada por inmunohistoquímica, que fue del 0,31, con lo cual ambos podrían ser potenciales biomarcadores de la apoptosis

para la evaluación de la acción de fármacos, especialmente la señal a 2,80 ppm que tal y como se ha comentado en la discusión del infarto sólo se asocia a muerte apoptótica *in vivo*.

A modo de resumen, se determinó que la Citicolina reduce la apoptosis medida en la zona de infarto a los 7 días post-isquemia pero en nuestro caso, no aumenta la proliferación de las CPNs en la ZSVs. Se detectó también un aumento de la apoptosis en las ZSVs en los animales tratados, aunque ello podría interpretarse a la luz de una menor severidad del infarto, que puede mediar en los niveles de proliferación de las CPNs. Mediante ERM *in vivo* no se pudo determinar un biomarcador espectral que permitiera determinar el efecto del fármaco en las ZSVs, posiblemente debido a que los cambios estaban por debajo del límite de detección de la técnica. En cambio en la zona de infarto, donde los cambios en el nivel de apoptosis son más evidentes según el estudio inmunohistoquímico, el Lactato+LM2 o los LMap son posibles biomarcadores por ERM *in vivo* de este cambio.

6. DISCUSIÓN GENERAL

Las discusiones a nivel de cada capítulo se han centrado en el análisis de los principales cambios en el patrón metabólico para la zona de infarto, la zona subventricular tanto en los animales de referencia como en aquellos a los que se administró terapia con Citicolina, y su interpretación a nivel biológico. Ello queda resumido ahora en la Tabla 33.

	INFARTO	ZSVs post-infarto
TCho	↓↓	↑
TCr	↓↓	-
LMap	↑↑	-
NAA	↓↓	-
Lac+LM2	↑↑	↑
LM1	↑↑	-

Tabla 33: Cambios principales detectados en el análisis de metabolitos por ERM *in vivo* y HRMAS *ex vivo* de la zona de infarto y en las zonas subventriculares. La dirección de las flechas indican el cambio que se produce debido al infarto, el número de flechas la magnitud del cambio. En el caso de las ZSVs de las resonancias para las que no se dispone de resultados concluyentes se han marcado con un guion (-).

Sin embargo, el uso combinado de las distintas técnicas que se han utilizado en esta Tesis: espectroscopía SV, espectroscopía multivóxel, espectroscopía HRMAS y técnicas de reconocimiento de patrones no ha sido comentada con una perspectiva de conjunto y es una de las aportaciones principales de este proyecto al campo de la investigación en isquemia cerebral.

Así, a nivel de análisis espectroscópico hay muy pocos trabajos en el campo de la isquemia que utilicen espectroscopía de RMN a alto campo para su estudio. Ello es debido a que trabajar *ex vivo* requiere el sacrificio del animal y con ello los cambios que se producen durante el periodo de isquemia *post-mortem* (que son de la misma índole que los debidos a la patología que se está estudiando). Esto en el campo de la isquemia cerebral es especialmente crítico ya que podría confundir la interpretación de dichos resultados.

Por este motivo, la espectroscopía *ex vivo* se realiza básicamente en fluidos (sangre, líquido cefalorraquídeo...) más que en el tejido isquémico de interés. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento existe un único trabajo realizado con espectroscopía *ex vivo* en isquemia que es el de Yang y colaboradores (Yang et al. 2012) en el que analizaron extractos de cerebro mediante espectroscopía *ex vivo* a 14,1T de ratas con infarto focal permanente sacrificadas a las 24 horas mediante decapitación y congelación del tejido a -80°C . Esta técnica de la congelación rápida, aunque es de uso común para estudios de metabolómica, tiene más complicaciones para evitar los cambios de la isquemia post-mortem y además no es irreversible, ya que si se realizan experimentos a temperatura fisiológica los enzimas que catalizan las reacciones post-mortem pueden ser reactivados.

Nuestro proyecto propuso el uso de irradiación FMW como el método de sacrificio más adecuado en estudios de isquemia para poder realizar estudios de metabolómica *ex vivo*. Esta técnica, a través de la inactivación enzimática permanente permite la rápida e irreversible inactivación del metabolismo post-mortem (valorado en el mantenimiento del cociente PCr/Cr). Dávila y colaboradores (Dávila et al. 2012) demostraron que la irradiación permite la estabilidad del patrón espectral en estudios *ex vivo*, así como la posibilidad de realizar los experimentos a 37°C . Las ventajas de poder trabajar a temperatura fisiológica son que permite obtener mejor señal de los lípidos móviles y los compuestos que contienen colina (Cheng et al. 1997; Valverde-Saubi et al. 2010) además que trabajar en condiciones fisiológicas permite una mejor comparación con resultados *in vivo*.

En la literatura hay estudios donde esta técnica de sacrificio por irradiación FMW se ha aplicado a animales sanos y en otros modelos experimentales (de Graaf et al. 2009). Sin embargo, este es el primer estudio aplicado a un modelo de isquemia cerebral. Con este método de sacrificio se ha demostrado que el patrón es distinto según la región analizada del cerebro y se pueden hacer estudios comparativos fiables, incluso permitiendo la determinación del metabolito del lactato, que es propio del infarto cerebral pero también del metabolismo isquémico post-mortem.

El uso de la espectroscopía *ex vivo* HRMAS es una de las técnicas que en la actualidad ofrece mejor resolución para estudios metabolómicos en tejidos, permitiendo una resolución muy superior a los estudios *in vivo*. Mediante esta técnica se pueden detectar los compuestos que contienen colina que son indistinguibles directamente *in vivo*, por ese motivo *in vivo* se referencian como TCho (3,21 ppm) o también se puede diferenciar el lactato (1,33-1,35 ppm) de los LM2 (1,28 ppm).

Una de las principales ventajas de la técnica HRMAS es que no necesita procesamiento previo de la muestra, con lo cual se evitan las pérdidas de metabolitos que se pueden dar en el proceso de la extracción y se mantiene la integridad del tejido (más similar a los estudio *in vivo*).

Mediante el uso de esta técnica se han podido obtener espectros de alta resolución tanto de infarto como de las zonas subventriculares, donde se produce la proliferación de las CPNs. El HRMAS post-FMW puede ser una excelente técnica que actúe como paso intermedio entre los estudios de líneas celulares de células progenitoras y los estudios *in vivo*. Con el añadido que al no destruir la muestra permite su utilización posterior para estudios de inmunohistoquímica, genómicos, etc.

Por otro lado, la aplicación de técnicas de reconocimiento de patrones permite de forma objetiva y matemática clasificaciones de espectros. Estas técnicas tienen mucho potencial a la hora del análisis espectroscópico. Así, permiten la detección de los metabolitos más característicos de una determinada patología o región cerebral. Especialmente los clasificadores no supervisados pueden suponer una herramienta muy útil a lo hora de analizar grandes cantidades de datos espectroscópicos en la espectroscopía multivóxel poniendo en relevancia regiones anómalas y metabolitos de interés como biomarcadores en una determinada patología.

El uso combinado de estas distintas técnicas puede contribuir en un futuro a una mejor caracterización metabolómica de los cambios que tienen lugar en una determinada patología con capacidad para determinar biomarcadores de procesos de interés. En nuestro estudio se proponen 2 marcadores para distintos procesos que tienen lugar en el cerebro tras la isquemia: el marcador de los LMap (2,80 ppm) como

biomarcador de apoptosis cumulativa en la región de infarto y la TCho (3,21 ppm) como la señal más adecuada para un posible biomarcador de proliferación celular.

Este trabajo tiene sus limitaciones, que son fundamentalmente un bajo número de animales empleados, debido a una baja tasa de infartos que cumplieron las condiciones de inclusión predefinidas (15% del total de animales empleados), bajo número de animales en cada punto temporal y bajo número de puntos temporales analizados, que en caso de aumentarse, habrían permitido detectar mejor cinéticas de evolución de algunos de los metabolitos relevantes como el Lactato o los LMap.

Otra de las principales limitaciones fue la magnitud del cambio de las CPNs en proliferación detectada en las ZSVs que no ha sido suficiente para determinar posibles biomarcadores *in vivo* que permitan diferenciar entre ambas zonas subventriculares. Sería necesario utilizar estímulos que permitieran un cambio en la proliferación de las CPNs de mayor magnitud. Por ejemplo mediante factores de crecimiento o en sentido contrario, mediante Ara-C que es un antimitótico que elimina las CPNs mientras es administrado y después vuelven a expandirse otra vez

Las técnicas de reconocimiento de patrones, especialmente en el análisis de las ZSVs, sin mezclar datos a distintos tiempos ofrecerían una mejor caracterización del patrón espectral. Pero para ello sería necesario aumentar el número de casos, ya que la robustez es un compromiso entre el número de casos y el número de características que el sistema puede utilizar.

En esta tesis el análisis de los metabolitos se ha hecho en base a intensidades relativas de las resonancias ya que así era aplicable a todas las técnicas propuestas HRMAS, reconocimiento de patrones, espectroscopía *in vivo*...ya que los sistemas de cuantificación mediante post-procesamiento no están disponibles (de momento) para HRMAS o reconocimiento de patrones. Sin embargo, especialmente *in vivo*, sería necesario usar técnicas de cuantificación de los metabolitos por deconvolución y ajuste de datos espectrales, como podría ser el LC modelo para determinar de una forma más precisa la magnitud de los cambios que ocurren.

Finalmente, este trabajo sólo se centró en una parte de la neurogénesis, la proliferación celular en la ZSV, sin embargo, sería necesario monitorizar la migración y también la integración funcional de las nuevas células en circuitos existentes para poder disponer de un biomarcador del proceso de la neurogénesis.

El diseño experimental aplicado para este estudio, encarado a evaluar el patrón de proliferación de las CPNs en la ZSV, creó limitaciones a la hora de una caracterización más precisa en la zona del infarto cerebral de la evolución la resonancia de LMap. Sería necesario que en futuros trabajos se abordara un estudio más detallado de los cambios de los LMap entre 1 día y 6-8 días, momento en que dicha resonancia ya se encuentra muy aumentada, para intentar correlacionar su presencia e intensidad con procesos que estén sucediendo a etapas más tempranas. También sería necesario determinar si esta resonancia desaparece en etapas posteriores a una semana de evolución post-infarto y con qué procesos se puede correlacionar, incluyendo tinciones para gotículas lipídicas, macrófagos y también de zonas necróticas.

Otra línea de investigación a seguir sería la aplicación de la metodología de reconocimiento de patrones, que permite el análisis de varios metabolitos simultáneamente, especialmente mediante la segmentación de patrones no supervisados. Dicho estudio, que únicamente se llevó a cabo como prueba de concepto mediante fuentes es una de las técnicas que pueden permitir una mejor segmentación de estados de zonas con diferentes estados metabólicos, por ejemplo sería de interés su aplicación a la visualización *in vivo* de la penumbra isquémica.

También sería útil llevar a cabo mediante la técnica de HRMAS post-FMW un análisis más exhaustivo de las resonancias que no son detectables *in vivo* para poder determinar otros cambios bioquímicos que estén influyendo en el infarto o áreas de proliferación, así como el efecto de diversas terapias sobre el metabolismo celular detectable en forma de biomarcadores espectroscópicos.

7. CONCLUSIONES

- 1) Se ha puesto a punto un protocolo de ERM *in vivo* para la caracterización del patrón espectral de la zona de infarto y las zonas subventriculares en un modelo de isquemia cerebral en rata.
- 2) La irradiación con microondas focalizadas (FMW) detiene el metabolismo post-mortem en el modelo animal de infarto cerebral manteniendo un cociente PCr/Cr similar a datos descritos *in vivo*.
- 3) Con los animales sacrificados mediante FMW se pueden realizar estudios de espectroscopia *ex vivo* a alto campo mediante HRMAS pudiendo cuantificar el metabolito del lactato en un modelo de infarto cerebral sin la interferencia de la isquemia post-sacrificio.
- 4) El uso combinado de espectroscopía *in vivo* y *ex vivo* post-irradiación permite una mejor caracterización metabólica de los tejidos especialmente por la resolución que se obtiene en la separación de los compuestos de colina (centrados a 3,21 ppm) y de las señales de lactato y lípidos móviles (centradas a 1,30 ppm).
- 5) Para el estudio de la evolución del infarto a nivel crónico las señales lipídicas son las únicas que muestran variación a lo largo del tiempo y tienen potencial como biomarcadores indirectos de evolución del infarto. Es especialmente destacable la señal correspondiente a lípidos móviles apoptóticos (LMap) a 2,80 ppm, que únicamente aparece en las etapas avanzadas del infarto.
- 6) En el análisis de la proliferación en las zonas subventriculares *in vivo* el metabolito de Colina total (3,21 ppm), un biomarcador establecido de proliferación en tumores, es el único que muestra una tendencia a la significación con el número de células progenitoras en proliferación detectables mediante inmunohistoquímica.

- 7) No se ha encontrado correlación entre la resonancia a 1,28 ppm y la proliferación celular aunque mediante HRMAS se detectó un aumento del Lactato (1,33-1,35 ppm) en las zonas subventriculares a 1 día post-isquemia, aunque no se puede descartar que sea por difusión desde la zona de infarto.
- 8) El uso de técnicas de reconocimiento de patrones mejora al análisis del patrón metabólico individual para determinar diferencias entre ambas zonas subventriculares, de cara a una discriminación automatizada de interés para futuros estudios de segmentación de imagen molecular basada en el metaboloma.
- 9) La administración del fármaco Citicolina reduce la apoptosis cuantificada mediante inmunohistoquímica en la zona de infarto a 7 días post-isquemia, produciendo una disminución (aunque no significativa) de las señales de Lactato (1,30 ppm) y lípidos móviles apoptóticos (2,80 ppm) detectables *in vivo*, con posible efecto modulador de la proliferación en las zonas subventriculares.
- 10) La espectroscopía de resonancia magnética tiene potencial como fuente de biomarcadores no invasivos fácilmente trasladable a la práctica clínica.

8. BIBLIOGRAFIA

- Adibhatla, R. M., and J. F. Hatcher. 2003. Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 73 (3):308-315.
- Adibhatla, R. M., J. F. Hatcher, and R. J. Dempsey. 2001. Effects of citicoline on phospholipid and glutathione levels in transient cerebral ischemia. *Stroke* 32 (10):2376-2381.
- Albers, G. W., L. R. Caplan, J. D. Easton, P. B. Fayad, J. P. Mohr, J. L. Saver, and D. G. Sherman. 2002. Transient ischemic attack--proposal for a new definition. *N Engl J Med* 347 (21):1713-1716.
- Alf, M. F., H. Lei, C. Berthet, L. Hirt, R. Gruetter, and V. Mlynarik. 2012. High-resolution spatial mapping of changes in the neurochemical profile after focal ischemia in mice. *NMR Biomed* 25 (2):247-254.
- Altman, D. G., Y. Vergouwe, P. Royston, and K. G. Moons. 2009. Prognosis and prognostic research: validating a prognostic model. *BMJ* 338:b605.
- Altman, J. 1963. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec* 145:573-591.
- Altman, J., and G. D. Das. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124 (3):319-335.
- Alusta, P., I. Im, B. A. Pearce, R. D. Beger, R. M. Kretzer, D. A. Buzatu, and J. G. Wilkes. Improving proton MR spectroscopy of brain tissue for noninvasive diagnostics. *J Magn Reson Imaging* 32 (4):818-829.
- Alvarez-Buylla, A., J. M. Garcia-Verdugo, and A. D. Tramontin. 2001. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2 (4):287-293.
- Alvarez-Buylla, A., and D. A. Lim. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41 (5):683-686.
- Arias-Carrion, O., T. Olivares-Bunuelos, and R. Drucker-Colin. 2007. [Neurogenesis in the adult brain]. *Rev Neurol* 44 (9):541-550.
- Aronowski, J., R. Strong, and J. C. Grotta. 1996. Citicoline for treatment of experimental focal ischemia: histologic and behavioral outcome. *Neurol Res* 18 (6):570-574.
- Arvidsson, A., T. Collin, D. Kirik, Z. Kokaia, and O. Lindvall. 2002. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8 (9):963-970.
- Astrakas, L. G., I. Goljer, S. Yasuhara, K. E. Padfield, Q. Zhang, S. Gopalan, M. N. Mindrinos, G. Dai, Y. M. Yu, J. A. Martyn, R. G. Tompkins, L. G. Rahme, and A. A. Tzika. 2005. Proton NMR spectroscopy shows lipids accumulate in skeletal muscle in response to burn trauma-induced apoptosis. *FASEB J* 19 (11):1431-1440.
- Astrup, J., B. K. Siesjo, and L. Symon. 1981. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12 (6):723-725.
- Astrup, J., L. Symon, N. M. Branston, and N. A. Lassen. 1977. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8 (1):51-57.
- Baker, L. L., J. Kucharczyk, R. J. Sevick, J. Mintorovitch, and M. E. Moseley. 1991. Recent advances in MR imaging/spectroscopy of cerebral ischemia. *AJR Am J Roentgenol* 156 (6):1133-1143.
- Bandera, E., M. Botteri, C. Minelli, A. Sutton, K. R. Abrams, and N. Latronico. 2006. Cerebral blood flow threshold of ischemic penumbra and infarct core in acute ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 37 (5):1334-1339.
- Bar-Shir, A., N. Shemesh, R. Nossin-Manor, and Y. Cohen. 2010. Late stimulation of the sphenopalatine-ganglion in ischemic rats: improvement in N-acetyl-aspartate levels and diffusion weighted imaging characteristics as seen by MR. *J Magn Reson Imaging* 31 (6):1355-1363.

- Barany, M., B. G. Langer, R. P. Glick, P. N. Venkatasubramanian, A. C. Wilbur, and D. G. Spigos. 1988. In vivo H-1 spectroscopy in humans at 1.5 T. *Radiology* 167 (3):839-844.
- Barba, I., M. E. Cabanas, and C. Arus. 1999. The relationship between nuclear magnetic resonance-visible lipids, lipid droplets, and cell proliferation in cultured C6 cells. *Cancer Res* 59 (8):1861-1868.
- Barba, I., L. Chavarria, M. Ruiz-Meana, M. Mirabet, E. Agullo, and D. Garcia-Dorado. 2009. Effect of intracellular lipid droplets on cytosolic Ca²⁺ and cell death during ischaemia-reperfusion injury in cardiomyocytes. *J Physiol* 587 (Pt 6):1331-1341.
- Barros, L. F. 2013. Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends Neurosci* 36 (7):396-404.
- Bell, J. D., J. C. Brown, G. Kubal, and P. J. Sadler. 1988. NMR-invisible lactate in blood plasma. *FEBS Lett* 235 (1-2):81-86.
- Berthet, C., H. Lei, R. Gruetter, and L. Hirt. 2011. Early predictive biomarkers for lesion after transient cerebral ischemia. *Stroke* 42 (3):799-805.
- Besselmann, M., M. Liu, M. Diedenhofen, C. Franke, and M. Hoehn. 2001. MR angiographic investigation of transient focal cerebral ischemia in rat. *NMR Biomed* 14 (5):289-296.
- Birken, D. L., and W. H. Oldendorf. 1989. N-acetyl-L-aspartic acid: a literature review of a compound prominent in 1H-NMR spectroscopic studies of brain. *Neurosci Biobehav Rev* 13 (1):23-31.
- Bitar, R., G. Leung, R. Perng, S. Tadros, A. R. Moody, J. Sarrazin, C. McGregor, M. Christakis, S. Symons, A. Nelson, and T. P. Roberts. 2006. MR pulse sequences: what every radiologist wants to know but is afraid to ask. *Radiographics* 26 (2):513-537.
- Bizzi, A., A. Righini, R. Turner, D. Le Bihan, K. H. Bockhorst, and J. R. Alger. 1996. Imaging focal reperfusion injury following global ischemia with diffusion-weighted magnetic resonance imaging and 1H-magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Imaging* 14 (6):581-592.
- Blankenberg, F. G., R. W. Storrs, L. Naumovski, T. Goralski, and D. Spielman. 1996. Detection of apoptotic cell death by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Blood* 87 (5):1951-1956.
- Bonavita, S., F. Di Salle, and G. Tedeschi. 1999. Proton MRS in neurological disorders. *Eur J Radiol* 30 (2):125-131.
- Boren, J., and K. M. Brindle. 2012. Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. *Cell Death Differ* 19 (9):1561-1570.
- Bradley, W. G. 1992. Recent advances in magnetic resonance angiography of the brain. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 5 (6):859-862.
- Brant-Zawadzki, M., P. Weinstein, H. Bartkowski, and M. Moseley. 1987. MR imaging and spectroscopy in clinical and experimental cerebral ischemia: a review. *AJR Am J Roentgenol* 148 (3):579-588.
- Brierley, J. B., and A. W. Brown. 1982. The origin of lipid phagocytes in the central nervous system: I. The intrinsic microglia. *J Comp Neurol* 211 (4):397-406.
- Brooks, G. A. 2009. Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J Physiol* 587 (Pt 23):5591-5600.
- Broughton, B. R., R. Lim, T. V. Arumugam, G. R. Drummond, E. M. Wallace, and C. G. Sobey. 2012. Post-stroke inflammation and the potential efficacy of novel stem cell therapies: focus on amnion epithelial cells. *Front Cell Neurosci* 6:66.
- Broughton, B. R., D. C. Reutens, and C. G. Sobey. 2009. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40 (5):e331-339.
- Bustamante, A., D. Giralt, L. Garcia-Bonilla, M. Campos, A. Rosell, and J. Montaner. 2012. Citicoline in pre-clinical animal models of stroke: a meta-analysis shows the optimal neuroprotective profile and the missing steps for jumping into a stroke clinical trial. *J Neurochem* 123 (2):217-225.
- Campos, F., T. Sobrino, P. Ramos-Cabrera, B. Argibay, J. Agulla, M. Perez-Mato, R. Rodriguez-Gonzalez, D. Brea, and J. Castillo. 2011. Neuroprotection by glutamate oxaloacetate

- transaminase in ischemic stroke: an experimental study. *J Cereb Blood Flow Metab* 31 (6):1378-1386.
- Candelario, K. M., C. W. Shuttleworth, and L. A. Cunningham. 2013. Neural stem/progenitor cells display a low requirement for oxidative metabolism independent of hypoxia inducible factor-1alpha expression. *J Neurochem* 125 (3):420-429.
- Cao, X., L. P. Li, X. H. Qin, S. J. Li, M. Zhang, Q. Wang, H. H. Hu, Y. Y. Fang, Y. B. Gao, X. W. Li, L. R. Sun, W. C. Xiong, T. M. Gao, and X. H. Zhu. 2013. Astrocytic ATP release regulates the proliferation of neural stem cells in the adult hippocampus. *Stem Cells*.
- Castillo, J. 2001. Luces y sombras de la neuroprotección en la isquemia cerebral. *Revista de Neuro-Psiquiatría del Perú* 64 (4).
- Castillo, J., and R. Leira. 2001. Predictors of deteriorating cerebral infarct: role of inflammatory mechanisms. Would its early treatment be useful? *Cerebrovasc Dis* 11 Suppl 1:40-48.
- Castillo, J., and M. Noya. 1999. [Mechanisms of progression of cerebral infarction]. *Neurologia* 14 Suppl 2:2-12.
- Cayre, M., P. Canoll, and J. E. Goldman. 2009. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol* 88 (1):41-63.
- Chan, K. W., A. M. Chow, K. C. Chan, J. Yang, and E. X. Wu. Magnetic resonance spectroscopy of the brain under mild hypothermia indicates changes in neuroprotection-related metabolites. *Neurosci Lett* 475 (3):150-155.
- Chan, P. H. 1996. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27 (6):1124-1129.
- Chen, J., Y. Guo, W. Cheng, R. Chen, T. Liu, Z. Chen, and S. Tan. High glucose induces apoptosis and suppresses proliferation of adult rat neural stem cells following in vitro ischemia. *BMC Neurosci* 14:24.
- Cheng, L. L., M. J. Ma, L. Becerra, T. Ptak, I. Tracey, A. Lackner, and R. G. Gonzalez. 1997. Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (12):6408-6413.
- Chenn, A., and S. K. McConnell. 1995. Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82 (4):631-641.
- Choi, D. W. 1988. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11 (10):465-469.
- Chopp, M., Y. Li, N. Jiang, R. L. Zhang, and J. Probst. 1996. Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 (4):578-584.
- Cirstea, C. M., R. J. Nudo, S. C. Craciunas, E. A. Popescu, I. Y. Choi, P. Lee, H. W. Yeh, C. R. Savage, and W. M. Brooks. 2012. Neuronal-glia alterations in non-primary motor areas in chronic subcortical stroke. *Brain Res* 1463:75-84.
- Cohen, J. E., R. R. Leker, and A. Rabinstein. New strategies for endovascular recanalization of acute ischemic stroke. *Neurol Clin* 31 (3):705-719.
- Cui, X., J. Chen, A. Zacharek, C. Roberts, Y. Yang, and M. Chopp. 2009. Nitric oxide donor up-regulation of SDF1/CXCR4 and Ang1/Tie2 promotes neuroblast cell migration after stroke. *J Neurosci Res* 87 (1):86-95.
- Cunnane, S. C., and Z. Y. Chen. 1992. Triacylglycerol: an important pool of essential fatty acids during early postnatal development in rats. *Am J Physiol* 262 (1 Pt 2):R8-13.
- Curtis, M. A., M. Kam, U. Nannmark, M. F. Anderson, M. Z. Axell, C. Wikkelso, S. Holtas, W. M. van Roon-Mom, T. Bjork-Eriksson, C. Nordborg, J. Frisen, M. Dragunow, R. L. Faull, and P. S. Eriksson. 2007. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315 (5816):1243-1249.
- Daadi, M. M., Z. Li, A. Arac, B. A. Grueter, M. Sofilos, R. C. Malenka, J. C. Wu, and G. K. Steinberg. 2009. Molecular and magnetic resonance imaging of human embryonic stem cell-derived neural stem cell grafts in ischemic rat brain. *Mol Ther* 17 (7):1282-1291.

- Davila, M., A. P. Candiota, M. Pumarola, and C. Arus. 2012. Minimization of spectral pattern changes during HRMAS experiments at 37 degrees celsius by prior focused microwave irradiation. *MAGMA* 25 (5):401-410.
- De Edelenyi, F. S., C. Rubin, F. Esteve, S. Grand, M. Decorps, V. Lefournier, J. F. Le Bas, and C. Remy. 2000. A new approach for analyzing proton magnetic resonance spectroscopic images of brain tumors: nosologic images. *Nat Med* 6 (11):1287-1289.
- de Graaf, R. A., P. B. Brown, S. McIntyre, T. W. Nixon, K. L. Behar, and D. L. Rothman. 2006. High magnetic field water and metabolite proton T1 and T2 relaxation in rat brain in vivo. *Magn Reson Med* 56 (2):386-394.
- de Graaf, R. A., G. M. Chowdhury, P. B. Brown, D. L. Rothman, and K. L. Behar. 2009. In situ 3D magnetic resonance metabolic imaging of microwave-irradiated rodent brain: a new tool for metabolomics research. *J Neurochem* 109 (2):494-501.
- del Zoppo, G. J. 2010. Acute anti-inflammatory approaches to ischemic stroke. *Ann N Y Acad Sci* 1207:143-148.
- Delaney, S. M., and J. D. Geiger. 1996. Brain regional levels of adenosine and adenosine nucleotides in rats killed by high-energy focused microwave irradiation. *J Neurosci Methods* 64 (2):151-156.
- Delikatny, E. J., S. Chawla, D. J. Leung, and H. Poptani. 2011. MR-visible lipids and the tumor microenvironment. *NMR Biomed* 24 (6):592-611.
- Delikatny, E. J., W. A. Cooper, S. Brammah, N. Sathasivam, and D. C. Rideout. 2002. Nuclear magnetic resonance-visible lipids induced by cationic lipophilic chemotherapeutic agents are accompanied by increased lipid droplet formation and damaged mitochondria. *Cancer Res* 62 (5):1394-1400.
- Detour, J., K. Elbayed, M. Piotto, F. M. Moussallieh, A. Nehlig, and I. J. Namer. 2011. Ultrafast in vivo microwave irradiation for enhanced metabolic stability of brain biopsy samples during HRMAS NMR analysis. *J Neurosci Methods* 201 (1):89-97.
- Diederich, K., K. Frauenknecht, J. Minnerup, B. K. Schneider, A. Schmidt, E. Altach, V. Eggert, C. J. Sommer, and W. R. Schabitz. 2012. Citicoline enhances neuroregenerative processes after experimental stroke in rats. *Stroke* 43 (7):1931-1940.
- Díez-Tejedor E, S. R. 1999. *Concepto y clasificación de las enfermedades cerebrovasculares*. edited by A.-S. J. Castillo J, Martí-Vilalta JL, Martines Vila E, Matías-Guiu J 2a edición ed: Prous Science.
- Dittmar, M., T. Spruss, G. Schuierer, and M. Horn. 2003. External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 34 (9):2252-2257.
- Dobkin, B. 2003. *The Clinical Science of Neurologic Rehabilitation (Contemporary Neurology Series, 66)*. edited by U. Oxford University Press. 2nd edition ed.
- Doetsch, F. 2003. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13 (5):543-550.
- Doetsch, F., I. Caille, D. A. Lim, J. M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97 (6):703-716.
- Douglas, H. A., J. K. Callaway, J. Sword, S. A. Kirov, and R. D. Andrew. 2011. Potent inhibition of anoxic depolarization by the sodium channel blocker dibucaine. *J Neurophysiol* 105 (4):1482-1494.
- Dreher, W., E. Busch, and D. Leibfritz. 2001. Changes in apparent diffusion coefficients of metabolites in rat brain after middle cerebral artery occlusion measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 45 (3):383-389.
- el-Deredy, W. 1997. Pattern recognition approaches in biomedical and clinical magnetic resonance spectroscopy: a review. *NMR Biomed* 10 (3):99-124.
- Endres, M., B. Engelhardt, J. Koistinaho, O. Lindvall, S. Meairs, J. P. Mohr, A. Planas, N. Rothwell, M. Schwaninger, M. E. Schwab, D. Vivien, T. Wieloch, and U. Dirnagl. 2008.

- Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock. *Cerebrovasc Dis* 25 (3):268-278.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson, and F. H. Gage. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4 (11):1313-1317.
- Fantin, V. R., J. St-Pierre, and P. Leder. 2006. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9 (6):425-434.
- Farioli-Vecchioli, S., L. Micheli, D. Saraulli, M. Ceccarelli, S. Cannas, R. Scardigli, L. Leonardi, I. Cina, M. Costanzi, M. T. Ciotti, P. Moreira, J. P. Rouault, V. Cestari, and F. Tirone. 2012. Btg1 is Required to Maintain the Pool of Stem and Progenitor Cells of the Dentate Gyrus and Subventricular Zone. *Front Neurosci* 6:124.
- Federico, F., I. L. Simone, V. Lucivero, P. Giannini, G. Laddomada, D. M. Mezzapesa, and C. Tortorella. 1998. Prognostic value of proton magnetic resonance spectroscopy in ischemic stroke. *Arch Neurol* 55 (4):489-494.
- Ferrer, I. 2006. Apoptosis: future targets for neuroprotective strategies. *Cerebrovasc Dis* 21 Suppl 2:9-20.
- Foo, K., L. Blumenthal, and H. Y. Man. 2012. Regulation of neuronal bioenergy homeostasis by glutamate. *Neurochem Int* 61 (3):389-396.
- Franke, C., G. Brinker, F. Pillekamp, and M. Hoehn. 2000. Probability of metabolic tissue recovery after thrombolytic treatment of experimental stroke: a magnetic resonance spectroscopic imaging study in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 20 (3):583-591.
- Friedman, S. D. 2008. Comment on "Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain". *Science* 321 (5889):640; author reply 640.
- Funfschilling, U., L. M. Supplie, D. Mahad, S. Boretius, A. S. Saab, J. Edgar, B. G. Brinkmann, C. M. Kassmann, I. D. Tzvetanova, W. Mobius, F. Diaz, D. Meijer, U. Suter, B. Hamprecht, M. W. Sereda, C. T. Moraes, J. Frahm, S. Goebbels, and K. A. Nave. 2012. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485 (7399):517-521.
- Furlan, M., G. Marchal, F. Viader, J. M. Derlon, and J. C. Baron. 1996. Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra. *Ann Neurol* 40 (2):216-226.
- Gage, F. H. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science* 287 (5457):1433-1438.
- Gasparovic, C., G. A. Rosenberg, J. A. Wallace, E. Y. Estrada, K. Roberts, A. Pastuszyn, W. Ahmed, and G. D. Graham. 2001. Magnetic resonance lipid signals in rat brain after experimental stroke correlate with neutral lipid accumulation. *Neurosci Lett* 301 (2):87-90.
- Gideon, P., O. Henriksen, B. Sperling, P. Christiansen, T. S. Olsen, H. S. Jorgensen, and P. Arlien-Soborg. 1992. Early time course of N-acetylaspartate, creatine and phosphocreatine, and compounds containing choline in the brain after acute stroke. A proton magnetic resonance spectroscopy study. *Stroke* 23 (11):1566-1572.
- Glodzik-Sobanska, L., J. Li, L. Mosconi, A. Slowik, J. Walecki, A. Szczudlik, B. Sobiecka, and M. J. de Leon. 2007. Prefrontal N-acetylaspartate and poststroke recovery: a longitudinal proton spectroscopy study. *AJNR Am J Neuroradiol* 28 (3):470-474.
- Gotoh, O., T. Asano, T. Koide, and K. Takakura. 1985. Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. I: The time courses of the brain water, sodium and potassium contents and blood-brain barrier permeability to 125I-albumin. *Stroke* 16 (1):101-109.
- Gotts, J. E., and M. F. Chesselet. 2005. Mechanisms of subventricular zone expansion after focal cortical ischemic injury. *J Comp Neurol* 488 (2):201-214.
- Gotz, M., and W. B. Huttner. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (10):777-788.

- Gould, E., and C. G. Gross. 2002. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci* 22 (3):619-623.
- Govindaraju, V., K. Young, and A. A. Maudsley. 2000. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed* 13 (3):129-153.
- Graham, G. D., J. H. Hwang, D. L. Rothman, and J. W. Prichard. 2001. Spectroscopic assessment of alterations in macromolecule and small-molecule metabolites in human brain after stroke. *Stroke* 32 (12):2797-2802.
- Graham, G. D., P. Kalvach, A. M. Blamire, L. M. Brass, P. B. Fayad, and J. W. Prichard. 1995. Clinical correlates of proton magnetic resonance spectroscopy findings after acute cerebral infarction. *Stroke* 26 (2):225-229.
- Grandati, M., C. Verrecchia, M. L. Revaud, M. Allix, R. G. Boulu, and M. Plotkine. 1997. Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br J Pharmacol* 122 (4):625-630.
- Griffin, J. L., K. K. Lehtimäki, P. K. Valonen, O. H. Grohn, M. I. Kettunen, S. Ylä-Herttuala, A. Pitkanen, J. K. Nicholson, and R. A. Kauppinen. 2003. Assignment of ¹H nuclear magnetic resonance visible polyunsaturated fatty acids in BT4C gliomas undergoing ganciclovir-thymidine kinase gene therapy-induced programmed cell death. *Cancer Res* 63 (12):3195-3201.
- Groenendaal, F., R. A. de Graaf, G. van Vliet, and K. Nicolay. 1999. Effects of hypoxia-ischemia and inhibition of nitric oxide synthase on cerebral energy metabolism in newborn piglets. *Pediatr Res* 45 (6):827-833.
- Gu, W., T. Brannstrom, and P. Wester. 2000. Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 20 (8):1166-1173.
- Gutierrez-Fernandez, M., B. Rodriguez-Frutos, B. Fuentes, M. T. Vallejo-Cremades, J. Alvarez-Grech, M. Exposito-Alcaide, and E. Diez-Tejedor. 2012. CDP-choline treatment induces brain plasticity markers expression in experimental animal stroke. *Neurochem Int* 60 (3):310-317.
- Gutierrez, M., J. J. Merino, M. A. de Lecinana, and E. Diez-Tejedor. 2009. Cerebral protection, brain repair, plasticity and cell therapy in ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 27 Suppl 1:177-186.
- Gyulai, L., M. Schnall, A. C. McLaughlin, J. S. Leigh, Jr., and B. Chance. 1987. Simultaneous ³¹P- and ¹H-nuclear magnetic resonance studies of hypoxia and ischemia in the cat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 7 (5):543-551.
- Hacke, W., M. Kaste, E. Bluhmki, M. Brozman, A. Davalos, D. Guidetti, V. Larrue, K. R. Lees, Z. Medeghri, T. Machnig, D. Schneider, R. von Kummer, N. Wahlgren, D. Toni, and E. Investigators. 2008. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359 (13):1317-1329.
- Hakumäki, J. M., and R. A. Kauppinen. 2000. ¹H NMR visible lipids in the life and death of cells. *Trends Biochem Sci* 25 (8):357-362.
- Hakumäki, J. M., H. Poptani, A. M. Sandmair, S. Ylä-Herttuala, and R. A. Kauppinen. 1999. ¹H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the in vivo detection of apoptosis. *Nat Med* 5 (11):1323-1327.
- Hall, C. N., M. C. Klein-Flugge, C. Howarth, and D. Attwell. 2012. Oxidative phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying brain information processing. *J Neurosci* 32 (26):8940-8951.
- Hanstock, C. C., D. P. Boisvert, M. R. Bendall, and P. S. Allen. 1988. In vivo assessment of focal brain lactate alterations with NMR proton spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* 8 (2):208-214.
- Harada, K., O. Honmou, H. Liu, M. Bando, K. Houkin, and J. D. Kocsis. 2007. Magnetic resonance lactate and lipid signals in rat brain after middle cerebral artery occlusion model. *Brain Res* 1134 (1):206-213.

- Haris, M., K. Cai, A. Singh, H. Hariharan, and R. Reddy. 2011. In vivo mapping of brain myo-inositol. *Neuroimage* 54 (3):2079-2085.
- Heiss, W. D. 2012. The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? *Ann N Y Acad Sci* 1268:26-34.
- Herculano-Houzel, S. Scaling of brain metabolism with a fixed energy budget per neuron: implications for neuronal activity, plasticity and evolution. *PLoS One* 6 (3):e17514.
- Herminghaus, S., U. Pilatus, W. Moller-Hartmann, P. Raab, H. Lanfermann, W. Schlote, and F. E. Zanella. 2002. Increased choline levels coincide with enhanced proliferative activity of human neuroepithelial brain tumors. *NMR Biomed* 15 (6):385-392.
- Hertz, L. 2013. The Glutamate-Glutamine (GABA) Cycle: Importance of Late Postnatal Development and Potential Reciprocal Interactions between Biosynthesis and Degradation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:59.
- Hesselbarth, D., C. Franke, R. Hata, G. Brinker, and M. Hoehn-Berlage. 1998. High resolution MRI and MRS: a feasibility study for the investigation of focal cerebral ischemia in mice. *NMR Biomed* 11 (8):423-429.
- Hoch, J. C., M. W. Maciejewski, and M. R. Gryk. 2008. Comment on "magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain". *Science* 321 (5889):640; author reply 640.
- Hoehn, M., E. Kustermann, J. Blunk, D. Wiedermann, T. Trapp, S. Wecker, M. Focking, H. Arnold, J. Hescheler, B. K. Fleischmann, W. Schwindt, and C. Buhrlé. 2002. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (25):16267-16272.
- Hoehn, M., K. Nicolay, C. Franke, and B. van der Sanden. 2001. Application of magnetic resonance to animal models of cerebral ischemia. *J Magn Reson Imaging* 14 (5):491-509.
- Holmes, E., T. M. Tsang, and S. J. Tabrizi. 2006. The application of NMR-based metabolomics in neurological disorders. *NeuroRx* 3 (3):358-372.
- Huang, Y., W. Chen, Y. Li, X. Wu, X. Shi, and D. Geng. 2010. Effects of antidepressant treatment on N-acetyl aspartate and choline levels in the hippocampus and thalamus of post-stroke depression patients: a study using (1)H magnetic resonance spectroscopy. *Psychiatry Res* 182 (1):48-52.
- Hugg, J. W., J. H. Duijn, G. B. Matson, A. A. Maudsley, J. S. Tsuruda, D. F. Gelinás, and M. W. Weiner. 1992. Elevated lactate and alkalosis in chronic human brain infarction observed by 1H and 31P MR spectroscopic imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 12 (5):734-744.
- Hurtado, O., A. Cardenas, J. M. Pradillo, J. R. Morales, F. Ortego, T. Sobrino, J. Castillo, M. A. Moro, and I. Lizasoain. 2007. A chronic treatment with CDP-choline improves functional recovery and increases neuronal plasticity after experimental stroke. *Neurobiol Dis* 26 (1):105-111.
- Hurtado, O., I. Lizasoain, and M. A. Moro. Neuroprotection and recovery: recent data at the bench on citicoline. *Stroke* 42 (1 Suppl):S33-35.
- Iadecola, C., and J. Anrather. 2011. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17 (7):796-808.
- Igarashi, H., I. L. Kwee, T. Nakada, Y. Katayama, and A. Terashi. 2001. 1H magnetic resonance spectroscopic imaging of permanent focal cerebral ischemia in rat: longitudinal metabolic changes in ischemic core and rim. *Brain Res* 907 (1-2):208-221.
- Ito, U., K. Ohno, R. Nakamura, F. Suganuma, and Y. Inaba. 1979. Brain edema during ischemia and after restoration of blood flow. Measurement of water, sodium, potassium content and plasma protein permeability. *Stroke* 10 (5):542-547.
- Iwata, O., S. Iwata, A. Bainbridge, E. De Vita, T. Matsuishi, E. B. Cady, and N. J. Robertson. 2008. Supra- and sub-baseline phosphocreatine recovery in developing brain after transient

- hypoxia-ischaemia: relation to baseline energetics, insult severity and outcome. *Brain* 131 (Pt 8):2220-2226.
- Jansen, J. F., J. D. Gearhart, and J. W. Bulte. 2008. Comment on "Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain". *Science* 321 (5889):640;author reply 640.
- Jansen, J. F., M. J. Shablott, P. C. van Zijl, K. K. Lehtimäki, J. W. Bulte, J. D. Gearhart, and J. M. Hakumäki. 2006. Stem cell profiling by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 56 (3):666-670.
- Jin, K., M. Minami, J. Q. Lan, X. O. Mao, S. Bateau, R. P. Simon, and D. A. Greenberg. 2001. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (8):4710-4715.
- Jin, K., Y. Sun, L. Xie, A. Peel, X. O. Mao, S. Bateau, and D. A. Greenberg. 2003. Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci* 24 (1):171-189.
- Jung, J. Y., H. S. Lee, D. G. Kang, N. S. Kim, M. H. Cha, O. S. Bang, H. Ryu do, and G. S. Hwang. 2011. 1H-NMR-based metabolomics study of cerebral infarction. *Stroke* 42 (5):1282-1288.
- Kamada, H., K. Sato, M. Iwai, W. R. Zhang, I. Nagano, Y. Manabe, M. Shoji, and K. Abe. 2003. Temporal and spatial changes of free cholesterol and neutral lipids in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Res* 45 (1):91-100.
- Kamalian, S., S. Kamalian, A. A. Konstas, M. B. Maas, S. Payabvash, S. R. Pomerantz, P. W. Schaefer, K. L. Furie, R. G. Gonzalez, and M. H. Lev. 2012. CT perfusion mean transit time maps optimally distinguish benign oligemia from true "at-risk" ischemic penumbra, but thresholds vary by postprocessing technique. *AJNR Am J Neuroradiol* 33 (3):545-549.
- Kang, B. T., D. P. Jang, J. H. Lee, D. I. Jung, S. H. Gu, C. Y. Lim, Y. B. Kim, F. S. Quan, H. J. Kim, E. J. Woo, Z. H. Cho, and H. M. Park. 2009. Detection of cerebral metabolites in a canine model of ischemic stroke using 1H magnetic resonance spectroscopy. *Res Vet Sci* 87 (2):300-306.
- Kang, B. T., R. F. Leoni, D. E. Kim, and A. C. Silva. 2012. Phenylephrine-induced hypertension during transient middle cerebral artery occlusion alleviates ischemic brain injury in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1477:83-91.
- Kang, D. W., J. K. Roh, Y. S. Lee, I. C. Song, B. W. Yoon, and K. H. Chang. 2000. Neuronal metabolic changes in the cortical region after subcortical infarction: a proton MR spectroscopy study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69 (2):222-227.
- Karaszewski, B., J. M. Wardlaw, I. Marshall, V. Cvorovic, K. Wartolowska, K. Haga, P. A. Armitage, M. E. Bastin, and M. S. Dennis. 2009. Early brain temperature elevation and anaerobic metabolism in human acute ischaemic stroke. *Brain* 132 (Pt 4):955-964.
- Katsura, K., T. Kristian, and B. K. Siesjö. 1994. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 22 (4):991-996.
- Kauppinen, R. A., T. Nissinen, A. M. Karkkainen, T. R. Pirttilä, J. Palvimäki, H. Kokko, and S. R. Williams. 1992. Detection of thymosin beta 4 in situ in a guinea pig cerebral cortex preparation using 1H NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 267 (14):9905-9910.
- Kee, N., S. Sivalingam, R. Boonstra, and J. M. Wojtowicz. 2002. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 115 (1):97-105.
- Kempinski, O., H. Otsuka, T. Seiwert, and A. Heimann. 2000. Spreading depression induces permanent cell swelling under penumbra conditions. *Acta Neurochir Suppl* 76:251-255.
- Kernie, S. G., and J. M. Parent. 2010. Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 37 (2):267-274.
- Kidwell, C. S. 2013. MRI biomarkers in acute ischemic stroke: a conceptual framework and historical analysis. *Stroke* 44 (2):570-578.

- Kim, H. E., F. Du, M. Fang, and X. Wang. 2005. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (49):17545-17550.
- Kimura, T., K. Sako, T. Gotoh, K. Tanaka, and T. Tanaka. 2001. In vivo single-voxel proton MR spectroscopy in brain lesions with ring-like enhancement. *NMR Biomed* 14 (6):339-349.
- Kitagawa, H., T. Hayashi, Y. Mitsumoto, N. Koga, Y. Itoyama, and K. Abe. 1998. Reduction of ischemic brain injury by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 29 (7):1417-1422.
- Kohn, K., M. Hoehn-Berlage, G. Mies, T. Back, and K. A. Hossmann. 1995. Relationship between diffusion-weighted MR images, cerebral blood flow, and energy state in experimental brain infarction. *Magn Reson Imaging* 13 (1):73-80.
- Kokaia, Z., P. Thored, A. Arvidsson, and O. Lindvall. 2006. Regulation of stroke-induced neurogenesis in adult brain--recent scientific progress. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1:i162-167.
- Kong, J., P. N. Shepel, C. P. Holden, M. Mackiewicz, A. I. Pack, and J. D. Geiger. 2002. Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. *J Neurosci* 22 (13):5581-5587.
- Krupinski, J., I. Ferrer, M. Barrachina, J. J. Secades, J. Mercadal, and R. Lozano. 2002. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression, nuclear DNA fragmentation, and specific PARP-cleaved products of caspase activation following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neuropharmacology* 42 (6):846-854.
- Kuesel, A. C., G. R. Sutherland, W. Halliday, and I. C. Smith. 1994. 1H MRS of high grade astrocytomas: mobile lipid accumulation in necrotic tissue. *NMR Biomed* 7 (3):149-155.
- Lampe, K. J., R. M. Namba, T. R. Silverman, K. B. Bjugstad, and M. J. Mahoney. 2009. Impact of lactic acid on cell proliferation and free radical-induced cell death in monolayer cultures of neural precursor cells. *Biotechnol Bioeng* 103 (6):1214-1223.
- Lange, T., U. Dydak, T. P. Roberts, H. A. Rowley, M. Bjeljac, and P. Boesiger. 2006. Pitfalls in lactate measurements at 3T. *AJNR Am J Neuroradiol* 27 (4):895-901.
- Laub, G. A. 1995. Time-of-flight method of MR angiography. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 3 (3):391-398.
- Lee, H. J., J. S. Kang, and Y. I. Kim. 2009. Citicoline protects against cognitive impairment in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *J Clin Neurol* 5 (1):33-38.
- Lee, J. M., M. C. Grabb, G. J. Zipfel, and D. W. Choi. 2000. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 106 (6):723-731.
- Lei, H., C. Berthet, L. Hirt, and R. Gruetter. 2009. Evolution of the neurochemical profile after transient focal cerebral ischemia in the mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 29 (4):811-819.
- Lenmyr, F., A. Ericsson, P. Gerwins, H. Ahlstrom, and A. Terent. 2003. Increased brain injury and vascular leakage after pretreatment with p38-inhibitor SB203580 in transient ischemia. *Acta Neurol Scand* 108 (5):339-345.
- Lenmyr, F., A. Ericsson, P. Gerwins, S. Akterin, H. Ahlstrom, and A. Terent. 2004. Src family kinase-inhibitor PP2 reduces focal ischemic brain injury. *Acta Neurol Scand* 110 (3):175-179.
- Levison, S. W., R. P. Rothstein, C. Y. Brazel, G. M. Young, and P. J. Albrecht. 2000. Selective apoptosis within the rat subependymal zone: a plausible mechanism for determining which lineages develop from neural stem cells. *Dev Neurosci* 22 (1-2):106-115.
- Lichtenwalner, R. J., and J. M. Parent. 2006. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *J Cereb Blood Flow Metab* 26 (1):1-20.
- Lie, D. C., H. Song, S. A. Colamarino, G. L. Ming, and F. H. Gage. 2004. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:399-421.

- Liimatainen, T., K. Lehtimäki, M. Ala-Korpela, and J. Hakumäki. 2006. Identification of mobile cholesterol compounds in experimental gliomas by $(1)H$ MRS in vivo: effects of ganciclovir-induced apoptosis on lipids. *FEBS Lett* 580 (19):4746-4750.
- Liimatainen, T. J., A. T. Erkkilä, P. Valonen, H. Vidgren, M. Lakso, G. Wong, O. H. Grohn, S. Ylä-Herttuala, and J. M. Hakumäki. 2008. $1H$ MR spectroscopic imaging of phospholipase-mediated membrane lipid release in apoptotic rat glioma in vivo. *Magn Reson Med* 59 (6):1232-1238.
- Liimatainen, T., J. M. Hakumäki, R. A. Kauppinen, and M. Ala-Korpela. 2009. Monitoring of gliomas in vivo by diffusion MRI and $(1)H$ MRS during gene therapy-induced apoptosis: interrelationships between water diffusion and mobile lipids. *NMR Biomed* 22 (3):272-279.
- Lim, D. A., and A. Alvarez-Buylla. 1999. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (13):7526-7531.
- Lindvall, O., and Z. Kokaia. 2011. Stem cell research in stroke: how far from the clinic? *Stroke* 42 (8):2369-2375.
- Lipscomb, D. C., L. G. Gorman, R. J. Traystman, and P. D. Hurn. 1998. Low molecular weight iron in cerebral ischemic acidosis in vivo. *Stroke* 29 (2):487-492; discussion 493.
- Ljunggren, B., R. A. Ratcheson, and B. K. Siesjö. 1974. Cerebral metabolic state following complete compression ischemia. *Brain Res* 73 (2):291-307.
- Lo, E. H. 2008. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 14 (5):497-500.
- Loewenbruck, K. F., B. Fuchs, A. Hermann, M. Brandt, A. Werner, M. Kirsch, S. Schwarz, J. Schwarz, J. Schiller, and A. Storch. 2011. Proton MR spectroscopy of neural stem cells: does the proton-NMR peak at 1.28 ppm function as a biomarker for cell type or state? *Rejuvenation Res* 14 (4):371-381.
- Lois, C., and A. Alvarez-Buylla. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264 (5162):1145-1148.
- Longa, E. Z., P. R. Weinstein, S. Carlson, and R. Cummins. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20 (1):84-91.
- Longuemare, M. C., M. P. Hill, and R. A. Swanson. 1994. Glycolysis can prevent non-synaptic excitatory amino acid release during hypoxia. *Neuroreport* 5 (14):1789-1792.
- Lopez-Coviella, I., J. Agut, V. Savci, J. A. Ortiz, and R. J. Wurtman. 1995. Evidence that 5'-cytidinediphosphocholine can affect brain phospholipid composition by increasing choline and cytidine plasma levels. *J Neurochem* 65 (2):889-894.
- Lunt, S. Y., and M. G. Vander Heiden. 2011. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:441-464.
- Luskin, M. B. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11 (1):173-189.
- Macintosh, B. J., and S. J. Graham. 2013. Magnetic resonance imaging to visualize stroke and characterize stroke recovery: a review. *Front Neurol* 4:60.
- Mandairon, N., F. Jourdan, and A. Didier. 2003. Deprivation of sensory inputs to the olfactory bulb up-regulates cell death and proliferation in the subventricular zone of adult mice. *Neuroscience* 119 (2):507-516.
- Mandal, P. 2007. *Magnetic resonance spectroscopy (MRS) and its application in Alzheimer's disease*. Vol. Concepts in Magnetic Resonance Part A.
- Manganas, L. N., X. Zhang, Y. Li, R. D. Hazel, S. D. Smith, M. E. Wagshul, F. Henn, H. Benveniste, P. M. Djuric, G. Enikolopov, and M. Maletic-Savatic. 2007. Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science* 318 (5852):980-985.
- Manzanero, S., T. Santro, and T. V. Arumugam. 2012. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: Sources and contribution to cell injury. *Neurochem Int*.

- Mark A. Brown, R. C. S. 2010. *MRI Basic Principles and applications (4th edition)*: Hoboken : John Wiley & Sons.
- Marti-Fabregas, J., M. Romaguera-Ros, U. Gomez-Pinedo, S. Martinez-Ramirez, E. Jimenez-Xarrie, R. Marin, J. L. Marti-Vilalta, and J. M. Garcia-Verdugo. 2010. Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke. *Neurology* 74 (5):357-365.
- Martí-Vilalta, J. 2012. *Enfermedades Vasculares Cerebrales (3ª ed)*: Mayo Ediciones.
- Martin-Sitjar, J., T. Delgado-Goni, M. E. Cabanas, J. Tzen, and C. Arus. 2012. Influence of the spinning rate in the HR-MAS pattern of mobile lipids in C6 glioma cells and in artificial oil bodies. *MAGMA* 25 (6):487-496.
- Martin, S., and R. G. Parton. 2006. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (5):373-378.
- Martinez-Bisbal, M. C., L. Marti-Bonmati, J. Piquer, A. Revert, P. Ferrer, J. L. Llacer, M. Piotto, O. Assemat, and B. Celda. 2004. 1H and 13C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo 1H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed* 17 (4):191-205.
- Martino, G., and S. Pluchino. 2006. The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 7 (5):395-406.
- Masaryk, T. J., G. A. Laub, M. T. Modic, J. S. Ross, and E. M. Haacke. 1990. Carotid-CNS MR flow imaging. *Magn Reson Med* 14 (2):308-314.
- McKay, R. 1997. Stem cells in the central nervous system. *Science* 276 (5309):66-71.
- Medrano MJ, B. R., Cerrato E, Ramirez M. 2006. Incidencia y prevalencia de la cardiopatía isquémica y la enfermedad cerebrovascular en España: revisión sistemática de la literatura. *Revista Española de Salud Pública*, 5-15.
- Merkle, F. T., A. D. Tramontin, J. M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 2004. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (50):17528-17532.
- Meyer, F. B. 1989. Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury. *Brain Res Brain Res Rev* 14 (3):227-243.
- Miller, G. 2007. Neuroscience. Spying on new neurons in the human brain. *Science* 318 (5852):899-900.
- Miller, J. M., R. S. Jope, T. N. Ferraro, and T. A. Hare. 1990. Brain amino acid concentrations in rats killed by decapitation and microwave irradiation. *J Neurosci Methods* 31 (3):187-192.
- Ming, G. L., and H. Song. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250.
- Miyazaki, M., and V. S. Lee. 2008. Nonenhanced MR angiography. *Radiology* 248 (1):20-43.
- Mlynarik, V., I. Kohler, G. Gambarota, A. Vaslin, P. G. Clarke, and R. Gruetter. 2008. Quantitative proton spectroscopic imaging of the neurochemical profile in rat brain with microliter resolution at ultra-short echo times. *Magn Reson Med* 59 (1):52-58.
- Modo, M., K. Mellodew, D. Cash, S. E. Fraser, T. J. Meade, J. Price, and S. C. Williams. 2004. Mapping transplanted stem cell migration after a stroke: a serial, in vivo magnetic resonance imaging study. *Neuroimage* 21 (1):311-317.
- Moffett, J. R., B. Ross, P. Arun, C. N. Madhavarao, and A. M. Namboodiri. 2007. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol* 81 (2):89-131.
- Moldes, O., T. Sobrino, M. Blanco, J. Agulla, D. Barral, P. Ramos-Cabrer, and J. Castillo. 2012. Neuroprotection afforded by antagonists of endothelin-1 receptors in experimental stroke. *Neuropharmacology* 63 (8):1279-1285.
- Monje, M. L., H. Toda, and T. D. Palmer. 2003. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302 (5651):1760-1765.

- Morgenthaler, F. D., D. M. Koski, R. Kraftsik, P. G. Henry, and R. Gruetter. 2006. Biochemical quantification of total brain glycogen concentration in rats under different glycemic states. *Neurochem Int* 48 (6-7):616-622.
- Mori, S., and J. Zhang. 2006. Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. *Neuron* 51 (5):527-539.
- Morshead, C. M., B. A. Reynolds, C. G. Craig, M. W. McBurney, W. A. Staines, D. Morassutti, S. Weiss, and D. van der Kooy. 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13 (5):1071-1082.
- Mountford, C. E., P. Stanwell, A. Lin, S. Ramadan, and B. Ross. 2010. Neurospectroscopy: the past, present and future. *Chem Rev* 110 (5):3060-3086.
- Munoz Maniega, S., V. Cvorovic, F. M. Chappell, P. A. Armitage, I. Marshall, M. E. Bastin, and J. M. Wardlaw. 2008. Changes in NAA and lactate following ischemic stroke: a serial MR spectroscopic imaging study. *Neurology* 71 (24):1993-1999.
- Nadareishvili, Z., and J. Hallenbeck. 2003. Neuronal regeneration after stroke. *N Engl J Med* 348 (23):2355-2356.
- Nagel, S., Y. Su, S. Horstmann, S. Heiland, H. Gardner, J. Koziol, F. J. Martinez-Torres, and S. Wagner. 2008. Minocycline and hypothermia for reperfusion injury after focal cerebral ischemia in the rat: effects on BBB breakdown and MMP expression in the acute and subacute phase. *Brain Res* 1188:198-206.
- Negendank, W. 1992. Studies of human tumors by MRS: a review. *NMR Biomed* 5 (5):303-324.
- Neumann-Haefelin, T., A. Kastrup, A. de Crespigny, M. A. Yenari, T. Ringer, G. H. Sun, and M. E. Moseley. 2000. Serial MRI after transient focal cerebral ischemia in rats: dynamics of tissue injury, blood-brain barrier damage, and edema formation. *Stroke* 31 (8):1965-1972; discussion 1972-1963.
- Norris, D. G., M. Hoehn-Berlage, W. Dreher, K. Kohno, E. Busch, and B. Schmitz. 1998. Characterization of middle cerebral artery occlusion infarct development in the rat using fast nuclear magnetic resonance proton spectroscopic imaging and diffusion-weighted imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 18 (7):749-757.
- Northington, F. J., R. Chavez-Valdez, and L. J. Martin. 2011. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol* 69 (5):743-758.
- Nowicki, J. P., C. Assumel-Luridin, D. Duverger, and E. T. MacKenzie. 1988. Temporal evolution of regional energy metabolism following focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 8 (4):462-473.
- O'Callaghan, J. P., and K. Sriram. 2004. Focused microwave irradiation of the brain preserves in vivo protein phosphorylation: comparison with other methods of sacrifice and analysis of multiple phosphoproteins. *J Neurosci Methods* 135 (1-2):159-168.
- O'Collins, V. E., M. R. Macleod, G. A. Donnan, L. L. Horkey, B. H. van der Worp, and D. W. Howells. 2006. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 59 (3):467-477.
- Ohab, J. J., S. Fleming, A. Blesch, and S. T. Carmichael. 2006. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* 26 (50):13007-13016.
- Olmez, I., and H. Ozyurt. 2012. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochem Int* 60 (2):208-212.
- Olney, J. W., and L. G. Sharpe. 1969. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 166 (3903):386-388.
- Opstad, K. S., A. J. Wright, B. A. Bell, J. R. Griffiths, and F. A. Howe. 2010. Correlations between in vivo (1)H MRS and ex vivo (1)H HRMAS metabolite measurements in adult human gliomas. *J Magn Reson Imaging* 31 (2):289-297.
- Ortega-Martorell, S. 2012. On the Use of Advanced Pattern Recognition Techniques for the Analysis of MRS and MRSI Data in Neuro Oncology.

- Ortega-Martorell, S., P. J. Lisboa, A. Vellido, M. Julia-Sape, and C. Arus. 2012a. Non-negative matrix factorisation methods for the spectral decomposition of MRS data from human brain tumours. *BMC Bioinformatics* 13:38.
- Ortega-Martorell, S., P. J. Lisboa, A. Vellido, R. V. Simoes, M. Pumarola, M. Julia-Sape, and C. Arus. 2012b. Convex non-negative matrix factorization for brain tumor delimitation from MRSI data. *PLoS One* 7 (10):e47824.
- Ortega-Martorell, S., I. Olier, M. Julià-Sapé, and C. Arús. 2010. SpectraClassifier 1.0: a user friendly, automated MRS-based classifier-development system. *BMC Bioinformatics* 11:106.
- Pamenter, M. E., G. A. Perkins, A. K. McGinness, X. Q. Gu, M. H. Ellisman, and G. G. Haddad. 2012. Autophagy and apoptosis are differentially induced in neurons and astrocytes treated with an in vitro mimic of the ischemic penumbra. *PLoS One* 7 (12):e51469.
- Pardo, B., T. B. Rodrigues, L. Contreras, M. Garzon, I. Llorente-Folch, K. Kobayashi, T. Saheki, S. Cerdan, and J. Satrustegui. 2011. Brain glutamine synthesis requires neuronal-born aspartate as amino donor for glial glutamate formation. *J Cereb Blood Flow Metab* 31 (1):90-101.
- Parent, J. M., Z. S. Vexler, C. Gong, N. Derugin, and D. M. Ferriero. 2002. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 52 (6):802-813.
- Parkin, M. C., H. Wei, J. P. O'Callaghan, and R. T. Kennedy. 2005. Sample-dependent effects on the neuropeptidome detected in rat brain tissue preparations by capillary liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 77 (19):6331-6338.
- Parsons, M. W., T. Li, P. A. Barber, Q. Yang, D. G. Darby, P. M. Desmond, R. P. Gerraty, B. M. Tress, and S. M. Davis. 2000. Combined (1)H MR spectroscopy and diffusion-weighted MRI improves the prediction of stroke outcome. *Neurology* 55 (4):498-505.
- Pellerin, L., A. K. Bouzier-Sore, A. Aubert, S. Serres, M. Merle, R. Costalat, and P. J. Magistretti. 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55 (12):1251-1262.
- Perasso, L., P. Spallarossa, C. Gandolfo, P. Ruggeri, and M. Balestrino. 2011. Therapeutic use of creatine in brain or heart ischemia: available data and future perspectives. *Med Res Rev.*
- Peretto, P., A. Merighi, A. Fasolo, and L. Bonfanti. 1997. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res Bull* 42 (1):9-21.
- Pérez-Asensio, F. J. 2006. *Isquemia cerebral focal transitoria en rata: caracterización y utilidad del modelo de sutura intraluminal en el estudio de estrategias neuroprotectoras*. Valencia: Universitat de València.
- Pfeuffer, J., I. Tkac, S. W. Provencher, and R. Gruetter. 1999. Toward an in vivo neurochemical profile: quantification of 18 metabolites in short-echo-time (1)H NMR spectra of the rat brain. *J Magn Reson* 141 (1):104-120.
- Provencher, S. W. 1993. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 30 (6):672-679.
- Qian, J., B. Qian, and H. Lei. 2013. Reversible loss of N-acetylaspartate after 15-min transient middle cerebral artery occlusion in rat: a longitudinal study with in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *Neurochem Res* 38 (1):208-217.
- Quintero, M., M. E. Cabanas, and C. Arus. 2007. A possible cellular explanation for the NMR-visible mobile lipid (ML) changes in cultured C6 glioma cells with growth. *Biochim Biophys Acta* 1771 (1):31-44.
- Rambo, L. M., L. R. Ribeiro, I. D. Della-Pace, D. N. Stamm, R. da Rosa Gerbatin, M. Prigol, S. Pinton, C. W. Nogueira, A. F. Furian, M. S. Oliveira, M. R. Figuera, and L. F. Royes. 2013. Acute creatine administration improves mitochondrial membrane potential and protects against pentylene-tetrazol-induced seizures. *Amino Acids* 44 (3):857-868.

- Rami, A., and D. Kogel. 2008. Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra: Two sides of the same coin? *Autophagy* 4 (4):422-426.
- Ramm, P., M. Bettscheider, D. Beier, H. R. Kalbitzer, W. Kremer, U. Bogdahn, P. Hau, L. Aigner, and C. P. Beier. 2011. 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy of glioblastoma cancer stem cells. *Stem Cells Dev* 20 (12):2189-2195.
- Ramm, P., S. Couillard-Despres, S. Plotz, F. J. Rivera, M. Krampert, B. Lehner, W. Kremer, U. Bogdahn, H. R. Kalbitzer, and L. Aigner. 2009. A nuclear magnetic resonance biomarker for neural progenitor cells: is it all neurogenesis? *Stem Cells* 27 (2):420-423.
- Ramm Sander, P., P. Hau, S. Koch, K. Schutze, U. Bogdahn, H. R. Kalbitzer, and L. Aigner. 2013a. Stem cell metabolic and spectroscopic profiling. *Trends Biotechnol* 31 (3):204-213.
- Ramm Sander. 2013b. Stem cell metabolic and spectroscopic profiling. *Trends Biotechnol*.
- Ridgway, J. P. 2010. Cardiovascular magnetic resonance physics for clinicians: part I. *J Cardiovasc Magn Reson* 12:71.
- Roberts, T. P., and H. A. Rowley. 2003. Diffusion weighted magnetic resonance imaging in stroke. *Eur J Radiol* 45 (3):185-194.
- Rosell, A., E. Cuadrado, J. Alvarez-Sabin, M. Hernandez-Guillamon, P. Delgado, A. Penalba, M. Mendioroz, A. Rovira, I. Fernandez-Cadenas, M. Ribo, C. A. Molina, and J. Montaner. 2008. Caspase-3 is related to infarct growth after human ischemic stroke. *Neurosci Lett* 430 (1):1-6.
- Ross, A. J., P. S. Sachdev, W. Wen, M. J. Valenzuela, and H. Brodaty. 2005. 1H MRS in stroke patients with and without cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 26 (6):873-882.
- Rudkin, T. M., and D. L. Arnold. 1999. Proton magnetic resonance spectroscopy for the diagnosis and management of cerebral disorders. *Arch Neurol* 56 (8):919-926.
- Rueger, M. A., H. Backes, M. Walberer, B. Neumaier, R. Ullrich, M. L. Simard, B. Emig, G. R. Fink, M. Hoehn, R. Graf, and M. Schroeter. 2010. Noninvasive imaging of endogenous neural stem cell mobilization in vivo using positron emission tomography. *J Neurosci* 30 (18):6454-6460.
- Rueger, M. A., S. Muesken, M. Walberer, S. U. Jantzen, K. Schnakenburg, H. Backes, R. Graf, B. Neumaier, M. Hoehn, G. R. Fink, and M. Schroeter. 2012. Effects of minocycline on endogenous neural stem cells after experimental stroke. *Neuroscience* 215:174-183.
- Sahin, S., T. Alkan, S. G. Temel, K. Tureyen, S. Tolunay, and E. Korfali. 2010. Effects of citicoline used alone and in combination with mild hypothermia on apoptosis induced by focal cerebral ischemia in rats. *J Clin Neurosci* 17 (2):227-231.
- Sajda, P., S. Du, T. R. Brown, R. Stoyanova, D. C. Shungu, X. Mao, and L. C. Parra. 2004. Nonnegative matrix factorization for rapid recovery of constituent spectra in magnetic resonance chemical shift imaging of the brain. *IEEE Trans Med Imaging* 23 (12):1453-1465.
- Sanai, N., A. D. Tramontin, A. Quinones-Hinojosa, N. M. Barbaro, N. Gupta, S. Kunwar, M. T. Lawton, M. W. McDermott, A. T. Parsa, J. Manuel-Garcia Verdugo, M. S. Berger, and A. Alvarez-Buylla. 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427 (6976):740-744.
- Saunders, D. E., F. A. Howe, A. van den Boogaart, J. R. Griffiths, and M. M. Brown. 1997. Discrimination of metabolite from lipid and macromolecule resonances in cerebral infarction in humans using short echo proton spectroscopy. *J Magn Reson Imaging* 7 (6):1116-1121.
- Schmerbach, K., J. H. Scheffe, M. Krikov, S. Muller, A. Villringer, U. Kintscher, T. Unger, and C. Thoene-Reineke. 2008. Comparison between single and combined treatment with candesartan and pioglitazone following transient focal ischemia in rat brain. *Brain Res* 1208:225-233.
- Schmitz, J. E., M. I. Kettunen, D. E. Hu, and K. M. Brindle. 2005. 1H MRS-visible lipids accumulate during apoptosis of lymphoma cells in vitro and in vivo. *Magn Reson Med* 54 (1):43-50.

- Scholzen, T., and J. Gerdes. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182 (3):311-322.
- Secades, J. J. 2011. Citicoline: pharmacological and clinical review, 2010 update. *Rev Neurol* 52 Suppl 2:S1-S62.
- Secades 2012. Probably role of citicoline in stroke rehabilitation: review of the literature. *Rev Neurol* 54 (3):173-179.
- Shimada, I. S., B. M. Peterson, and J. L. Spees. 2010. Isolation of locally derived stem/progenitor cells from the peri-infarct area that do not migrate from the lateral ventricle after cortical stroke. *Stroke* 41 (9):e552-560.
- Shimizu, H., T. Kumabe, T. Tominaga, T. Kayama, K. Hara, Y. Ono, K. Sato, N. Arai, S. Fujiwara, and T. Yoshimoto. 1996. Noninvasive evaluation of malignancy of brain tumors with proton MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol* 17 (4):737-747.
- Sierra, A., J. M. Encinas, and M. Maletic-Savatic. 2011. Adult human neurogenesis: from microscopy to magnetic resonance imaging. *Front Neurosci* 5:47.
- Siesjo, B. K., and F. Bengtsson. 1989. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 9 (2):127-140.
- Simard, J. M., T. A. Kent, M. Chen, K. V. Tarasov, and V. Gerzanich. 2007. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol* 6 (3):258-268.
- Simmons, M. L., C. G. Frondoza, and J. T. Coyle. 1991. Immunocytochemical localization of N-acetyl-aspartate with monoclonal antibodies. *Neuroscience* 45 (1):37-45.
- Simoes, R. V., T. Delgado-Goni, S. Lope-Piedrafita, and C. Arus. 2010. 1H-MRSI pattern perturbation in a mouse glioma: the effects of acute hyperglycemia and moderate hypothermia. *NMR Biomed* 23 (1):23-33.
- Simões RV, C. A., Julià-Sapé M, Arús C. 2012. *In Vivo Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging and Ex Vivo Quantitative Neuropathology by High Resolution Magic Angle Spinning Proton Magnetic Resonance Spectroscopy*. Vol. 77. Animal Models of Brain Tumors
- Sims, J. R., S. W. Lee, K. Topalkara, J. Qiu, J. Xu, Z. Zhou, and M. A. Moskowitz. 2009. Sonic hedgehog regulates ischemia/hypoxia-induced neural progenitor proliferation. *Stroke* 40 (11):3618-3626.
- Sims, N. R., and H. Muyderman. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim Biophys Acta* 1802 (1):80-91.
- Simsek, T., F. Kocabas, J. Zheng, R. J. Deberardinis, A. I. Mahmoud, E. N. Olson, J. W. Schneider, C. C. Zhang, and H. A. Sadek. 2010. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 7 (3):380-390.
- Sobrado, M., M. G. Lopez, F. Carceller, A. G. Garcia, and J. M. Roda. 2003. Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 118 (1):107-113.
- Song, H., C. F. Stevens, and F. H. Gage. 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417 (6884):39-44.
- Srivastava, S., Y. Kashiwaya, X. Chen, J. D. Geiger, R. Pawlosky, and R. L. Veech. 2012. Microwave irradiation decreases ATP, increases free [Mg²⁺], and alters in vivo intracellular reactions in rat brain. *J Neurochem* 123 (5):668-675.
- Stefan, D. D. C., F.; Andrasescu, A.; Popa, E.; Lazariev, A.; Vescovo, E.; Strbak, O.; Williams, S.; Starcuk, Z.; Cabanas, M.; van Ormondt, D.; Graveron-Demilly, D. 2009. Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals: the jMRUI software package *Measurement Science and Technology*.
- Stilley, C. S., C. M. Ryan, D. Kondziolka, A. Bender, S. DeCesare, and L. Wechsler. 2004. Changes in cognitive function after neuronal cell transplantation for basal ganglia stroke. *Neurology* 63 (7):1320-1322.

- Syntichaki, P., and N. Tavernarakis. 2003. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci* 4 (8):672-684.
- Sztriha, L. K., R. L. O'Gorman, M. Modo, G. J. Barker, S. C. Williams, and L. Kalra. 2012. Monitoring brain repair in stroke using advanced magnetic resonance imaging. *Stroke* 43 (11):3124-3131.
- Takeo, S., T. Taguchi, K. Tanonaka, K. Miyake, T. Horiguchi, N. Takagi, and K. Fujimori. 1992. Sustained damage to energy metabolism of brain regions after microsphere embolism in rats. *Stroke* 23 (1):62-68.
- Tate, A. R., J. R. Griffiths, I. Martinez-Perez, A. Moreno, I. Barba, M. E. Cabanas, D. Watson, J. Alonso, F. Bartumeus, F. Isamat, I. Ferrer, F. Vila, E. Ferrer, A. Capdevila, and C. Arus. 1998. Towards a method for automated classification of ¹H MRS spectra from brain tumours. *NMR Biomed* 11 (4-5):177-191.
- Tate, A. R., J. Underwood, D. M. Acosta, M. Julia-Sape, C. Majos, A. Moreno-Torres, F. A. Howe, M. van der Graaf, V. Lefournier, M. M. Murphy, A. Loosemore, C. Ladroue, P. Wesseling, J. Luc Bosson, M. E. Cabanas, A. W. Simonetti, W. Gajewicz, J. Calvar, A. Capdevila, P. R. Wilkins, B. A. Bell, C. Remy, A. Heerschap, D. Watson, J. R. Griffiths, and C. Arus. 2006. Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra. *NMR Biomed* 19 (4):411-434.
- Tavazoie, M., L. Van der Veken, V. Silva-Vargas, M. Louissaint, L. Colonna, B. Zaidi, J. M. Garcia-Verdugo, and F. Doetsch. 2008. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3 (3):279-288.
- Thomas, L. B., M. A. Gates, and D. A. Steindler. 1996. Young neurons from the adult subependymal zone proliferate and migrate along an astrocyte, extracellular matrix-rich pathway. *Glia* 17 (1):1-14.
- Thored, P., A. Arvidsson, E. Cacci, H. Ahlenius, T. Kallur, V. Darsalia, C. T. Ekdahl, Z. Kokaia, and O. Lindvall. 2006. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 24 (3):739-747.
- Thored, P., J. Wood, A. Arvidsson, J. Cammenga, Z. Kokaia, and O. Lindvall. 2007. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 38 (11):3032-3039.
- Thornton, J. S., R. J. Ordidge, J. Penrice, E. B. Cady, P. N. Amess, S. Punwani, M. Clemence, and J. S. Wyatt. 1998. Temporal and anatomical variations of brain water apparent diffusion coefficient in perinatal cerebral hypoxic-ischemic injury: relationships to cerebral energy metabolism. *Magn Reson Med* 39 (6):920-927.
- Tkac, I., C. D. Keene, J. Pfeuffer, W. C. Low, and R. Gruetter. 2001. Metabolic changes in quinolinic acid-lesioned rat striatum detected non-invasively by in vivo (¹H) NMR spectroscopy. *J Neurosci Res* 66 (5):891-898.
- Trump, B. F., and I. K. Berezsky. 1996. The role of altered [Ca²⁺]_i regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis. *Biochim Biophys Acta* 1313 (3):173-178.
- Tsang, T. M., J. L. Griffin, J. Haselden, C. Fish, and E. Holmes. 2005. Metabolic characterization of distinct neuroanatomical regions in rats by magic angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 53 (5):1018-1024.
- Tugnoli, V., M. R. Tosi, A. Tinti, A. Trincherro, G. Bottura, and G. Fini. 2001. Characterization of lipids from human brain tissues by multinuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biopolymers* 62 (6):297-306.
- Ueda, H., R. Fujita, A. Yoshida, H. Matsunaga, and M. Ueda. 2007. Identification of prothymosin- α 1, the necrosis-apoptosis switch molecule in cortical neuronal cultures. *J Cell Biol* 176 (6):853-862.
- Unterberg, A. W., J. Stover, B. Kress, and K. L. Kiening. 2004. Edema and brain trauma. *Neuroscience* 129 (4):1021-1029.

- Valverde-Saubi, D., A. P. Candiota, M. A. Molins, M. Feliz, O. Godino, M. Davila, J. J. Acebes, and C. Arus. 2010. Short-term temperature effect on the HRMAS spectra of human brain tumor biopsies and their pattern recognition analysis. *MAGMA* 23 (4):203-215.
- Valverde, D., M. R. Quintero, A. P. Candiota, L. Badiella, M. E. Cabanas, and C. Arus. 2006. Analysis of the changes in the ¹H NMR spectral pattern of perchloric acid extracts of C6 cells with growth. *NMR Biomed* 19 (2):223-230.
- van der Zijden, J. P., P. van Eijnden, R. A. de Graaf, and R. M. Dijkhuizen. 2008. ¹H/¹³C MR spectroscopic imaging of regionally specific metabolic alterations after experimental stroke. *Brain* 131 (Pt 8):2209-2219.
- van Zandvoort, M. J., J. van der Grond, L. J. Kappelle, and E. H. de Haan. 2005. Cognitive deficits and changes in neurometabolites after a lacunar infarct. *J Neurol* 252 (2):183-190.
- Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley, and C. B. Thompson. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324 (5930):1029-1033.
- Varum, S., A. S. Rodrigues, M. B. Moura, O. Momcilovic, C. A. t. Easley, J. Ramalho-Santos, B. Van Houten, and G. Schatten. 2011. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One* 6 (6):e20914.
- Wang, Y., K. Jin, X. O. Mao, L. Xie, S. Banwait, H. H. Marti, and D. A. Greenberg. 2007. VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *J Neurosci Res* 85 (4):740-747.
- Wang, Y., Y. Wang, M. Li, P. Xu, T. Gu, T. Ma, and S. Gu. 2013. (¹H NMR-based metabolomics exploring biomarkers in rat cerebrospinal fluid after cerebral ischemia/reperfusion. *Mol Biosyst* 9 (3):431-439.
- Ward, N. S., and L. G. Cohen. 2004. Mechanisms underlying recovery of motor function after stroke. *Arch Neurol* 61 (12):1844-1848.
- Wardlaw, J. M., I. Marshall, J. Wild, M. S. Dennis, J. Cannon, and S. C. Lewis. 1998. Studies of acute ischemic stroke with proton magnetic resonance spectroscopy: relation between time from onset, neurological deficit, metabolite abnormalities in the infarct, blood flow, and clinical outcome. *Stroke* 29 (8):1618-1624.
- Weber, R., P. Ramos-Cabrera, and M. Hoehn. 2006. Present status of magnetic resonance imaging and spectroscopy in animal stroke models. *J Cereb Blood Flow Metab* 26 (5):591-604.
- Wheaton, A. J., and M. Miyazaki. 2012. Non-contrast enhanced MR angiography: physical principles. *J Magn Reson Imaging* 36 (2):286-304.
- Wishart, D. S., T. Jewison, A. C. Guo, M. Wilson, C. Knox, Y. Liu, Y. Djoumbou, R. Mandal, F. Aziat, E. Dong, S. Bouatra, I. Sinelnikov, D. Arndt, J. Xia, P. Liu, F. Yallou, T. Bjorn Dahl, R. Perez-Pineiro, R. Eisner, F. Allen, V. Neveu, R. Greiner, and A. Scalbert. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res* 41 (Database issue):D801-807.
- Woo, C. W., B. S. Lee, S. T. Kim, and K. S. Kim. 2010. Correlation between lactate and neuronal cell damage in the rat brain after focal ischemia: An in vivo ¹H magnetic resonance spectroscopic (¹H-MRS) study. *Acta Radiol* 51 (3):344-350.
- Wright, A. J., G. A. Fellows, J. R. Griffiths, M. Wilson, B. A. Bell, and F. A. Howe. 2010. Ex-vivo HRMAS of adult brain tumours: metabolite quantification and assignment of tumour biomarkers. *Mol Cancer* 9:66.
- Wyss, M., and R. Kaddurah-Daouk. 2000. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80 (3):1107-1213.
- Yamashita, T., M. Ninomiya, P. Hernandez Acosta, J. M. Garcia-Verdugo, T. Sunabori, M. Sakaguchi, K. Adachi, T. Kojima, Y. Hirota, T. Kawase, N. Araki, K. Abe, H. Okano, and K. Sawamoto. 2006. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26 (24):6627-6636.

- Yang, M., S. Wang, F. Hao, Y. Li, H. Tang, and X. Shi. 2012. NMR analysis of the rat neurochemical changes induced by middle cerebral artery occlusion. *Talanta* 88:136-144.
- Zancanaro, C., R. Nano, C. Marchioro, A. Sbarbati, A. Boicelli, and F. Osculati. 1994. Magnetic resonance spectroscopy investigations of brown adipose tissue and isolated brown adipocytes. *J Lipid Res* 35 (12):2191-2199.
- Zhang, R. L., Z. G. Zhang, L. Zhang, and M. Chopp. 2001. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 105 (1):33-41.
- Zhang, R., Z. Zhang, L. Wang, Y. Wang, A. Gousev, L. Zhang, K. L. Ho, C. Morshead, and M. Chopp. 2004a. Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 24 (4):441-448.
- Zhang, R., Z. Zhang, C. Zhang, L. Zhang, A. Robin, Y. Wang, M. Lu, and M. Chopp. 2004b. Stroke transiently increases subventricular zone cell division from asymmetric to symmetric and increases neuronal differentiation in the adult rat. *J Neurosci* 24 (25):5810-5815.
- Zhang, R. L., Z. G. Zhang, and M. Chopp. 2005. Neurogenesis in the adult ischemic brain: generation, migration, survival, and restorative therapy. *Neuroscientist* 11 (5):408-416.
- Zhang, R. L., Z. G. Zhang, M. Lu, Y. Wang, J. J. Yang, and M. Chopp. 2006. Reduction of the cell cycle length by decreasing G1 phase and cell cycle reentry expand neuronal progenitor cells in the subventricular zone of adult rat after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 26 (6):857-863.
- Zhang, R. L., Y. LeTourneau, S. R. Gregg, Y. Wang, Y. Toh, A. M. Robin, Z. G. Zhang, and M. Chopp. 2007. Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: a study of dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone. *J Neurosci* 27 (12):3157-3162.
- Zhang 2008a. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. *Neuropharmacology* 55 (3):345-352.
- Zhang, R. L., Z. G. Zhang, C. Roberts, Y. LeTourneau, M. Lu, L. Zhang, Y. Wang, and M. Chopp. 2008b. Lengthening the G1 phase of neural progenitor cells is concurrent with an increase of symmetric neuron generating division after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 28 (3):602-611.
- Zhang, Z. G., and M. Chopp. 2009. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurol* 8 (5):491-500
- Zhang, R. L., M. Chopp, S. R. Gregg, Y. Toh, C. Roberts, Y. LeTourneau, B. Buller, L. Jia, S. P. N. Davarani, and Z. G. Zhang. 2009. Patterns and dynamics of subventricular zone neuroblast migration in the ischemic striatum of the adult mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 29 (7):1240-1250.
- .Zoula, S., G. Herigault, A. Ziegler, R. Farion, M. Decorps, and C. Remy. 2003. Correlation between the occurrence of 1H-MRS lipid signal, necrosis and lipid droplets during C6 rat glioma development. *NMR Biomed* 16 (4):199-212.