



CONSTRUCCIÓN Y VALIDACIÓN DE UN FANTOMA QUE REPRODUZCA EL COMPORTAMIENTO DEL HÍGADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HIERRO Y GRASA

Autora

COLOMA ÁLVAREZ DE EULATE LÓPEZ

Director

Dr. JOSÉ IGNACIO EMPARANZA KNÖRR

Enero de 2021

Esta Tesis ha sido desarrollada, con la ayuda del proyecto de investigación en salud del Gobierno Vasco, en su convocatoria del 2015 con código de proyecto: 2015111033.

Y con la beca otorgada por la Sociedad Española de Radiología Médica, concedida el 20 de enero de 2016.

A mi madre y amiga, Esther López Marín

Entre tantas cosas, gracias por enseñarme el valor del esfuerzo y el gusto por el trabajo bien hecho.

Aunque ya no estés, siempre me acompañas.

Muchas han sido las personas que me han ayudado a lo largo de estos años y quiero mostrarles mi agradecimiento:

A mi director de tesis, Dr. José Ignacio Emparanza, por su apoyo, ánimo y comprensión, pero sobre todo por compartir conmigo su sabiduría. Me siento afortunada por haber sido su doctoranda.

A Txema Alustiza, por contar conmigo para desarrollar este proyecto y dirigirme por el camino de la RM, su espíritu decidido le hace único.

A Raúl Jiménez y a Txema Alustiza por proporcionarme los datos anonimizados de los pacientes, haber hecho posible el desarrollo práctico de este proyecto.

A Pedro Guerrero, del Grupo BIOMAT de la UPV/EHU, por su asesoramiento en el mundo de los materiales renovables. Contar con su apoyo para desarrollar la parte de materiales ha sido esencial.

Al equipo técnico y humano de los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la UPV/EHU.

Al equipo de Osatek Donostia, por continuar impulsado la investigación y en especial a Emma Salvador, Elisabet García, Manuel San Vicente y a todos los técnicos que dedican parte de su actividad a ayudarnos a continuar investigando, sin vosotros sería imposible.

A las personas del Grupo de enfermedades hepáticas y a las del Animalario y quirófano experimental del IIS Biodonostia, con las que he compartido tantas tardes en el laboratorio. En especial a Matxus Perugorria y a Carlos San José Marqués, por ayudarme en todo lo que he necesitado.

AGRADECIMIENTOS

A las personas que trabajan en la biblioteca por estar siempre ahí para cuando lo he necesitado. En especial a Eukene Ansuategui, es una suerte contar con una profesional siempre dispuesta a ayudar.

A mi familia, sin ellos nada de esto hubiera sido posible. A mi querida madre, "mi incondicional", por su amor y dedicación, sin tía la vida no hubiera sido tan feliz, me siento privilegiada por haberte tenido. A mis abuelos Coloma y Agustín y a mi tío Cristóbal, por vuestro cariño y presencia. A mis hermanos, siempre juntos, por vuestro apoyo, ayuda y amistad. A Maddi y Amets, por los ratos de juegos, risas y aventuras, con vosotros la vida brilla mucho más.

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Enfermedades hepáticas por depósito de hierro y grasa	3
2. Cuantificación de grasa y hierro en el hígado.....	7
3. Cuantificación de grasa y hierro por RM.....	10
4. Cuantificación de grasa y hierro por RM con Fantomas.	12
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
1. Diseño del soporte.....	23
2. Selección de los componentes.....	27
3. Preparación de las muestras	32
4. Sintetización del hidrogel	36
5. Realización de la RM.....	37
6. Análisis Estadístico.....	40
RESULTADOS.....	45
1. Comparación del contenido medio de hierro real del Fantoma biológico con la concentración medida por RM.	47
2. Variabilidad de la concentración de hierro estimado por RM entre los diferentes Fantomas biológicos.....	53
3. Caracterización del hidrogel.....	56
3.1. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	58
3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	65
3.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	69
3.4. Hidratación del hidrogel.....	73
3.5. Determinación del pH.....	74
4. Comparación del contenido medio de hierro y grasa real del Fantoma orgánico con la concentración medida por RM.....	74
5. Variación de las señales por RM en el Fantoma orgánico.	76

TABLA DE CONTENIDOS

5.1. Señal Media de agua	77
5.2. Señal T2*	77
5.3. Concentración de Hierro Hepático (CHH)	78
5.4. Señal Media de grasa	79
5.5. Concentración de Grasa Hepática (FF)	80
6. Correlación de la concentración de hierro y grasa, del fantoma orgánico, por diferentes métodos de RM.	80
7. Correlación de la concentración de hierro y grasa por RM medida en el Fantoma orgánico y en pacientes, por diferentes métodos de RM.	84
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIONES	107
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXOS.....	121

Figura N ^o	Página
Figura 1 Evolución de la enfermedad por hígado graso no alcohólico o esteatosis (8).	5
Figura 2 Bobina de cráneo y cuello. Bobina de transmisión y recepción (32).	23
Figura 3 Geometría y dimensiones del Fantoma biológico.....	24
Figura 4 Bobina corporal (29).	25
Figura 5 Geometría y dimensiones del Fantoma orgánico.	26
Figura 6 Energía de unión de los hidrogeles dependiendo del tipo de enlace (64).	30
Figura 7 Módulo de Young (E) en función del peso molecular para varios hidrogeles (64).	31
Figura 8 Dimensiones y colocación de tubos en Fantoma biológico.	33
Figura 9 Dimensiones y colocación de tubos centrales en Fantoma biológico.....	33
Figura 10 Esquema del proceso de sintetización en el Fantoma orgánico.....	36
Figura 11 Relación estadística lineal entre las concentración Fe ³⁺ por RM y concentración real en los Fantomas biológicos. 51	51
Figura 12 Grafica Bland-Altman por cada Fantoma biológico.....	53
Figura 13 Diagrama de cajas de las concentraciones medidas por RM agrupadas por la misma cantidad preparada o real para los Fantomas Biológicos.	55
Figura 14 Espectro FTIR del compuesto Ferrimanitol Ovoalbúmina... 59	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 15 Espectro FTIR de la Manteca de oca.	60
Figura 16 Espectro FTIR de los tubos A1 [0, 0] e I1 [0, 2.000].	62
Figura 17 Espectro FTIR de los tubos B4 [30, 200] y E4 [0, 800] del Fantoma orgánico.	64
Figura 18 Curvas DSC de los componentes del Fantoma orgánico..	65
Figura 19 Curvas DSC de los tubos A1, A2, A3 y A4 del Fantoma orgánico.	66
Figura 20 Curvas DSC de los tubos A1, B1, C1, D1 y F1 del Fantoma orgánico.	67
Figura 21 Curvas DSC de los tubos B1 – B4, C1 – C4 y D1 – D4 del Fantoma orgánico.	68
Figura 22 Curvas DSC de los tubos E2 – E4 y F1 – F4 del Fantoma orgánico.	69
Figura 23 Imágenes SEM del hidrogel D1 [0,600].	71
Figura 24 Imágenes SEM del hidrogel D4 [30,600].	72
Figura 25 Variación de la media de agua por RM en el Fantoma orgánico.	73
Figura 26 Comparación de la media de grasa medida por RM al variar la concentración de Fe ³⁺	75
Figura 27 Variación de la señal T2* por RM en el Fantoma orgánico.	78
Figura 28 Variación de la señal de CHH por RM en el Fantoma orgánico	78

Figura 29 Variación de la señal de Media de Grasa por RM en el Fantoma orgánico.....	79
Figura 30 Variación de la señal FF por RM en el Fantoma orgánico.	80
Figura 31 Correlación CHH por RM mediante Osatek SEDIA y Wood en el Fantoma orgánico.....	81
Figura 32 Correlación CHH por RM mediante Osatek SEDIA y Garbowki para el Fantoma orgánico.	82
Figura 33 Correlación FF por RM (PDFF) y método de Folch en el Fantoma orgánico.....	83
Figura 34 Correlación CHH por RM mediante Osatek SEDIA y Wood para los pacientes y para el Fantoma orgánico.....	84
Figura 35 Correlación CHH por RM mediante Osatek SEDIA y Garbowski para los pacientes y para el Fantoma orgánico.	85
Figura 36 Correlación FF por RM (PDFF) y método de Folch para los pacientes y para el Fantoma orgánico.	86
Figura 37 Hidrogeles A1 [0, 0], C3 [20, 400], E4 [30, 800] y G1 [0, 1.200] del Fantoma orgánico.	95
Figura 38 Estructura del núcleo mineral de hierro que se forma en el interior de la ferritina (95).	96

Tabla N°	Página
Tabla 1 Clasificación de los trastornos por sobrecarga de hierro.(3)	4
Tabla 2 Métodos de cuantificación por imagen.	9
Tabla 3 Métodos de adquisición y posproceso por RM para la cuantificación de la CHH.	11
Tabla 4 Etapas en el diseño experimental	19
Tabla 5 Almacenamiento de hierro en el hígado.	28
Tabla 6 Fe ³⁺ (μmol/gr) añadido en Fantoma biológico.	32
Tabla 7 Composición de los tubos/muestras de hidrogel.	34
Tabla 8 Fe ³⁺ (mgr) añadido en relación al grado de sobrecarga hepática en el Fantoma orgánico.	35
Tabla 9 Triglicérido (ml) añadido en relación al grado de sobrecarga hepática	35
Tabla 10 Parámetros de adquisición en RM para medir sobrecarga de hierro.	37
Tabla 11 Parámetros de adquisición en RM para medir sobrecarga de grasa.	39
Tabla 12 Relación de tubos preparados por cada Fantoma biológico.	47
Tabla 13 Comparación de medias mediante T-student para muestras pareadas en los Fantomas biológicos.	48
Tabla 14 Análisis de regresión lineal de las concentraciones reales y medidas por RM para los Fantomas biológicos.	49
Tabla 15 Análisis de Bland-Altman por cada Fantoma biológico.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 16 Concentraciones y número de tubos por concentración real de Fe 3+.	54
Tabla 17 Análisis de regresión lineal de las concentraciones reales y medidas por RM para los tubos del Fantomas biológicos.	54
Tabla 18 Variación de la concentración por RM por cada una de las concentraciones preparadas en los Fantomas biológicos.	55
Tabla 19 Relación de tubos con análisis FTIR	58
Tabla 20 Bandas FTIR del Ferrimanitol.	59
Tabla 21 Bandas de FTIR en la Manteca de oca.	61
Tabla 22 Variación del pH de los hidrogeles en el Fantoma orgánico	74
Tabla 23 Descripción estadística de la variación de la concentración de grasa medida por RM para el Fantoma orgánico.	76
Tabla 24 Variables categóricas para la sintetización del Fantoma orgánico.	94

Abreviatura	Definición
CHH	Concentración de hierro en el hígado
cm⁻¹	Ciclos por centímetro
cm²	Centímetro cuadrado
DP	Densidad Protónica
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
E	Módulo de Young o módulo de elasticidad.
FA	Ácidos grasos (fatty acids)
Fe	Hierro
FF	Fracción de Grasa (Fat fraction)
FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
HH	Hierro hepático
HUD	Hospital Universitario Donostia
I.C.	Intervalo de Confianza
IHH	Índice de hierro hepático
IIS	Instituto de Investigación Sanitaria.
IPN	Hidrogel de redes interpenetradas.
KDa	Kilo Dalton
KPa	Kilo Pascales
M	Masa molecular
Mc	Grado de reticulación
mg	Mili gramos
min	minutos
ml	Mili litros
mm	milímetros
ms	Mili segundos
Nº	Número
N₂	Nitrógeno molecular o dinitrógeno
NAFL	Hígado graso no alcohólico. (nonalcoholic fatty liver)
NAFLD	Enfermedad por hígado graso no alcohólico (nonalcoholic fatty liver disease)

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Abreviatura	Definición
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica (nonalcoholic steatohepatitis)
p	probabilidad
pH	Potencial Hidrogeno
PDFF	Densidad de protones por fracción de grasa (proton density fat fraction)
PMMA	Polimetacrilato de metilo
r	Coefficiente de correlación de Perarson
RM	Resonancia Magnética (Magnetic resonance imaging)
ROI	Región de Interés (Region of interest)
RIS	Ratio Intensidad de Señal (Signal intensity ratio)
rpm	Revoluciones por minuto
S.D.	Desviación estandar
seg	segundos
SEM	Microscopia electrónica de barrido
V(nº)	Velocidad número
T	Tesla (unidad de inducción magnética)
T1	Tiempo de relajación longitudinal
T2	Tiempo de relajación transversal
T2*	Tiempo de relajación transversal en eco de gradiente
TC	Tomografía Computerizada
\bar{x}	Media
µmol	Micro moles
°C	Grados Celsius
°	Angulo de excitación

INTRODUCCIÓN

Enfermedades hepáticas por depósito de hierro y grasa

Cuantificación de grasa y hierro en el hígado

Cuantificación de grasa y hierro por MR

Cuantificación de grasa y hierro por MR mediante Fantomas

1. Enfermedades hepáticas por depósito de hierro y grasa

El hígado desempeña papeles críticos en muchos procesos biológicos, incluyendo el metabolismo de los lípidos y la homeostasis del hierro (1). Debido a lo cual, entre las enfermedades del hígado más prevalentes se encuentran las enfermedades por sobrecarga de hierro y por sobrecarga de grasa.

Aunque los estudios de prevalencia realizados hasta ahora están dirigidos a la población en general, y muchos de ellos se consideran infravalorados, (2) estas sobrecargas en algunas poblaciones origina una preocupación de salud pública (3).

La sobrecarga de hierro es perjudicial porque el organismo no es capaz de eliminar el exceso de hierro y este se deposita en diferentes órganos, dañándolos con el paso del tiempo, de forma irreversible.

Aunque la sobrecarga de hierro se puede ver en muchos órganos, el hígado es el órgano principal de almacenamiento de hierro, el primero en mostrar sobrecarga de hierro y el único que muestra una relación lineal entre su concentración de hierro y el hierro corporal total (3). Pero también se puede acumular en otros órganos, como el corazón, el páncreas, el bazo y la médula ósea.

Con el tiempo, los órganos cargados de hierro pueden desarrollar disfunción y falla. La enfermedad hepática por deposición de hierro o **hemocromatosis**, se puede clasificar en dos categorías principales: sobrecarga primaria de hierro o hereditaria, y sobrecarga de hierro secundario causado por hierro exógeno (3) (Tabla 1).

Introducción

Clasificación

Hemocromatosis Hereditaria (sobrecarga primaria)	Enfermedades genéticas
	Causa <ul style="list-style-type: none">- Defecto en gen HFE (la más común)- Mutación en la proteína ferroporfina, receptor de transferrina 2, anti hepcidina péptido microbiano, etc.
Hemosiderosis transfusional (sobrecarga secundaria o exógena)	β -talasemia mayor
	Causa <p>Enfermedad autosómica recesiva. Ambas cadenas son anormales, no hay hemoglobina A.</p>
	Enfermedad de célula falciforme
	Causa <p>Enfermedad autosómica recesiva. Mutaciones en ambas cadenas; hemoglobina S, Hemoglobina C, hemoglobina E.</p>
Síndrome mielodisplásico	
Causa <p>Efectos tóxicos en la médula ósea debido a toxicidad del tratamiento del cáncer, radiación o benceno.</p>	
Anemia aplásica	
Causa <p>Aplasia pura de glóbulos rojos. Anemia de Blackfan-Diamond. Causas múltiples (autoinmunes, seg secundario, idiopático).</p>	

Tabla 1 Clasificación de los trastornos por sobrecarga de hierro.(3)

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD), con consumo de alcohol <20 gr etanol/día, es otra de la manifestación patológica común de muchas enfermedades hepáticas y está asociada con características del síndrome metabólico con los siguientes problemas de salud: el sobrepeso u obesidad, la resistencia a la insulina, el azúcar alto en la sangre (hiperglucemia) o niveles altos de grasa, particularmente triglicéridos, en la sangre (4). La combinación de estos problemas favorece el depósito de grasa en el hígado.

Independientemente de la etiología, el hígado graso o **esteatosis**, se caracteriza por la presencia de vesículas que contienen grasa en el citoplasma de los hepatocitos. (5) (6) (7).

El NAFLD abarca un espectro de etapas de la enfermedad, que van desde la esteatosis simple (llamado hígado graso no alcohólico [NAFL]) a la esteatosis complicada por coexistencia de necro inflamación (esteatohepatitis no alcohólica [NASH]), fibrosis progresiva y cirrosis.

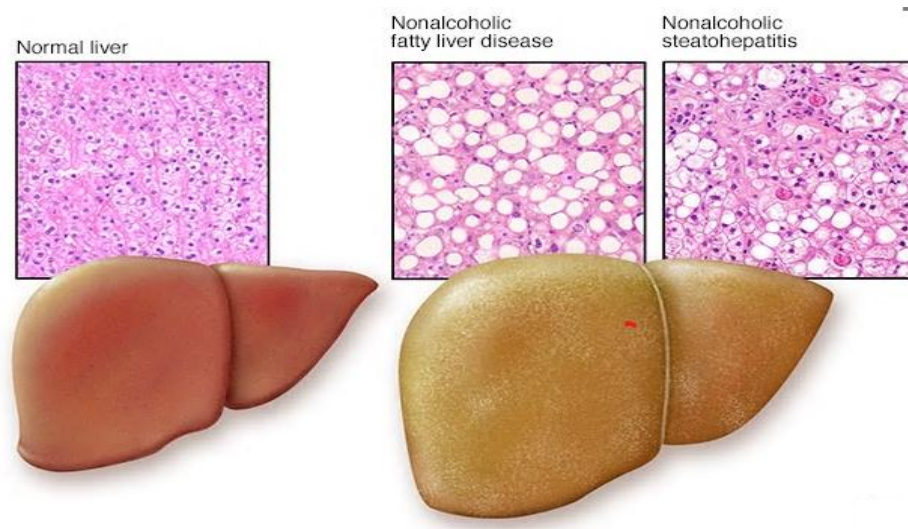


Figura 1 Evolución de la enfermedad por hígado graso no alcohólico o esteatosis (8).

Introducción

A medida que el hígado trata de detener la inflamación, produce áreas de cicatrización (fibrosis). Cuando la inflamación continúa, la fibrosis se propaga y afecta cada vez a más tejido hepático. Si el proceso no se interrumpe, la cirrosis puede provocar las siguientes enfermedades (8):

- Acumulación de líquido en el abdomen (ascitis).
- Dilatación de las venas del esófago (várices esofágicas), que pueden romperse y sangrar.
- Confusión, somnolencia y dificultad en el habla (encefalopatía hepática)
- Cáncer de hígado.
- Insuficiencia hepática terminal, lo cual significa que el hígado ha dejado de funcionar.

La coexistencia de depósito de grasa y hierro en el hígado por sobrecarga combinada, denominada **enfermedad hepática difusa** (1), es muy prevalente en enfermedades crónicas como el síndrome metabólico, la esteatosis, la hepatitis crónica y la hepatopatía alcohólica (9–11). Estas sobrecargas simultáneas son un factor de riesgo para la aceleración progresiva de la enfermedad hepática y presagia un peor pronóstico (1).

2. Cuantificación de grasa y hierro en el hígado.

La cuantificación de la concentración de hierro en el hígado (CHH) es un buen marcador del depósito de hierro en el hígado y sirve de referencia para la evaluación directa de este en el organismo. El 70 % del exceso del mismo se almacena en este órgano, de manera que existe una estrecha correlación entre dicho parámetro y la cantidad total de hierro en el cuerpo (12). En condiciones normales la CHH varía entre 10 y 36 $\mu\text{mol Fe/gr}$ (13). El índice de hierro hepático (IHH) se obtiene al dividir la CHH por la edad del paciente. Un valor de IHH $\geq 1,9$ se considera como valor de referencia (gold standard) para el diagnóstico de HH (8).

Para medir la CHH de manera clásica es necesario realizar una biopsia de hígado y realizar un análisis químico del hierro presente en un fragmento del parénquima hepático mediante espectrofotometría en cámara de grafito (14). Sin embargo, la biopsia hepática, además de ser invasiva y cruenta, tiene limitaciones diagnósticas importantes. Debido al pequeño tamaño de volumen hepático analizado, el coeficiente de variación de la CHH puede ser hasta un 19% en hígado sano y más de un 40% en hígado cirrótico (15). Por todo ello, no es razonable utilizarlo en grandes estudios poblacionales para el diagnóstico de la HH.

Para el examen histológico de la grasa del hígado se determina el grado de esteatosis por estimación visual de la proporción de hepatocitos que contienen grasa dentro y se clasifica usando una escala de severidad ordinal discreta (16), es por tanto un método semicuantitativo: menos del 5% (normal), de 6% a 33% (leve), de 34% a 66% (moderado) y superior al 66% (grave) (17), independientemente del tamaño de la vesícula. Este grado histológico por lo tanto refleja la prevalencia de hepatocitos enfermos y no mide la cantidad de grasa en sí misma.

Para dar exactitud a este método invasivo y cuantificar la grasa hepática se utiliza el **método bioquímico de Folch** o medida por

Introducción

Folch de la biopsia hepática (18). Actualmente, este método de cuantificación sigue utilizándose en diferentes ámbitos de actividad (19).

Por lo tanto, aunque la biopsia hepática ha sido el estándar de referencia histórico para la detección y cuantificación del contenido de hierro y grasa en el hígado, actualmente existen otros métodos por imagen, no invasivos, para su detección y cuantificación (Tabla 2):

Método / Descripción

Ecografía abdominal

Es la prueba inicial cuando se sospecha de enfermedad hepática. Es útil pero no imprescindible para el diagnóstico, ya que confirma el diagnóstico, pero su ausencia no lo descarta (20).

Elastografía transitoria

Este método evalúa mediante diferentes técnicas de imagen la rigidez hepática. Permite realizar estimaciones precisas del estadio de fibrosis (20).

Tomografía Computerizada (TC)

Puede permitir la detección de sobrecargas en el hígado pero todavía son necesarias validaciones adicionales antes de su utilización (21,22).

Además, esta técnica está asociada con radiación y por lo tanto, menos apropiado para el control de pacientes a largo plazo (3).

Susceptometría Biomagnética

Es una técnica extremadamente sensible que permite medir campos magnéticos de pequeñas variaciones, mediante un dispositivo de interferencia cuántica perconductor. La correlación entre el contenido de hierro en el hígado medido con bio-susceptometría magnética y comparado con la biopsia hepática ha demostrado ser excelente, y esta técnica no invasiva se considera un estándar de referencia para la cuantificación del hierro hepático (23). Sin embargo, solo un número limitado de estos dispositivos están disponibles en todo el mundo, por lo que esta técnica no está disponible para una gran mayoría de pacientes (3).

Método / Descripción**Resonancia Magnética (RM)**

Muchos trabajos publicados han demostrado la existencia de una correlación entre los valores de **CHH** y las medidas de RM. Sin embargo, el proceso para llegar a obtener valores de CHH requiere calibrar a unidades de $\mu\text{mol Fe/gr}$ las medidas obtenidas en la RM y ello supone un proceso complejo y delicado.

En RM, el grado de esteatosis está determinado por la abundancia celular de triglicéridos y cuantificada mediante la densidad de protones por fracción de grasa (PDFF), una variable continua que va desde 0% (sin grasa) a 100% (toda la grasa). Aunque esta métrica química por la RM puede diferir en principio de la métrica morfológica por examen histológico, refleja el mismo proceso fisiopatológico, y por lo tanto, **PDFF** es un biomarcador plausible de esteatosis hepática (24) (25). Sobre la base de los recientes avances teóricos y técnicos en imágenes cuantitativas de grasa, respaldadas por la validación acumulativa de datos, está surgiendo un consenso de que PDFF es un biomarcador estandarizado (26) (27).

Tabla 2 Métodos de cuantificación por imagen.

3. Cuantificación de grasa y hierro por RM.

La capacidad que ofrece esta técnica para el control longitudinal de la progresión y regresión de la enfermedad hepática y la gran disponibilidad de máquinas de RM a nivel mundial hace que sea considerada actualmente como la técnica más interesante para realizar estos estudios no invasivos de cuantificación de la CHH y de la concentración de grasa hepática debido a las grandes posibilidades de universalización de los métodos (28).

Para cuantificar la CHH en RM se utilizan dos métodos de adquisición diferentes:

1.-La "Relaxometría T2", en el que se calcula la constante de relajación T2. Es el tiempo que tiene que transcurrir para que la magnetización en el plano transversal pierda un 63% de su valor (29). Es un parámetro inherente al fenómeno de la RM y directamente afectado por la presencia de hierro. Cuando se utilizan secuencias en eco de gradiente se denomina Relaxometría T2*.

2.- Los métodos denominados "Ratio de intensidad de señal" en los que se mide la relación entre la intensidad de señal del hígado y de otra estructura anatómica en la que no se deposita el hierro, la musculatura paravertebral.

Una vez adquiridas las señales de RM con los métodos de adquisición indicados, existen diferentes métodos de posproceso, tabla 3, mediante los cuales se calcula la CHH.

Análogamente, para cuantificar la concentración de grasa hepática se utilizan técnicas multieco con método Dixon y poco ponderadas en T1, conocidas como PDFF (Proton Density Fat Fraction). Al ser secuencias multieco permiten también obviar el sesgo en el resultado de una eventual sobrecarga férrica calculando también el T2*.

Estas secuencias permiten separar la influencia del agua y de la grasa en la señal obtenida en la RM y calcular así la “Fracción grasa” (FF).

$$FF = \frac{\text{Señal}_{\text{grasa}}}{\text{Señal}_{\text{Agua}} + \text{Señal}_{\text{grasa}}}$$

Métodos para la Cuantificación de la CHH por RM		
Adquisición		Posproceso
Ratio de Intensidad de Señal	<p><i>Ventajas:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • La técnica de relación es simple y ampliamente disponible (3). • Reproducible y estandarizado (30). <p><i>Desventajas:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Asume que el tejido de referencia es normal (3). • Método no válido para medir sobrecarga férrica en el corazón (3). • Mide un amplio rango de sobrecarga férrica, pero satura para sobrecargas de hierro severas (3). 	<p>Dr Gandon, (31). Dr Ernst, (32) Osatek-Osakidetza- SEDIA, (30)(*)</p>
Relaxometría T2 y T2* Relaxometría	<p><i>Ventajas:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Buena correlación entre el hierro del hígado medido por RM y por biopsia hepática (33,34). • Mide un amplio rango de sobrecarga férrica (3). • Método confiable para la evaluación de sobrecargas en hígado y corazón (35). (T2*). <p><i>Desventajas:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Propenso a artefactos de movimiento debido al largo tiempo de adquisición (35) (T2). • Coste elevado de los métodos de posprocesado necesarios (3) (T2). 	<p>Ferriscan (*) Wood,(36)(*) Garbowski(37)(*) Hankins,(38)(*)</p>

(*) Métodos de posproceso que cuantifican la CHH en $\mu\text{mol Fe/gr}$.

Tabla 3 Métodos de adquisición y posproceso por RM para la cuantificación de la CHH.

Actualmente, la RM tiene el reto de la estandarización de los diferentes métodos y modelos comerciales y la adaptación a las diferentes intensidades de los campos magnéticos de las nuevas máquinas.

4. Cuantificación de grasa y hierro por RM con Fantomas.

Diversos estudios de investigación defienden el uso de Fantomas para facilitar la tarea de estandarización de los diferentes métodos comerciales de cuantificación de las sobrecargas de hierro y grasa en el hígado (28) (39) (40) (41,42).

Inicialmente se desarrollaron fantomas con hígado de ratón manipulado con diferentes concentraciones de hierro y grasa que ayudaron a la evaluación de la técnica diagnóstica de imagen tanto para RM como para TAC (43,44).

Los primeros fantomas no biológicos que se empezaron a construir para su utilización en RM datan de 1998, dirigiéndose principalmente hacia el diseño de materiales con diferentes texturas, concretamente con espuma reticulada, con objeto de mejorar la resolución de las imágenes obtenidas por RM (45–48).

Posteriormente, los esfuerzos se centraron en el diseño de fantomas con diferentes concentraciones de hierro en disolución acuosa, que sirvieron para la calibración de máquinas de RM a través de estudios multicentro (30,49).

Tras lo cual, se empezó a considerar que el exceso de hierro en hígado se presenta en forma de ferritina, lo que generó el diseño de fantomas en forma de hidrogeles para conseguir así la inclusión de hierro inorgánico en tamaño de micrómetros para simular la sobrecarga de hierro en el hígado (50). Mediante esta línea de trabajo se consiguió cuantificar la sobrecarga de hierro y grasa en hígado de forma separada a través del ajuste de los parámetros de las secuencias de adquisición utilizadas en la RM (51–53).

Los últimos fantomas desarrollados se centran principalmente en la construcción de fantomas mediante hidrogeles de agarosa con compuestos inorgánicos de hierro, en su forma Fe^{3+} y Fe^{2+} , y grasas vegetales, con objeto de ajustar los parámetros de las secuencias

de adquisición utilizadas en RM para determinar así la concentración de hierro teniendo en cuenta el efecto de la presencia de la grasa en la variación de las señales de RM (54–56).

Lo que tienen en común los fantasmas desarrollados hasta la fecha es que todos ellos se han dirigido principalmente al desarrollo de materiales, mediante la utilización de compuestos inorgánicos de hierro (Fe^{3+} y Fe^{2+}) y/o grasa en disolución acuosa o formando hidrogeles, para obtener con diferentes secuencias de adquisición de RM valores de las señales de RM (T1, T2, T2*, R2, R2*, FF) similares a los obtenidos para el hígado humano por RM. Lo que ha generado, por cada uno de los desarrollos, la propuesta de diferentes ajustes en los parámetros de las secuencias de adquisición utilizadas que mejoran la cuantificación de las sobrecargas de hierro o grasa.

Parece lógico pensar que el diseño y desarrollo de materiales biodegradables que simulen las estructuras del hígado con sobrecarga de hierro y/o grasa, ayudará a cuantificar la sobrecarga férrica y de grasa por RM, mediante la utilización de los métodos de adquisición y posprocesamiento ya validados, sin necesidades de ajustes.

La ingeniería de materiales se centra en el diseño y desarrollo de nuevos materiales ya existentes o innovadores para aplicaciones tradicionales, avanzadas y emergentes. En concreto, en el ámbito de la biomedicina se llevan desarrollando materiales biodegradables en innumerables aplicaciones debido a su biocompatibilidad, a su mecánica y a sus propiedades de transporte.

Por todo ello, este proyecto de investigación está dirigido al diseño y desarrollo de un material biodegradable que reproduzca la estructura de sobrecarga férrica y de grasa en el hígado humano para su cuantificación por RM.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de partida
Objetivo principal
Objetivo específico
Etapas del Proyecto

Hipótesis de partida

- I. Es posible construir un fantoma con diferentes concentraciones de hierro y grasa que reproduzca, con exactitud y precisión, el comportamiento en la RM del hígado humano con depósito de hierro y grasa.
- II. Este fantoma permitirá comparar entre sí los diferentes métodos y modelos de cuantificación de la concentración de hierro y grasa en hígado por RM con intensidad de campo magnético de 1,5 Tesla.

Para demostrar dichas hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo principal

El objetivo principal de este proyecto es el desarrollo y la validación de un fantoma que reproduzca el comportamiento del hígado humano en RM.

Objetivos específicos

1. Realizar un diseño matricial de hígado real con diferentes concentraciones de hierro, **Fantoma biológico**, que permita evaluar y establecer una correspondencia entre las combinaciones de la concentración de hierro y las variaciones en la señal de RM en máquinas de 1,5 Teslas.
2. Comprobar que diferentes **fantomas biológicos**, contruidos con las mismas cantidades de hierro, dan las mismas concentraciones de hierro medidas por RM en máquinas de 1,5 Teslas.
3. Construir un diseño matricial de un compuesto formado con diferentes concentraciones de hierro y de grasa, **Fantoma orgánico**, que permita evaluar y establecer una correspondencia entre las combinaciones de estos dos

Hipótesis y Objetivos

elementos y las variaciones en la señal de RM en máquinas de 1,5 Teslas.

4. Determinar la estructura del compuesto orgánico diseñado, **Fantoma orgánico**, para conocer cómo interacciona la red polimérica reticulada donde se acomoda el hierro, en su forma Fe^{3+} , y el triglicérido.
5. Comprobar la estabilidad en el tiempo del compuesto diseñado, **fantoma orgánico**, a través de las medidas repetitivas de las señales de RM en máquinas de 1,5 Teslas.
6. Comparar las estimaciones de las concentraciones de hierro y grasa del **fantoma orgánico**, obtenidas con diferentes métodos de RM en máquinas de 1,5 Teslas.
7. Analizar la capacidad del **fantoma orgánico** para remedar el funcionamiento del hígado respecto al contenido de hierro y grasa de los pacientes.

Etapas del Proyecto experimental

Para la consecución de los objetivos indicados el proyecto experimental se ha organizado en diferentes etapas (tabla 3):

MODELOS	ETAPAS
<p>A – FANTOMA BIOLÓGICO</p> <p>Fantoma con Hígado de Cerdo</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Diseño del soporte 2.- Selección de los componentes 3.- Preparación de las muestras 4.- Realización de la RM 5.- Análisis Estadístico
<p>B – FANTOMA ORGÁNICO</p> <p>Fantoma con compuestos orgánicos</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Diseño del soporte 2.- Selección de los componentes 3.- Preparación de las muestras 4.- Caracterización de las muestras 5.- Realización de la RM 6.- Análisis Estadístico

Tabla 4 Etapas en el diseño experimental

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del soporte
Selección de los componentes
Preparación de las muestras
Sintetización del hidrogel
Realización de la RM
Análisis Estadístico

1. Diseño del soporte

Se han diseñado dos soportes para la construcción de los fantomas, uno para el biológico (figura 3) y el otro para el orgánico (figura 5). Ambos diseños se realizaron en polimetacrilato de metilo (PMMA), metacrilato de 5 mm de espesor, por ser este un material plástico de gran durabilidad y rigidez, de fácil moldeado y mecanizado y por no presentar susceptibilidad magnética.

En el caso del **Fantoma biológico**, (figura 3), sus dimensiones se han ajustado a la bobina craneal (figura 2) de la máquina de RM (20x20x15 cm), ya que en este fantoma solo se ha medido la concentración de hierro. Las bobinas de radiofrecuencia o antena craneal tienen la función de homogeneizar el campo electromagnético generado por el imán principal de la máquina de RM (29).

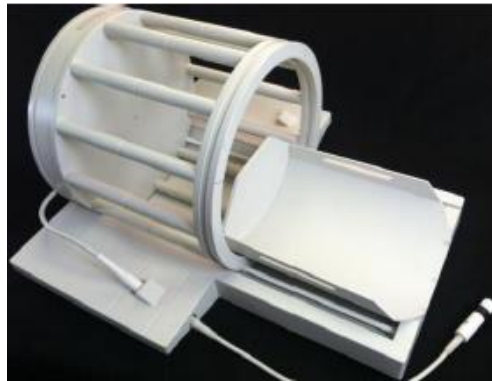


Figura 2 Bobina de cráneo y cuello. Bobina de transmisión y recepción (32).

El Fantoma biológico tiene capacidad para alojar 12 tubos de muestras distribuidos de forma radial para conseguir una homogeneidad en el campo magnético aplicado sobre el fantoma. Cada tubo está separado, uno del otro, a una distancia de 10,22 mm para evitar susceptibilidad paramagnética en la pared de los tubos. Asimismo, todos los tubos se encuentran a una distancia de 37,5 mm del fondo para corregir variaciones del campo magnético.

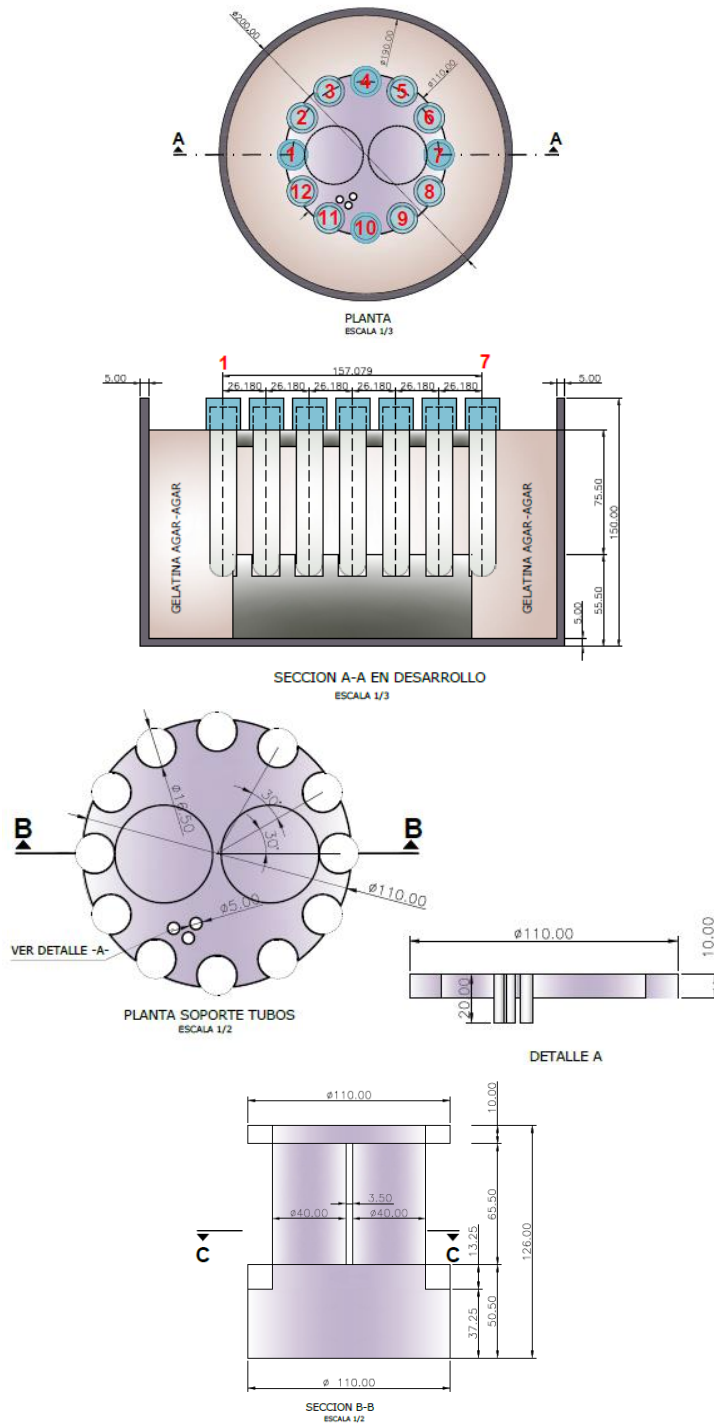


Figura 3 Geometría y dimensiones del Fantoma biológico.

En el caso del **Fantoma orgánico**, (figura 5), sus dimensiones se han ajustado a las dimensiones de los 27 tubos a albergar. En este caso, como lo que se ha medido es la concentración de grasa y hierro simultáneamente, se ha utilizado una bobina de cuerpo integrada (figura 4) para la transmisión de la señal y la recepción de la misma, logrando así una intensidad de señal homogénea en la sección de la imagen y evitando la caída de profundidad de la señal, que podría ser atribuida a la sobrecarga de hierro o a la de grasa (3).

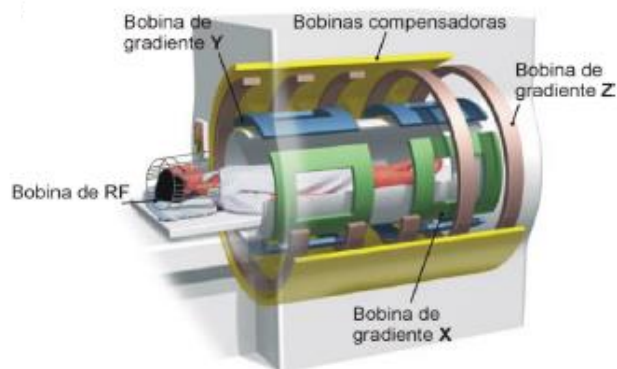


Figura 4 Bobina corporal (29).

Los tubos se distribuyen de forma equidistante, uno del otro, para conseguir así una homogeneidad en el campo magnético aplicado. Y a una distancia de 11 mm del fondo para corregir variaciones del campo magnético.

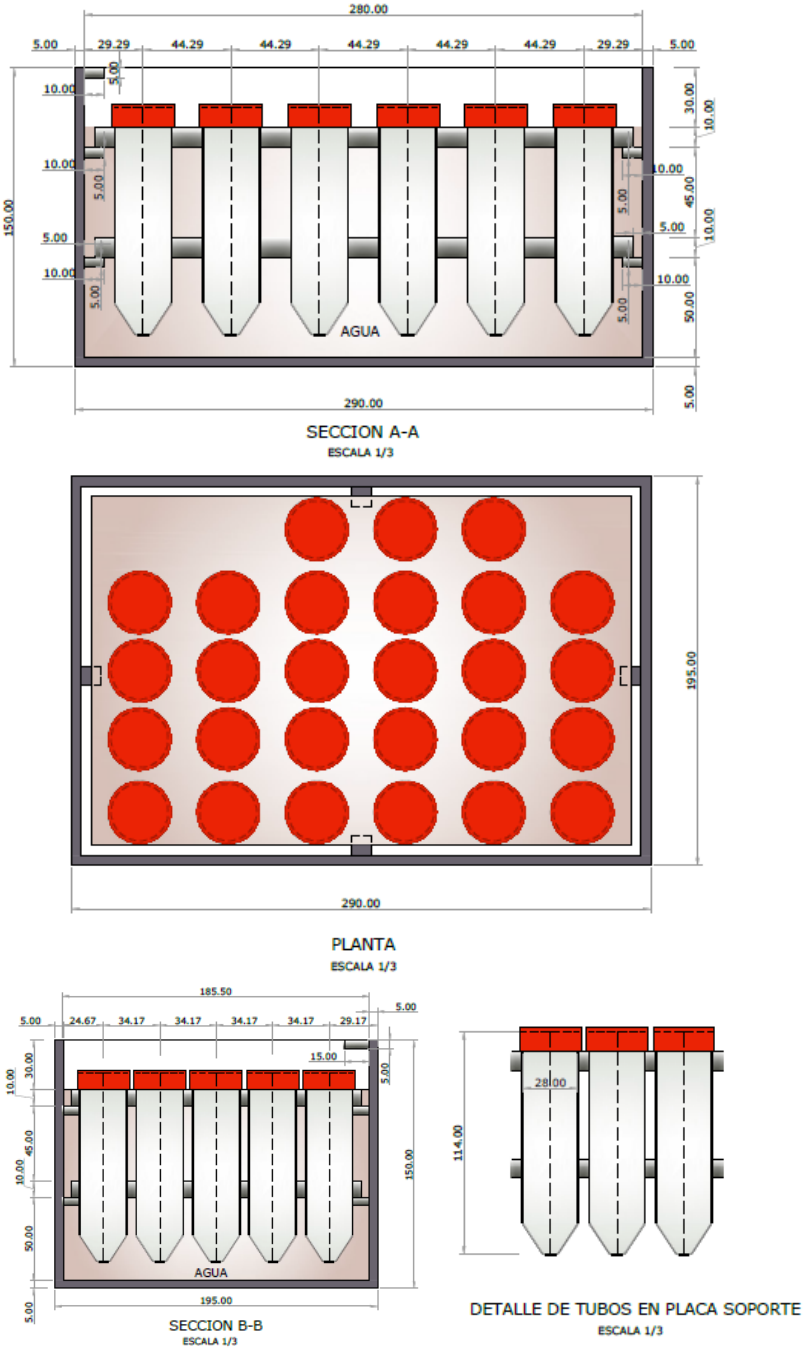


Figura 5 Geometría y dimensiones del Fantoma orgánico.

2. Selección de los componentes

Los requisitos a tener en cuenta en la selección de los componentes de las muestras dependen del objeto y aplicación específica de cada uno de los fantomas:

Fantoma biológico

Partiendo de hígado animal sano manipulado, se quiere reproducir el comportamiento en RM del hígado humano con diferentes depósitos de hierro.

Criterios considerados en la selección de los componentes:

- *Tipo de hígado*

Un análisis del genoma del cerdo, revela analogías de este con el hombre, lo que confirma el interés de este animal como modelo para la investigación biomédica (57) (58).

Teniendo esto en cuenta, para la preparación de las muestras se ha utilizado hígado de cerdo joven, aproximadamente 3 años, proveniente de la plataforma de "Animalario experimental" del Hospital Universitario Donostia (HUD)/ IIS Biodonostia.

Consideraciones éticas: se ha utilizado hígado de cerdo que ha sido previamente sacrificado por otros motivos de investigación. En cualquier caso, todos los proyectos que utilizan animales para la experimentación en el HUD/ IIS Biodonostia han sido previamente evaluados y aprobados por la comisión ética de investigación animal.

- *Tipo de hierro comercial*

La ingesta oral de hierro en una dieta normal es aproximadamente 10–20 mgr / día (3). Tras su proceso metabólico por el cuerpo humano, el hierro que no se necesita de inmediato, es almacenado en su forma férrica (Fe^{3+}) como ferritina y eventualmente como hemosiderina, si el almacenamiento de ferritina es saturado (59) (60).

Materiales y Métodos

Así mismo, y en consecuencia, la sobrecarga de hierro en el hígado se caracteriza histológicamente por acumulación celular de oxihidróxido-ferritina de hierro soluble (Fe^{3+}) en forma de (Tabla 5) (61), (62):

Acumulación Celular	Propiedades
Ferritina 1 – 2 gr en personas sanas	Proteína almacenadora de hierro. Soluble en Agua.
Hemosiderina 0 – 1 gr en personas sanas	Similar al núcleo de hierro de ferritina. Resultado de la degradación de la ferritina. No soluble en agua.

Tabla 5 Almacenamiento de hierro en el hígado.

Teniendo en cuenta lo indicado se ha seleccionado un compuesto de sacarato férrico en su forma líquida, como componente férrico a añadir al hígado de cerdo manipulado.

El hierro sacarosa se compone de un núcleo de hidróxido de hierro (Fe^{3+}) polinuclear rodeado de una gran cantidad de moléculas de sacarosa enlazadas de forma no covalente. El complejo tiene una masa molecular promedio (M) de aproximadamente 43 kDa. El núcleo de hierro polinuclear tiene una estructura similar a la del núcleo de la proteína fisiológica que almacena hierro, la ferritina. El complejo está diseñado para proporcionar, de forma controlada, hierro útil para su transporte y el almacenamiento de proteínas en el cuerpo (es decir, transferrina y ferritina, respectivamente) (63).

Fantoma orgánico

Mediante la formación de un hidrogel con diferentes depósitos de hierro y grasa, se quiere reproducir el comportamiento del hígado humano en RM.

Los hidrogeles son materiales ampliamente utilizados en innumerables aplicaciones, particularmente en el sector biomédico, debido a su biocompatibilidad, su mecánica y propiedades de transporte (64).

Los hidrogeles poliméricos son redes tridimensionales reticuladas que absorben agua debido a su hidrofiliidad. Como están reticulados, los polímeros no se disuelven y en vez de ello tienden a absorber el agua mediante un proceso de hinchamiento. Esta reticulación puede ser covalente o no-covalente, en función del tipo de enlace que mantiene el sistema unido. Generalmente, mediante entrecruzamiento covalente se obtienen geles con mejores propiedades mecánicas aunque su irreversibilidad y condiciones de reacción pueden limitar sus aplicaciones. Los hidrogeles que se obtienen mediante enlaces no-covalentes ofrecen ventajas como la reversibilidad, aunque mecánicamente no sean tan duros como los anteriores. Este tipo de entrecruzamiento físico se puede realizar mediante interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno y coordinación metálica (65) (66).

Criterios considerados en la selección de los componentes:

1. Agarosa

La agarosa es un polisacárido neutro. Ha sido utilizado en el campo de los biomateriales para hacer canales artificiales de guía del nervio tubular (67), sistemas de guía del nervio inyectables (65), dispositivos de suministro de fármacos (68), andamios para la ingeniería de cartílago (69), geles para encapsular células (islotos de Langerhans, condrocitos, etc.) (70) y dispositivos para curar heridas (70).

Utilizado en el Fantoma orgánico como elemento polimerizante para formar hidrogeles mediante uniones secundarias con bajos niveles de energía (figura 6) que le confieren mayores posibilidades de reorganizar la red polimérica y por lo tanto, con menor contribución elástica sobre la viscoelástica (64).

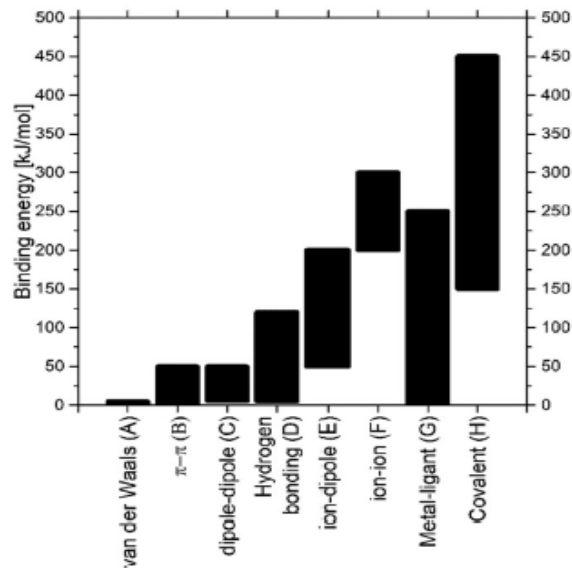


Figura 6 Energía de unión de los hidrogeles dependiendo del tipo de enlace (64).

Una relación simple pero general entre la constante elástica (E) y el grado de reticulación (M_c), o peso molecular entre dos enlaces cruzados de los hidrogeles, demuestra que cuanto mayor es el grado de reticulación (M_c) del hidrogel, menor será su módulo elástico (E). Esto se debe a la menor densidad de enlaces cruzados o, en otros términos, debido a la mayor distancia entre los enlaces cruzados (64).

Diversos estudios han cuantificado el módulo de Young (E) o módulo de elasticidad de los hidrogeles de agarosa entre 17-34 KPa, (figura 7) (64).

Estos valores bajos de módulo de Young para los hidrogeles de agarosa hacen que su comportamiento sea viscoelástico (o en el límite viscoplástico), lo que permite la reorganización de la estructura polimérica debido al mecanismo de ruptura y reforma de los enlaces cruzados formados (64).

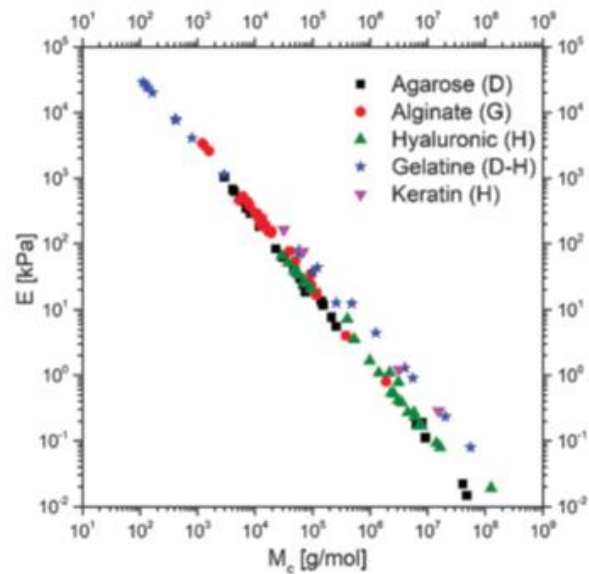


Figura 7 Módulo de Young (E) en función del peso molecular para varios hidrogeles (64).

La agarosa comercial de uso en laboratorios utilizada en este fantoma ha sido Agaroso estándar baja EEO – AG0120 (punto de fusión $88^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, Punto de gelificación $36^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$).

2. Tipo de hierro comercial:

Como en el caso del Fantoma biológico, para este Fantoma orgánico buscamos hierro en su forma férrica (Fe^{3+}) pero, en este caso, en estado sólido (granulado), para facilitar la sintetización del hidrogel. Teniendo en cuenta esto se ha seleccionado un compuesto con Ferrimanitol ovalbúmina como principio activo. Cada sobre de este compuesto contiene 300 mgr, equivalente a 40 mgr de Fe^{3+} . El resto de sustancias son: esencia de plátano, etil vainilla, lactosa, cloruro sódico y sacarosa (71).

Así mismo, la albúmina es una proteína sintetizada por el hígado que se encuentra en el torrente sanguíneo, por lo que se clasifica como una proteína plasmática. Es la principal proteína de su tipo en los seres humanos, ya que representa más de la mitad de las proteínas circulantes (72).

Materiales y Métodos

3. Tipo de grasa comercial

El constituyente principal de la grasa depositada en el hígado es el triglicérido, la molécula de almacenamiento de ácido graso (FA), que contiene 3 cadenas FA esterificadas unidas por una molécula de glicerol (5–7).

Para este desarrollo se ha utilizado manteca de oca por ser esta una grasa de origen animal que presenta espectros en RMN similares con los del sistema clínico del cuerpo humano (1).

3. Preparación de las muestras

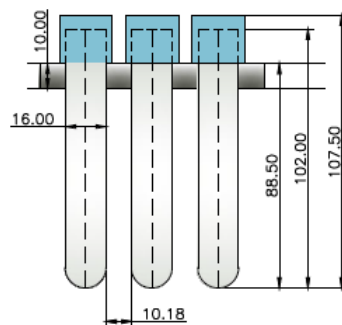
En la preparación del **Fantoma biológico**, los lóbulos hepáticos del hígado de cerdo se trituraron con un robot de cocina durante 60 segundos a 2340 rpm. Tras lo cual se le añadió, mediante una pipeta, las cantidades de Fe^{3+} que se indican en la tabla 6.

Nº Tubo	Grado de sobrecarga hepática	Fe^{3+} $\mu\text{mol/gr}$
1	Normal	0
2	<2 mgr Fe^{3+} / gr o	20
3	<36 $\mu\text{mol Fe/gr}$	40
4	Moderada	60
5	2–4,5 mgr Fe^{3+} / gr o	80
6	36 – 80 $\mu\text{mol Fe/gr}$	100
7	Alta	120
8	4,5–8,5 mgr Fe^{3+} / gr o	140
9	>80 $\mu\text{mol Fe/gr}$	1800
10	Muy alta	200
11	> 8,5 mgr Fe^{3+} / gr o	400
12	> 150 $\mu\text{mol Fe/gr}$	600

Tabla 6 Fe^{3+} ($\mu\text{mol/gr}$) añadido en Fantoma biológico.

Cada una de las 12 muestras preparadas se introduce en un tubo pyrex de cristal de 15 ml de capacidad (figura 8).

En la parte central del soporte del Fantoma biológico diseñado se colocan dos tubos más, uno con hígado sin manipular y otro con músculo paravertebral de cerdo (figura 9).



DETALLE DE TUBOS EN PLACA SOPORTE
ESCALA 1/3

Figura 8 Dimensiones y colocación de tubos en Fantoma biológico.

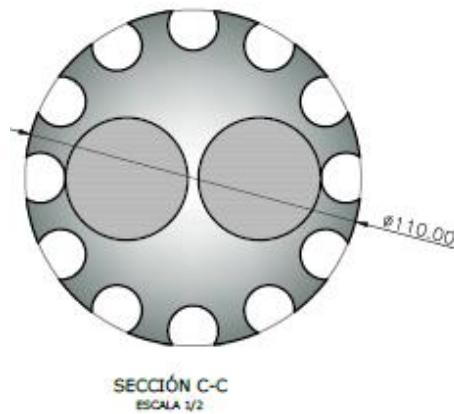


Figura 9 Dimensiones y colocación de tubos centrales en Fantoma biológico

Para el **Fantoma orgánico**, las muestras de hidrogel se han preparado en una solución de agarosa al 4%, a la cual se le añade la grasa, según los ml indicados en la tabla 7, hasta conseguir un volumen final por cada muestra de 200 ml. La disolución no soluble se mezcla, mediante un robot de cocina Moulinex, durante 5 minutos a 70°C y a una velocidad de 957 rpm, hasta conseguir una muestra homogénea.

Materiales y Métodos

Posteriormente, se añade el compuesto Ferrimanitol ovalbúmina, en su forma granulada, hasta conseguir una distribución homogénea con un equivalente en mgr de Fe³⁺ indicado en la tabla 7 por cada muestra/tubo. Todo ello se mezcla durante 8 minutos a 70°C y a 1179 rpm, mediante el robot de cocina.

En total se preparan 27 tubos/muestras de hidrogel, según se indica en la tabla 7. Cada muestra de hidrogel se introduce en un tubo de 50 ml, 114x28 mm de polipropileno y se deja enfriar en hielo hasta su total gelificación.

Nº Tubo	Agarosa (gr)	H ₂ O (ml)	Grasa (ml)	Fe ³⁺ (mgr)
A4	8	170	30	0
A3	8	180	20	0
A2	8	190	10	0
A1	8	200	0	0
B4	8	170	30	200
B3	8	180	20	200
B2	8	190	10	200
B1	8	200	0	200
C4	8	170	30	400
C3	8	180	20	400
C2	8	190	10	400
C1	8	200	0	400
D4	8	170	30	600
D3	8	180	20	600
D2	8	190	10	600
D1	8	200	0	600
E4	8	170	30	800
E3	8	180	20	800
E2	8	190	10	800
E1	8	200	0	800
F4	8	170	30	1.000
F3	8	180	20	1.000
F2	8	190	10	1.000
F1	8	200	0	1.000
G1	8	200	0	1.200
H1	8	200	0	1.500
I1	8	200	0	2.000

Tabla 7 Composición de los tubos/muestras de hidrogel.

La hemocromatosis se mide en miligramos de hierro férrico por gramo de tejido hepático en peso seco y se clasifica en una escala de 4 grados (1) (Tabla 8).

Grado de sobrecarga	Código Tubo	Añadido mgr Fe ³⁺
Normal <2 mgrFe ³⁺ / gr o <36 µmol Fe/gr	A4 – A2	0
	B4 – B1	200
Moderada 2–4,5 mgrFe ³⁺ / gr o 36 – 80 µmol Fe/gr	C4 –C1	400
	D4 –D1	600
Alta 4,5–8,5 mgrFe ³⁺ / gr o >80 µmol Fe/gr	E4 – E1	800
	F4 – F1	1.000
Muy alta > 8,5 mgrFe ³⁺ / gr o > 150 µmol Fe/gr	G1	1.200
	H1	1.500
	I1	2.000

Tabla 8 Fe³⁺ (mgr) añadido en relación al grado de sobrecarga hepática en el Fantoma orgánico.

La esteatosis se clasifica en una escala de 5 grados, variando de 0 a 4, en función del porcentaje de hepatocitos que contienen las vacuolas lapidas del hígado (1) (Tabla 9).

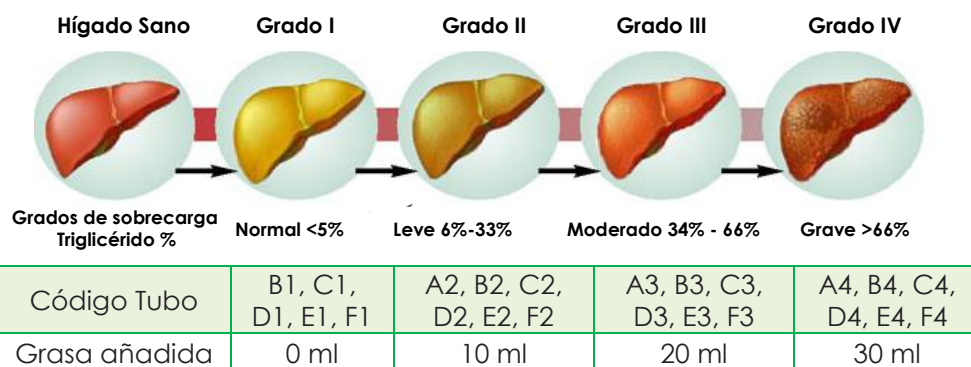


Tabla 9 Triglicérido (ml) añadido en relación al grado de sobrecarga hepática

Cuando en el hígado coexisten depósitos de grasa y hierro, por **sobrecarga combinada**, la sobrecarga de hierro en el hígado llega hasta el grado de hemocromatosis moderada, en coexistencia con alguno de los 5 grados de esteatosis. La sobrecarga combinada de hemocromatosis severa con esteatosis, aumenta la posibilidad de daño estructural hepático (1).

4. Sintetización del hidrogel

Los hidrogeles de redes interpenetradas (IPN), están constituidos por al menos dos redes de polímeros diferentes, donde una de ellas se forma en la presencia de la otra. Dentro de esta familia se encuentran los hidrogeles de redes semi-IPN, con una red polimérica tridimensional que se forma junto a un polímero o compuesto ya constituido, de manera que este último queda entrecruzado en su interior (73).

Para poder crear dos redes entrecruzadas en el fantoma orgánico partimos de un bigel formado por una red polimérica de agarosa con emulsiones de triglicérido. Esta red polimérica se entrecruza con la macro proteína ovoalbúmina con hierro, en su forma Fe^{+3} . De esta forma, se busca reproducir el comportamiento por RM del hígado y poder cuantificar las sobrecargas de grasa y hierro.

El procedimiento de sintetización seguido, figura 10, ha sido el de polimerización en disolución, modificando el carácter hidrófilo del polímero utilizado, con propiedades potenciales como hidrogel, y añadiendo los componentes necesarios, sin que se produzcan interacciones químicas entre estos componentes, con entrecruzamiento a través de interacción física (74).



Figura 10 Esquema del proceso de sintetización en el Fantoma orgánico.

Cuando la agarosa se calienta en presencia de agua, su estructura cristalina se rompe y las moléculas de agua se unen con los grupos hidroxilos de la agarosa mediante puentes de hidrogeno.

Al añadirle el triglicérido y calentar la disolución creada se facilita la mezcla del triglicérido en la red polimérica de la agarosa, quedando éstas moléculas atrapadas en el interior del hidrogel de agarosa sin interacción química. Tras lo cual se añade la macromolécula de la proteína, ferrimanitol ovoalbúmina, formada por cadenas lineales de aminoácidos con hierro. Una vez conseguido el entrecruzamiento de las dos redes por calentamiento, se procede a su enfriamiento para formar el hidrogel semi-IPN.

En el apartado 5 de resultados se presentan los ensayos de caracterización realizados a los hidrogeles formados, utilizando diferentes concentraciones de triglicérido y hierro para corroborar las interacciones físicas entre los compuestos añadidos y determinar el efecto de estas variaciones en el comportamiento del hidrogel.

5. Realización de la RM

Al **Fantoma biológico** se le han realizado RM en máquinas de 1,5 Tesla en la unidad de Osatek de Donostia. La adquisición de la señal se ha realizado mediante el método Ratio de Intensidad de Señal (RIS) en el que se ha medido la relación entre la intensidad de señal de los 13 tubos, los 12 tubos de hígado manipulado con sobrecarga férrica (tabla 6) más el tubo con hígado sin manipular situado en la parte central del fantoma biológico, y el musculo paravertebral de cerdo, colocado en el tubo central del fantoma biológico (figura 9).

En el método de adquisición Ratio de Intensidad de Señal se han utilizado dos secuencias en Eco de Gradiente, denominadas respectivamente Densidad Protónica (DP) y T2 (75). Los parámetros de adquisición utilizados en estas secuencias han sido (75):

Parámetros	/Secuencia	DP	T2
Tiempo Repetición		120 ms	120 ms
Tiempo Eco		4 ms	14 ms
Angulo de excitación		20°	20°

Tabla 10 Parámetros de adquisición en RM para medir sobrecarga de hierro.

Materiales y Métodos

Las mediciones de todos los tubos se han realizado en el mismo corte. Para el tubo con hígado sin manipular y los 12 tubos de hígado manipulado con sobrecarga férrica se tomaron 3 ROIs de aproximadamente 1 cm² a diferentes alturas del tubo. Y para el tubo con músculo paravertebral se tomaron 2 ROIs de aproximadamente 1 cm² a diferentes alturas del tubo.

El método de posproceso de las señales de RM adquiridas, para el cálculo de la concentración de hierro en $\mu\text{moles Fe/gr}$ de los tubos, ha sido el Osatek SEDIA (30).

Se han realizado mediciones de RM a 4 Fantomas biológicos inmediatamente después de su preparación.

Todas las RM se realizaron por personal de la unidad de Osatek Donostia, independientes al proyecto de investigación desarrollado.

Al **Fantoma orgánico**, se le han realizado RM en máquinas de 1,5 Tesla en la unidad de Osatek de Donostia. La adquisición de la señal se ha realizado:

- Para determinar la *concentración de hierro*, mediante el método Ratio de Intensidad de Señal se ha medido la relación entre la intensidad de señal de los 27 tubos del fantoma orgánico (figura 7) y un tubo de hidrogel formado con agarosa al 4%.

En las dos secuencias de Eco de gradiente aplicadas, denominadas respectivamente Densidad Protónica (DP) y T2 (75), se han utilizado los mismos parámetros de adquisición detallados en el fantoma biológico, tabla 10.

Las mediciones de todos los tubos del fantoma se han realizado en el mismo corte, tomándose 3 ROIs de aproximadamente 1 cm² a diferentes alturas de cada tubo. Y para el tubo con agarosa al 4% se tomaron 2 ROIs de aproximadamente 1 cm² a diferentes alturas.

- Para determinar la *concentración de grasa*, mediante la secuencia PDFF (76), los parámetros utilizados en la adquisición han sido:

Parámetros	Valores
Nº Ecos diferentes	6
Primer Tiempo de Eco	1,16 ms
Intervalo de Tiempo de Eco	0,8 ms
Tiempo de Eco final	6 ms
Tiempo de repetición	6,5 ms
Angulo de excitación	5º
Campo de visión	375/328 mm
Resolución matriz	231/129
Nº de cortes	10
Espesor	5 mm
Tiempo de adquisición	20 seg

Tabla 11 Parámetros de adquisición en RM para medir sobrecarga de grasa.

Los métodos utilizados para el posproceso de las señales de RM adquiridas, han sido:

- Para el cálculo de la concentración de hierro en $\mu\text{moles Fe/gr}$ de cada uno de los tubos del fantoma orgánico, mediante el método Osatek SEDIA (30).

Así mismo, para dar respuesta a los objetivos específicos seis y siete, se ha cálculo la concentración de hierro de los tubos A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1 y I1, tabla 7, mediante dos métodos diferentes de Relaxometría T2*: el de Wood (36) y el de Garbowski (37).

- Para el cálculo de la concentración de grasa se toma el valor de Fracción Grasa (FF) obtenido de manera automática en la máquina de RM con la secuencia PDFF previamente descrita.

Materiales y Métodos

Y para dar respuesta a los objetivos específicos seis y siete, se ha comparado la FF calculada por RM con la concentración de grasa de los tubos A1, A2, A3 y A4, tabla 7, calculada mediante el método bioquímico de Folch (18).

Se han realizado 8 mediciones de RM al mismo fantoma orgánico durante 4 años, desde 2016 hasta 2019.

En las 7 primeras mediciones se incluyeron en el fantoma orgánico 24 tubos, tubos A4 – F1 (tabla 7) y en la última medición, se incorporan al fantoma orgánico los tubos G1, H1 e I1 por contener estos tubos concentraciones severas de hierro, tabla 8.

Una vez evaluada y establecida la correspondencia entre las combinaciones del hierro y de la grasa con la variación de la señal de RM, objetivo específico número tres, se decide analizar la relación y correlación de cada una de las sobrecargas, de hierro y grasa, por separado, objetivos específicos seis y siete. Debido a lo cual se amplía el rango de concentraciones de hierro con la incorporación de los tubos G1, H1 e I1 al fantoma orgánico, que corresponden al grado de sobrecarga hepática de hierro severa, tabla 8.

Todas las RM se han realizado por personal de la unidad de Osatek Donostia, independientes al proyecto de investigación desarrollado.

6. Análisis Estadístico

Se han realizado tres análisis estadísticos con las medidas de RM realizadas al **Fantoma biológico**, para dar respuesta al *primer objetivo específico* del proyecto, recogido en el apartado de Hipótesis y Objetivos.

En primer lugar, se ha comparado el contenido medio de hierro (concentración de hierro) preparado o real con la estimación de la concentración de hierro medida por RM, para ello se ha hecho una comparación *t-Student*.

En segundo lugar, se ha analizado la relación que existe entre la concentración de hierro real de los tubos con la estimación de la concentración medida en RM utilizándose en este caso un *modelo de regresión lineal*.

Y en tercer lugar, se ha analizado estadísticamente el acuerdo o concordancia entre la concentración real y la concentración estimada por RM mediante el *método de Bland y Altman*.

Bland y Altman, es una metodología principalmente gráfica para evaluar el grado de acuerdo o concordancia entre dos mediciones. Si existe un acuerdo suficiente se puede concluir que una medición puede ser sustituida por la otra. Se presenta en un gráfico, en el eje de abscisas la medida de las dos mediciones para cada individuo y en ordenadas la diferencia entre las dos mediciones. Dos mediciones con un grado de acuerdo importante muestran gráficamente una nube de puntos de forma elíptica con un diámetro mayor horizontal, paralelo al eje de abscisas y centrado próximo al valor cero en el eje de ordenadas. El diámetro menor, vertical, tendrá una magnitud reducida. La interpretación de esta magnitud corresponde al observador conocido del campo en el que se practican las dos mediciones.

Así mismo, en el fantoma biológico, para contestar al *objetivo específico número dos* se ha comprobado la variación de la concentración de hierro medida por RM en los diferentes fantomas biológicos preparados, mediante un *modelo de regresión lineal* entre el contenido de hierro incluido en cada tubo de los cuatro fantomas biológicos, con la estimación del contenido de hierro medido por RM (RIS).

Materiales y Métodos

Para dar respuesta al *objetivo específico número tres* del proyecto, se han utilizado las mediciones de RM del **Fantoma orgánico** para realizar una *representación gráfica de la variación del contenido medido de hierro y grasa (concentración de hierro y grasa) preparado o real con la estimación de la concentración de hierro y grasa medida por RM*. Así como una descripción estadística básica, de las variaciones medidas.

Así mismo, en el fantoma orgánico, para dar respuesta al *objetivo número cinco*, se ha estudiado el efecto que tiene la variación, en el tiempo, de las concentraciones de hierro y grasa, reales o preparadas, de cada tubo, en diversos aspectos medidos por RM:

1. *Señal Media de agua (hidratación del hidrogel)*
2. *Señal T2**
3. *Concentración de Hierro Hepático (CHH)*
4. *Señal Media de grasa*
5. *Concentración de Grasa Hepática (FF)*

En cada uno de los cinco aspectos se ha analizado su variación en el tiempo mediante un *modelo de efectos mixtos (modelo lineal de efectos mixtos por máxima verosimilitud)*.

Además, en el fantoma orgánico, para dar respuesta al *objetivo específico número seis* del proyecto se ha utilizado un modelo de *correlación-regresión lineal bivalente para comprobar la relación entre las concentraciones de hierro y grasa obtenidas mediante diferentes métodos de RM*:

1. Para la comparación de las concentraciones de hierro, Osatek SEDIA (30) y los dos métodos de T2* validados por Wood (36) y Garbowski (37).

2. Para la comparación de las concentraciones de grasa, se toma el valor de Fracción Grasa (FF) obtenido por RM mediante la secuencia PDFF y el valor de medición bioquímica de triglicéridos o método Folch (18).

Por último, en el fantoma orgánico, para dar respuesta al objetivo específico número siete, se ha utilizado un modelo de *correlación-regresión lineal bivariante* entre la estimación por resonancia y la concentración real en hígado. Se muestra gráficamente el modelo para el fantoma orgánico y para los pacientes.

Los datos de RM de los pacientes con esteatosis se han obtenido de una publicación previa (77), los cuales han sido solicitados a su primer autor. En el caso de los datos de RM de los pacientes con sobrecarga férrica, han sido suministrados por OSATEK y obtenidos de un abstract todavía sin publicar. En ambos casos, los datos han sido suministrados de forma anonimizada.

Se ha establecido un nivel de significación $\alpha = 0.05$ (corresponde a $p < 0,05$). En el texto y las tablas mostramos valores de p no significativos como "n.s." y tres niveles cuando existe significación estadística: $p < 0.05$; $p < 0.01$ y $p < 0.001$. Los análisis estadísticos se han realizado utilizando el software estadístico STATA® SE v15 (StataCorp. LP, College Station Drive, Texas, EE.UU.).

En el apartado Resultados, se muestran los datos estadísticos que se consideran necesarios para comprender las tareas realizadas. Y en el anexo I se presentan los datos estadísticos obtenidos de cada uno de los estudios realizados y presentados gráficamente en el apartado de resultados.

RESULTADOS

1. Comparación del contenido medio de hierro real del Fantoma biológico con la concentración medida por RM.

Los datos utilizados en los tres análisis estadísticos que se presentan en este apartado se han realizado con los datos obtenidos por RM inmediatamente después de preparar cada uno de los cuatro fantomas biológicos elaborados o, dicho de otra forma, en el momento cero o basal de la preparación de cada uno de los cuatro fantomas biológicos desarrollados.

Debido a la rápida degradación del hígado de cerdo y a la oxidación del hierro, en la preparación de los fantomas biológicos fue determinante minimizar el tiempo transcurrido desde la preparación de los tubos hasta la realización de la RM. Esta situación obligó a preparar los fantomas con diferente número de tubos, no siempre con los 12 tubos definidos inicialmente. Los tubos ausentes lo son porque se observa una degradación no aceptable para el proceso de cuantificación mediante RM. En la tabla 12 se indica el número de tubos preparados por cada fantoma y las concentraciones de cada uno de ellos.

Concentración Tubo Fe ³⁺ μmol/gr	Fantoma 1	Fantoma 2	Fantoma 3	Fantoma 4
0	1	1	1	1
20	2	2	2	2
40	3	3	3	3
60	4	4	4	4
80	5	5	5	5
100	6	6	6	6
120	7	7	7	7
140	8	8	8	8
180		9		9
200		10		10
400		11		
600		12		
Nº Total tubos preparados	8	12	8	10

Tabla 12 Relación de tubos preparados por cada Fantoma biológico.

Resultados

En primer lugar, se ha estudiado la relación que existe entre las concentraciones de hierro añadidas en cada uno de los tubos de hígado de cerdo (Fe_True) y las concentraciones estimadas por RM (Ratio C_), en cada uno de los fantomas.

		\bar{X}	S.D.	I.C. 95%		p
Fantoma 1	Fe_True	70	48.99	13.01647	-92.38204	<0,001
	Ratio C_	151.5	54.02			
Fantoma 2	Fe_True	161.67	174.45	134.5504	-44.85832	n.s.
	Ratio C_	121.036	70.33			
Fantoma 3	Fe_True	70	48.99	8.249873	-59.58868	<0,001
	Ratio C_	122.69	52.64			
Fantoma 4	Fe_True	94	66.67	17.3476	-63.72201	<0,001
	Ratio C_	145.31	62.19			

Tabla 13 Comparación de medias mediante T-student para muestras pareadas en los Fantomas biológicos.

El estudio realizado, tabla 13, muestra que para el Fantoma 1, 3 y 4 existe una diferencia estadísticamente significativa, entre la concentración de hierro en los tubos de hígado de cerdo y la concentración media estimada por RM, con $p < 0.001$. Se comprueba así mismo que la concentración medida por RM sobreestima el valor real de concentración de hierro preparado.

En el caso del Fantoma 2 se concluye que no existe una diferencia estadística entre ambas medidas de concentración ($p = n.s.$). Comprobándose, por lo tanto, que la media de las concentraciones medidas por RM presenta valores similares con las concentraciones medias reales o preparadas.

En el segundo análisis se quiere ver la relación existente entre las concentraciones real o preparada y la medida por RM. Para ello se ha realizado un análisis de regresión lineal, en la tabla 14 se presentan los datos obtenidos.

		Constante	p	I.C. 95%	
Fantoma 1	Ratio C_	0.91	<0.001	0.68	1.15
	_cons	-68.18	<0.01	-105.41	-30.94
Fantoma 2	Ratio C_	1.75	<0.05	0.50	20.99
	_cons	-49.70	n.s.	-221.61	122.21
Fantoma 3	Ratio C_	0.921	<0.001	0.78	1.056
	_cons	-42.96	<0.001	-60.82	-25.11
Fantoma 4	Ratio C_	1.04	<0.000	0.81	1.26
	_cons	-56.57	<0.01	-91.94	-21.21

Tabla 14 Análisis de regresión lineal de las concentraciones reales y medidas por RM para los Fantomas biológicos.

Analizados los resultados del estudio estadístico realizado, tabla 14, se ve que existe en los cuatro fantomas una relación positiva entre la concentración real o añadida y la estimación por RM. Es decir, que a mayor concentración se obtiene una mayor estimación. En el caso de los fantomas 1, 3 y 4, existe una relación estadística lineal entre las cantidades de hierro medidas por RM y las preparadas o reales, pero la misma no está calibrada. Es decir, en los tres casos, de forma constante la señal de RM sobreestima la cantidad real ($p < 0.001$). En el caso del fantoma 2 pese a que existe una relación significativa es de menor grado ($p < 0.05$) que los otros tres fantomas. Así mismo, se observa gráficamente, figura 11, que parece factible establecer entre ambas concentraciones otro tipo de relación, no lineal, curva.

Resultados

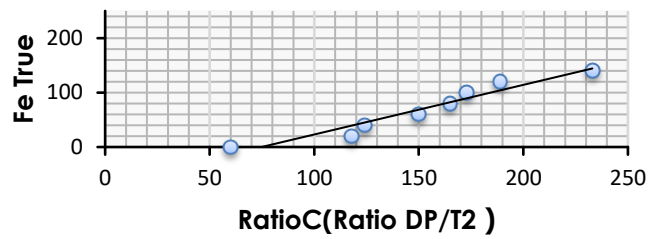
En la representación gráfica, figura 11, se evidencia la relación lineal estadística entre la cuantificación de hierro por RM y la cantidad de hierro preparada o real, mostrándose que en el caso de los fantomas 1, 3 y 4, la nube de puntos se ajusta a la línea de regresión y que en el caso del fantoma 2 no existe un ajuste de la nube de puntos.

Así mismo, en el fantoma 2 se produce una saturación de la señal de la concentración de hierro estimada por RM para valores de concentración de hierro real superiores a 200 mgr Fe^{3+}/gr .

Para cada uno de los fantomas preparados se comprueba que a concentraciones bajas de hierro preparado o real, las mediciones por RM presentan valores negativos, lo cual no es factible, por lo tanto, estos valores se consideran valores cero de concentración de hierro.

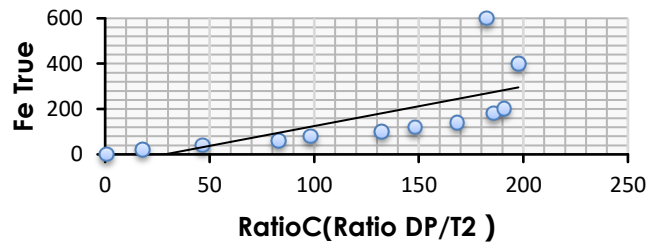
Fantoma biológico 1

$$\text{Fe_True} = -68.18 + 0.91 \text{ Ratio C} \quad r^2 = 0.93 \quad p < 0.001$$



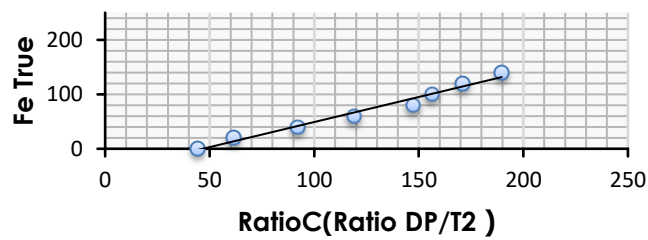
Fantoma biológico 2

$$\text{Fe_True} = -49.70 + 1.75 \text{ Ratio C} \quad r^2 = 0.44 \quad p < 0.05$$



Fantoma biológico 3

$$\text{Fe_True} = -42.96 + 0.92 \text{ Ratio C} \quad r^2 = 0.96 \quad p < 0.001$$



Fantoma biológico 4

$$\text{Fe_True} = -56.570 + 1.04 \text{ Ratio C} \quad r^2 = 0.92 \quad p < 0.001$$

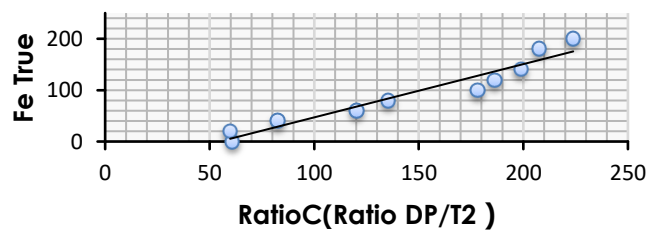


Figura 11 Relación estadística lineal entre las concentración Fe^{3+} por RM y concentración real en los Fantomas biológicos.

Resultados

Tras comprobar cómo es la relación entre la concentración estimada por RM y la concentración preparada o real, se cuantifica el acuerdo existente entre ambas concentraciones para cada fantoma.

Los gráficos de Bland – Altman, figura 12, representan para cada tubo en abscisas la media entre la concentración real o preparada y la estimación media por RM y en ordenadas su diferencia. Específicamente, el acuerdo se describe matemáticamente mediante la media de las diferencias (eje de ordenadas) y sus límites superiores e inferiores, sumando y restando 1,96 desviaciones estándar, tabla 15.

Fantoma biológico	$\bar{X} \pm 1,96SD$ [log (mgrFe ³⁺ /gr)]	Límites de acuerdo
Fantoma 1	-81.5 ± 25,5 SD	Superior = -56.0 Inferior = -107.0
Fantoma 2	40.7 ± 263,85 SD	Superior = 304.5 Inferior = -223.2
Fantoma 3	-52.6 ± 15,8 SD	Superior = -36.8 Inferior = -68.4
Fantoma 4	-51.3 ± 33,8 SD	Superior = -17.5 Inferior = -85.1

Tabla 15 Análisis de Bland-Altman por cada Fantoma biológico.

En los fantomas 1, 2 y 3 la nube de puntos no es muy diferente de la horizontal y en el fantoma 2 sí, figura 12. En cualquier caso, los límites de los fantomas 1, 2 y 3 muestran límites de acuerdos muy altos que desaconsejan su uso clínico.

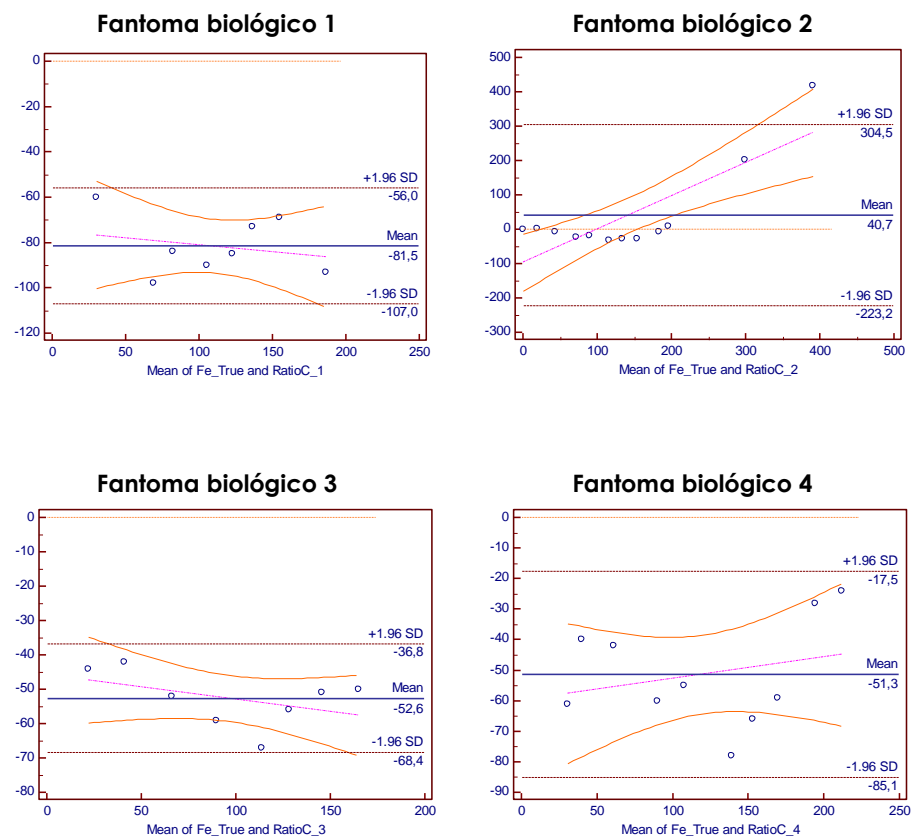


Figura 12 Grafica Bland-Altman por cada Fantoma biológico.

2. Variabilidad de la concentración de hierro estimado por RM entre los diferentes Fantomas biológicos.

Para comprobar la variabilidad de la concentración de hierro entre los cuatro fantomas biológicos preparados, se han agrupado los tubos que contenían la misma concentración de hierro preparada o real de todos los fantomas, tabla 16.

Resultados

Grupo	Concentración real Fe ³⁺ μmol/gr	Nº Tubos
T1	0	4
T2	20	4
T3	40	4
T4	60	4
T5	80	4
T6	100	4
T7	120	4
T8	140	4
Tubos totales		32

Tabla 16 Concentraciones y número de tubos por concentración real de Fe³⁺.

En primer lugar, se ha determinado si la relación estadística lineal entre los 32 tubos considerados es significativa, tabla 17, comprobándose que las concentraciones medidas por RM y las concentraciones reales o preparadas de los 32 tubos tiene una relación lineal estadística significativa ($r^2=0,80$ y $p<0.001$).

	Constante	p	I.C. 95%	
Fe_True	1.118028	$p<0.001$	0.9141116	1.321943
_cons	43.95545	$p<0.001$	26.89462	61.01627

Tabla 17 Análisis de regresión lineal de las concentraciones reales y medidas por RM para los tubos del Fantomas biológicos.

Tras lo cual, se realiza una presentación grafica mediante diagrama de cajas, figura 13, con los resultados estadísticos agrupados por tubos con la misma concentración de hierro preparada o real.

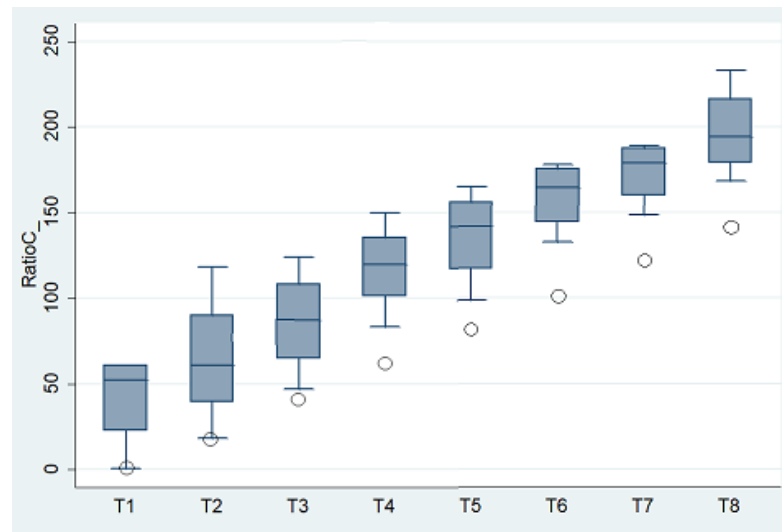


Figura 13 Diagrama de cajas de las concentraciones medidas por RM agrupadas por la misma cantidad preparada o real para los Fantomas Biológicos.

Como se observa en la figura 13 ambas concentraciones tienen una relación estadística lineal paralela, pero siempre la concentración medida por RM es superior a la concentración preparada o real. El rango de variación entre las concentraciones medidas por RM por cada una de las concentraciones es amplio, tabla 18. Así mismo, para algunas concentraciones el rango intercuartílico es amplio, quedando mostrada así la variabilidad de los datos entre ambas concentraciones.

RatioC_	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Mediana	52.10	60.70	87.29	119.61	141.41	164.70	178.61	194.26
Media	41.40	64.36	86.32	118.08	136.52	159.95	173.62	197.50
Desviación	28.23	41.04	31.83	27.38	28.25	20.62	18.65	26.88
Q1 (25%)	22.42	38.90	64.54	101.06	116.85	144.36	159.66	179.05
Q3 (75%)	60.39	89.81	108.1	135.09	156.19	175.54	187.57	215.94
Mínimo	.63	18.03	46.70	83.09	98.26	132.32	148.24	168.47
Máximo	60.77	118	124	150	165	178.07	189	233

Tabla 18 Variación de la concentración por RM por cada una de las concentraciones preparadas en los Fantomas biológicos.

3. Caracterización del hidrogel

Con objeto de estudiar la interacción que se produce al añadir ambos componentes en el hidrogel, de comprobar su estabilidad y de evaluar el sistema de sintetización utilizado, en los hidrogeles formados para el fantoma orgánico, se han realizado los siguientes ensayos:

1. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Los espectros infrarrojos de las muestras se han registrado en el espectrofotómetro Nicolet Nexus a una resolución de 4 cm^{-1} y 32 escaneos. Utilizando la técnica de la pastilla de bromuro de potasio. Las muestras han sido previamente liofilizadas durante 48 h en un Liofilizador Labconco FreeZone 4.5 Liter.

2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los barridos de calentamiento se realizaron en un calorímetro diferencial de barrido Mettler-Toledo Differential Scanning Calorimeter, DSC 822e. bajo atmosfera de N_2 , con un intervalo de temperaturas entre 25°C y 200°C y a una velocidad de calentamiento de $20^\circ\text{C}/\text{min}$. Se prepararon muestras de peso $10 \div 20\text{ mgr}$, previamente liofilizados (Labconco FreeZone 4.5 Liter), que se introdujeron en capsulas de aluminio para su sellado.

3. Microscopia electrónica de barrido (SEM), para el estudio morfológico de los hidrogeles.

Para el estudio morfológico de la sección de los hidrogeles liofilizados, las muestras se recubrieron con oro por pulverización catódica y fueron visualizadas con un microscopio electrónico de barrido HITACHI S-4800 microscope (150 s, 20 mA, 15 kV) (HITACHI, Krefeld, Germany).

4. Hidratación del hidrogel.

La hidratación es una medida de la cantidad de agua retenida en el hidrogel. El fenómeno de la captación (o liberación) de agua a través de una red de hidrogel es compleja y puede describirse principalmente por un mecanismo de difusión (64).

El grado de hidratación de un hidrogel se determina a través de la medición de la cantidad de solvente retenido en la red del polímero. El método experimental más simple y más utilizado para determinar el grado de hidratación de un hidrogel es la técnica gravimétrica. Se basa en pesar las muestras en seco e hidratado(64).

En este caso, se determina a través de la variación de la señal media de agua medida por RM en el tiempo, 8 mediciones repetitivas durante 4 años, para 24 de los tubos que forman el fantoma orgánico, A1 ÷ F4, utilizando para su análisis un modelo estadístico de efectos mixtos.

5. Determinación del pH.

Se han realizado dos mediciones del pH de los tubos de hidrogel del fantoma orgánico, una antes y otra después de la gelificación de los hidrogeles.

En la primera medición del pH se ha usado un pHmetro VWR pHenomenal MU6100L.

La segunda medición, tras la formación del hidrogel, se ha realizado mediante tiras de reactivos de Spezialindikato pH 4,0 ÷ 7,0, por contacto de los hidrogeles durante 10 minutos.

A continuación, se presentan los resultados de cada uno de los ensayos de caracterización realizados.

Resultados

3.1. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Las bandas vibratorias de FTIR se caracterizan por su frecuencia (energía), intensidad (carácter polar) y forma de la banda (entorno de enlaces)(78). Teniendo en cuenta que (78):

1. Los niveles de energía a los cuales vibra cada molécula son únicos.
2. Las vibraciones grupales tienen unas frecuencias características, que permanecen relativamente sin cambios independientemente de la molécula en la que se encuentre el grupo.
3. Existe un amplio estudio y uso empírico de las frecuencias características por grupos funcionales.

El análisis FTIR se realizó a una muestra de Ferrimanitol ovalbúmina, a otra muestra de manteca de oca y a los siguientes tubos de hidrogel, tabla 19:

Nº Tubo	Agarosa (gr)	H ₂ O (ml)	Grasa (ml)	Fe ³⁺ (mgr)
A1	8	200	0	0
I1	8	200	0	2.000
B4	8	170	30	200
E4	8	170	30	800

Tabla 19 Relación de tubos con análisis FTIR

La ovoalbúmina es una proteína globular constituida por alrededor de 585 aminoácidos con un peso molecular de unos 45000 Da (79). Proteína de referencia en bioquímica, conocida por sus propiedades como transportadora, estabilizadora y formadora de emulsiones. En el plasma sanguíneo sirve como transportador de metales, aminoácidos, esteroides, fármacos, etc. (79). En el caso del hidrogel creado, la ovoalbúmina es utilizada para albergar la ferritina en su forma F³⁺, formando el compuesto comercial Ferrimanitol ovoalbúmina. En la figura 14 se muestra el espectro FTIR obtenido.

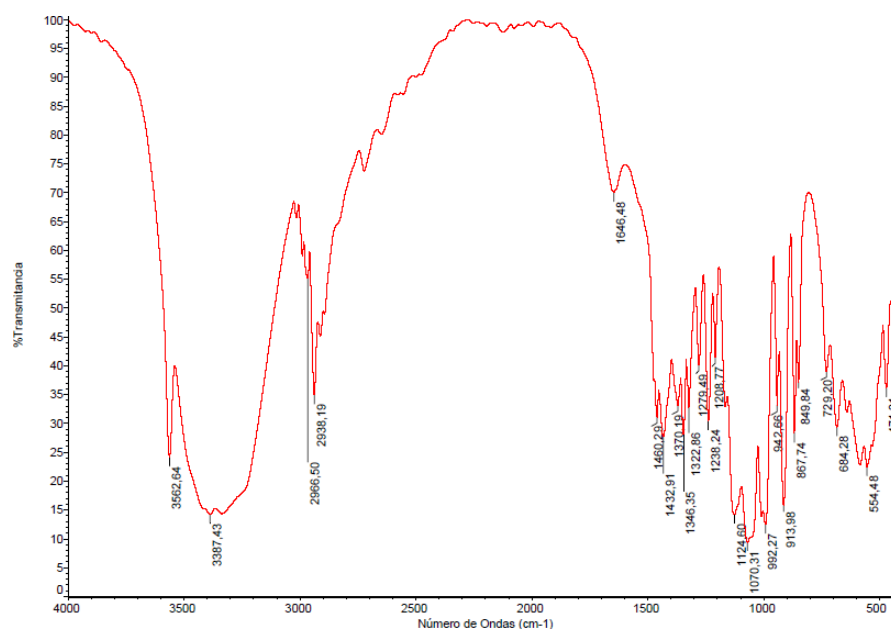


Figura 14 Espectro FTIR del compuesto Ferrimanitol Ovoalbúmina

En la tabla 20 se presentan los grupos funcionales que dan bandas de intensidad fuerte y media en el espectro del compuesto Ferrimanitol ovoalbúmina, figura 14.

Grupo Funcional	Frecuencia (cm ⁻¹) (79) (80)		Observación
	Espectro	Intervalo Empírico	
N-H	3562,64	3500-3100	Intensidad media, amidas primarias.
C=O	1646,48	1740-1630	Amida I. ~1650 NC=O. Amida libre
OH	3387,43	3400 - 2000	Señal intensa, ancha y muy estructurada. Aminoácidos.
CH	1460,29; 1432,91; 1322,86	1600 - 1360	Esqueleto anular, intensidad variable. Compuestos heteroaromáticos.
C-H	2966,50	3000 - 2840	CH ₃ -O. Intensidad variable. Alcanos.
	2938,19	2900 - 2800	CH ₂ -O. Intensidad variable. Alcanos.
C-O-C	1124,60; 1070,31; 992,27; 942,66; 913,98	1190 - 900	Compuestos heteroaromáticos. Intensidad variable.
F ³⁺	684,26; 554,48 y 471,37	700 - 400	Fe ³⁺

Tabla 20 Bandas FTIR del Ferrimanitol.

Resultados

Tradicionalmente, la cromatografía de gases se ha utilizado en la determinación de la composición de aceites y grasas comestibles (81) pero debido a que esta técnica de análisis es lenta y costosa, desde 1977 se empezó a utilizar también, para el análisis de aceites y grasas, la técnica de espectroscopia infrarroja (82). Y en concreto, la región del infrarrojos ha sido utilizada durante tiempo para el estudio de las vibraciones fundamentales de los grupos funcionales que contienen las muestras de alimentos y otros compuestos de origen biológico (83–86).

En el espectro infrarrojo de la manteca de oca, figura 15, se puede apreciar la banda de tensión del C=O a 1745 cm^{-1} característica de los triglicéridos. La muestra presenta muy poca humedad y se puede decir que se trata de una grasa poliinsaturada ya que hay una banda de tensión muy clara de los tres OH del glicerol ($1237,6$; $1164,32$ y $1116,57\text{ cm}^{-1}$).

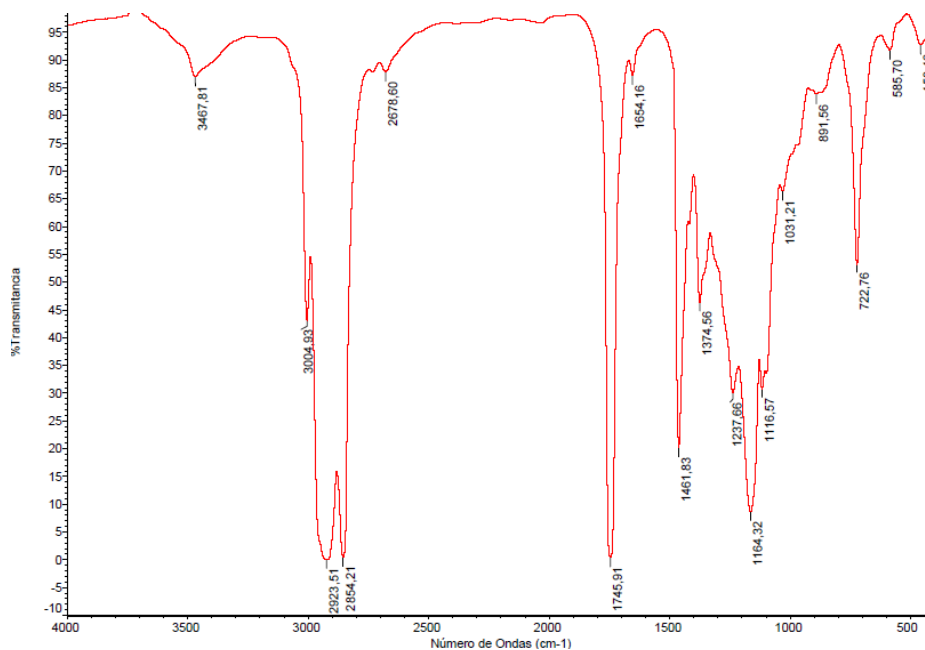


Figura 15 Espectro FTIR de la Manteca de oca.

En la tabla 21, se detallan las bandas de intensidad fuerte y media del espectro.

Grupo Funcional	Frecuencia (cm ⁻¹) (87)		Modo de vibración
	Espectro	Intervalo Empírico	
N-H	3467,81	3500-3100	Intensidad media, amidas primarias. Estiramiento.
C=O	1654,16	1740-1630	Amida I. ~1650 NC=O. Amida libre. Estiramiento.
=CH	3004,93	~ 3006	Estiramiento cis
-C=O	1745,46	~ 1746	Resonancia de éster. Triglicérido.
-CH	1461,83	~ 1465	-CH ₂ . -CH ₃ .
-C-O	1164,32	~ 1161	-CH ₂ . Estiramiento a flexión.
-CH	1374,56	~ 1377	CH ₃ . Flexión simétrica.
-C-O	1237,66	~ 1238	-CH ₂ . Estiramiento a flexión.

Tabla 21 Bandas de FTIR en la Manteca de oca.

En la figura 16, se presentan los espectros de los tubos del hidrogel A1 e I1 del Fantoma orgánico, que corresponde a un tubo con hidrogel de agarosa y a un tubo de ferrimanitol ovoalbúmina con agarosa polimerizada.

En el espectro del tubo A1 [0,0] se pueden apreciar los picos característicos del grupo funcional -OH debido al agua añadida para la gelificación de la agarosa y un pico a 1636,54 cm⁻¹ característico de la banda de tensión del C=O aromático de las amidas, pero no aparece la amida II y III, por lo que se puede decir que no es una proteína, así que corresponde al polisacárido de la agarosa.

En el espectro del tubo I1 [0, 2.000], respecto al espectro del tubo A1, se puede observar la banda de tensión del polisacárido a 1636 cm⁻¹, junto a ella aparece la banda de tensión de la proteína, ya que aparece la amida II y III. Así mismo, se muestra la presencia del

Resultados

Fe^{3+} en las bandas de 700 - 400 cm^{-1} , por haberse añadido el ferrimanitol ovoalbúmina a la agarosa.

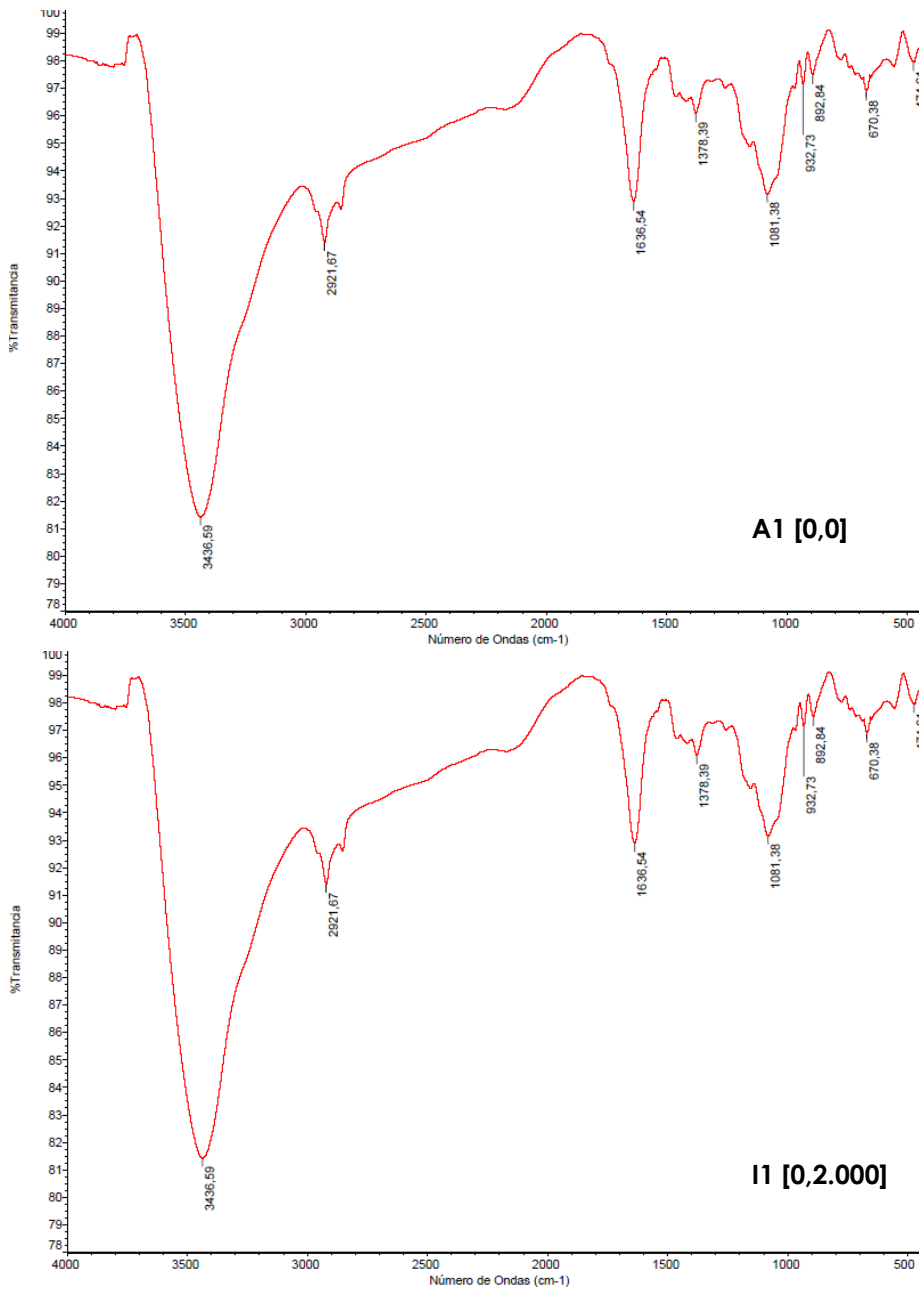


Figura 16 Espectro FTIR de los tubos A1 [0, 0] e I1 [0, 2.000].

En la figura 17, se presentan los espectros de los tubos del hidrogel B4 [30, 200] y E4 [0, 800] del Fantoma orgánico.

En los espectros de los tubos B4 [30, 200] y E4 [0, 800], respecto al espectro del tubo A1 [0, 0], figura 16, se puede comprobar que aparecen nuevas bandas de tensión del grupo funcional -C=O a 1745 cm^{-1} característico de la resonancia de éster triglicérido, también surge la banda de tensión de la amida de la ovoalbúmina a $1651,97\text{ cm}^{-1}$ y la del hierro, en su forma F^{+3} , en las bandas de $700 - 400\text{ cm}^{-1}$, al haber añadido la manteca de oca y la ovoalbúmina férrica al polímero. Mostrando una interacción física entre los compuestos.

Lo que difiere de un espectro a otro, según observamos el espectro en cascada, es la disminución de la cantidad de -OH que aparece al aumentar la cantidad de grasa añadida al hidrogel.

Si comparamos el espectro de manteca de oca, figura 15, con el espectro del tubo B4 [30, 200] y E4 [0, 800], figura 17, se comprueba que en los tres espectros aparecen las bandas de tensión del grupo funcional -C=O a $174,5\text{ cm}^{-1}$ y de la Amida I a $1654,16\text{ cm}^{-1}$ características del triglicérido añadido al hidrogel. Confirmando la hipótesis de interacción física entre los compuestos adicionados.

Así mismo, se produce un aumento de los grupos funcionales -OH que apare por la formación del polímero.

Resultados

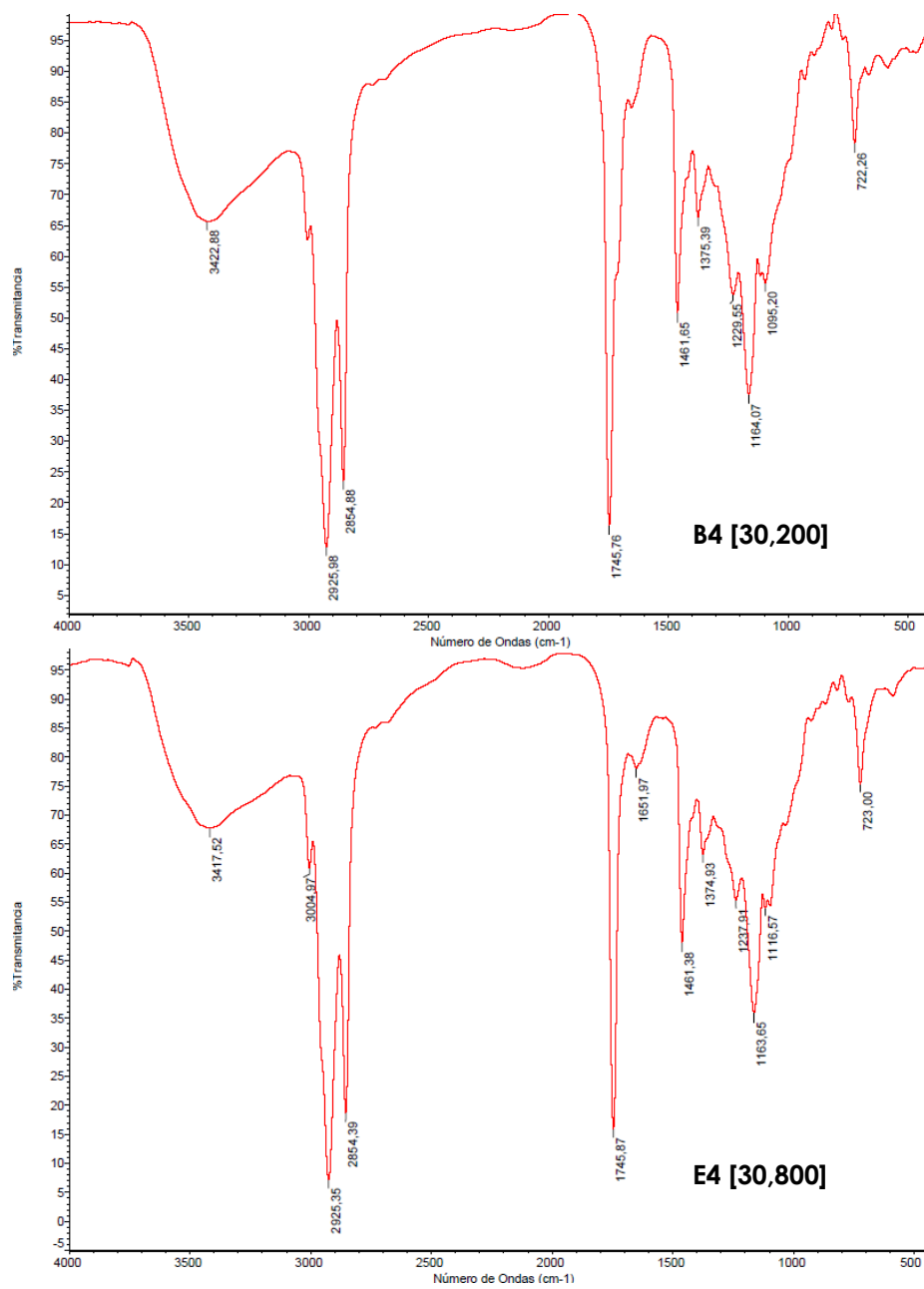
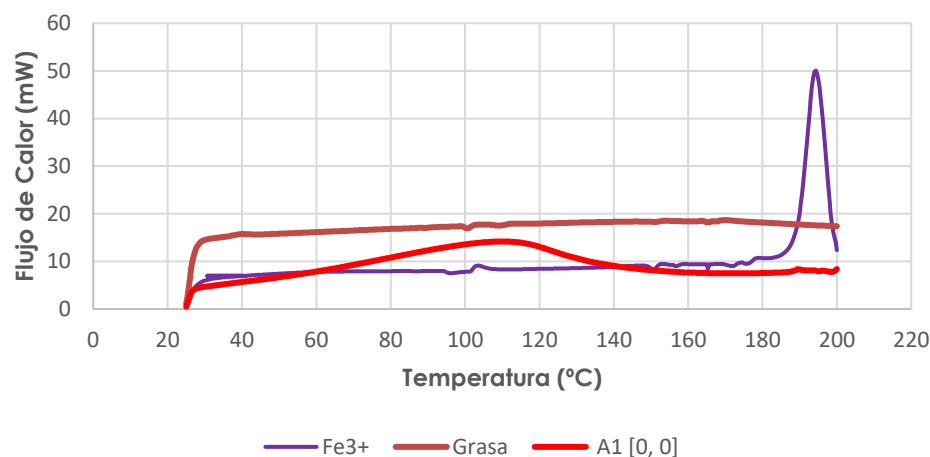


Figura 17 Espectro FTIR de los tubos B4 [30, 200] y E4 [0, 800] del Fantoma orgánico.

3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las señales de salida del DSC, el caudal de calor en función de la temperatura, se han utilizado para determinar el comportamiento del hidrogel diseñado al variar las concentraciones de sus componentes en los tubos que forman el fantoma orgánico, tabla 7.

En la figura 18, se muestran las curvas DSC de los materiales con los que se sintetiza el hidrogel diseñado.

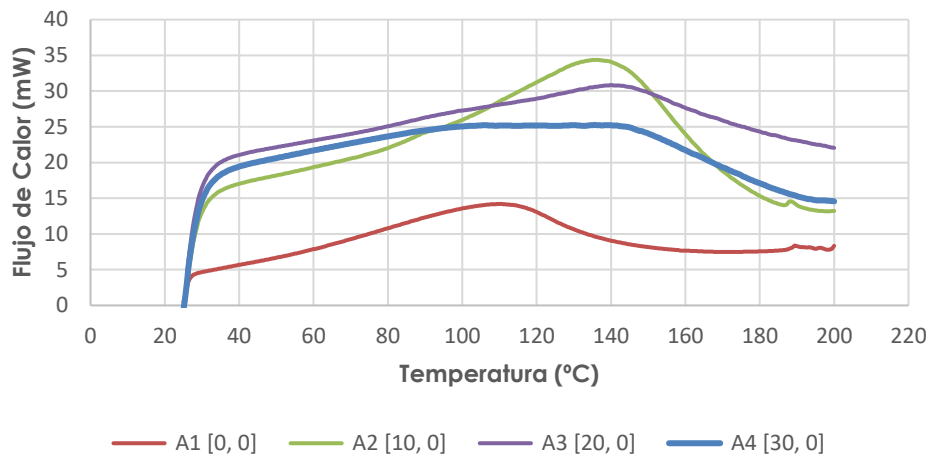


	Fe ³⁺	Grasa	A1
T _p (°C)	194,3	169,6	110
Flujo de Calor (mW)	50,06	18,66	14,19

Figura 18 Curvas DSC de los componentes del Fantoma orgánico.

En los tres materiales con los que se sintetiza el hidrogel se produce una transición al estado vítreo aproximadamente a 30°C. En el caso del ferrimanitol ovoalbúmina, compuesto férrico, una vez alcanzada la fase vítreo el compuesto muestra un pico endotérmico debido a una pérdida de masa. En el hidrogel de agarosa se produce un pico endotérmico por la liberación del agua.

Resultados



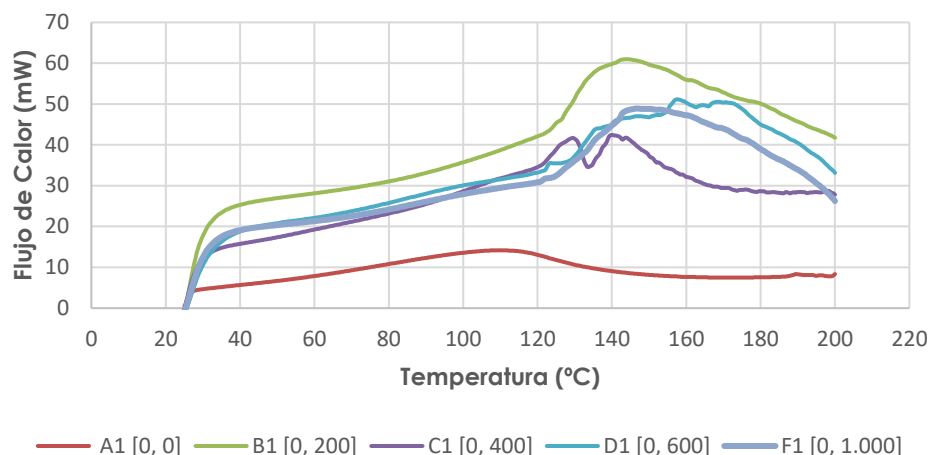
	A1	A2	A3	A4
Tp (°C)	110	135,66	140	135,33
Flujo de Calor (mW)	14,19	34,36	30,84	25,25

Figura 19 Curvas DSC de los tubos A1, A2, A3 y A4 del Fantoma orgánico.

Analizando las cinco curvas DSC, figura 19, que corresponde al hidrogel de agarosa y a los tres tubos del fantoma orgánico que no contienen hierro, se observa que la temperatura pico, de liberación de energía endotérmica, se desplaza hacia la derecha al añadirle al hidrogel el triglicérido, debido a que el agua queda retenida entre ambos componentes y necesita más energía para poder liberarse. Este comportamiento nos indica una buena interacción entre ambos componentes.

Así mismo, analizando los cinco tubos del fantoma que no contienen grasa y el tubo con hidrogel de agarosa, figura 20, se comprueba que al añadirle hierro al hidrogel se produce un aumento de la temperatura, necesario para liberar el agua que está retenida en su interior, lo que nos muestra una muy buena interacción entre la agarosa y la ovoalbúmina férrica. En la curva del tubo C1, se producen dos energías de liberación, una corresponde a la liberación del agua externa del compuesto y la

otra energía corresponde al agua que está atrapada en la red entrecruzada del hidrogel.



Nº Tubo	A1	B1	C1	D1	F1
T _p (°C)	110	144	140	157,33	146,66
Flujo de Calor (mW)	14,19	60,97	42,43	51,12	48,88

Figura 20 Curvas DSC de los tubos A1, B1, C1, D1 y F1 del Fantoma orgánico.

Por último, se analiza el comportamiento del hidrogel al añadirle grasa en las distintas concentraciones de hierro, mediante las curvas DSC, figura 21 y figura 22. Comprobándose que a medida que se introduce grasa, el hidrogel de agarosa tiene más dificultades para mantenerse hidratado y por lo tanto la interacción entre los componentes del hidrogel no es tan efectiva.

Así mismo, se observa que según aumenta la cantidad de hierro se producen temperaturas de pico endotérmicos más elevadas según se añade grasa al hidrogel, con energías de liberación inferiores, debido al efecto de histéresis y a la falta de espacio debido a impedimentos estéricos que parece tener el hidrogel para poder interaccionar a medida que le añadimos grasa.

Resultados

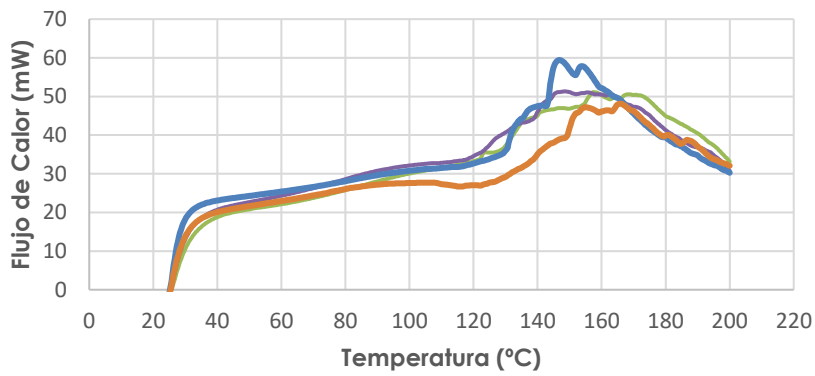
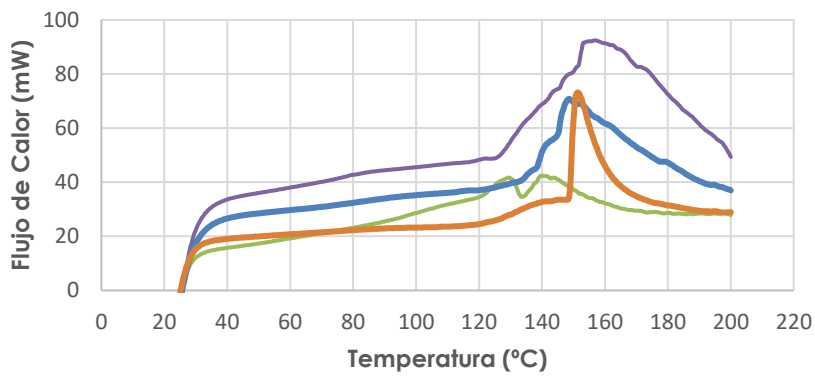
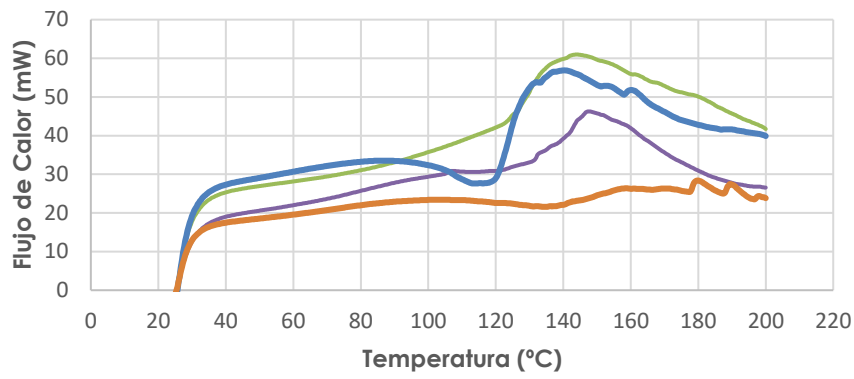


Figura 21 Curvas DSC de los tubos B1 – B4, C1 – C4 y D1 – D4 del Fantoma orgánico.

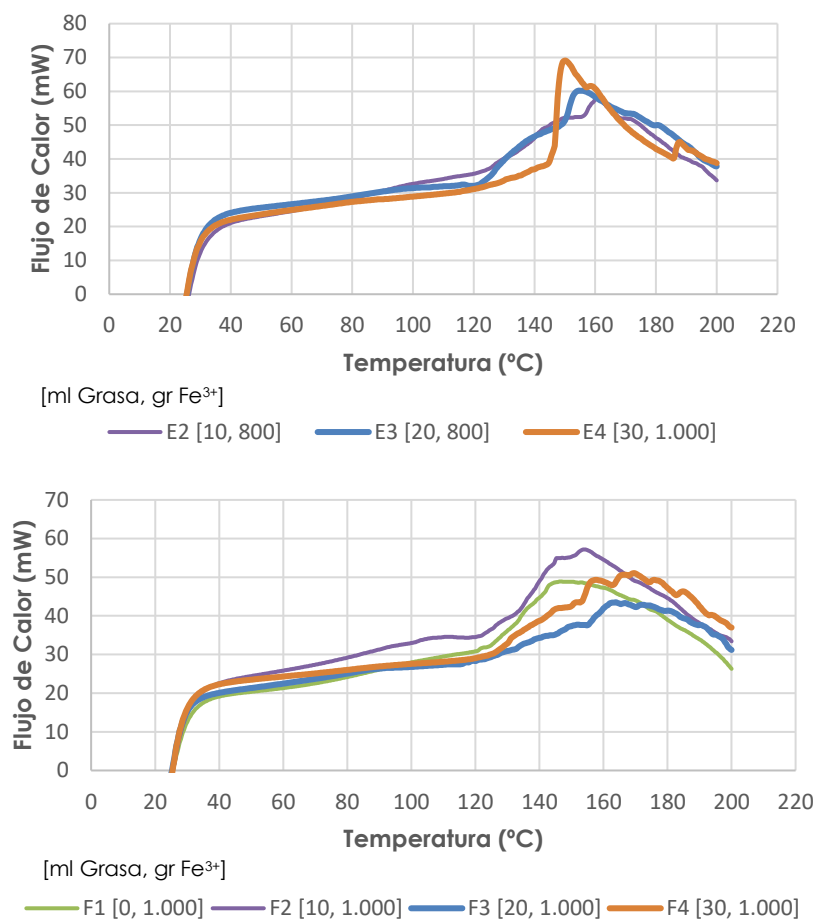


Figura 22 Curvas DSC de los tubos E2 – E4 y F1 – F4 del Fantoma orgánico.

3.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para realizar este estudio, se selecciona el tubo de hidrogel D4 [30, 600] por ser estos valores de concentración de ambos compuestos donde los ensayos previos realizados han mostrado impedimentos de espacio entre los mismos. Las imágenes SEM obtenidas se compararon con las del tubo del hidrogel D1 [0, 600], sin grasa, para poder observar el efecto que genera en el hidrogel la incorporación de la grasa por comparación con el hidrogel D4.

Resultados

Las imágenes del estudio realizado, corresponden a la sección transversal de las muestras con recubrimiento de oro en distintas magnificaciones.

Las imágenes SEM del hidrogel D1 [0,600] liofilizado se muestran en la figura 23. En la mayor parte de la superficie se observan áreas y distribución heterogénea de forma laminar, generadas por la interconexión que existe entre el hidrogel de agarosa y el compuesto férrico. Al aumentar la magnificación se observa el entrecruzamiento uniforme del hidrogel de agarosa con la ovoalbúmina y la aparición de valles de hierro anclados.

La Figura 24 muestra las imágenes SEM de la sección transversal del hidrogel D4 [30,600], observándose que la mayor parte de la superficie del hidrogel, a excepción de las emulsiones aparecidas por la adición del triglicérido, es densa, compacta y lisa debido a la formación de una capa de piel característica de los hidrogeles semi-IPN. Los hidrogeles semi-IPN tienden a formar capas de piel debido a la deshidratación en la superficie durante su formación (88).

Así mismo, en la figura 24, se observa que las emulsiones de triglicérido están rodeadas por hidrogel con un color claro que va oscureciéndose a medida que se aleja de las emulsiones, debido al encapsulamiento del triglicérido alrededor de la agarosa polimerizada. Y que este color se oscurece de forma homogénea a medida que nos alejamos de las emulsiones de triglicérido, lo que nos indica la buena interacción entre la agarosa polimerizada y la ovoalbúmina de hierro en las zonas donde no está presente el triglicérido en forma de emulsiones.

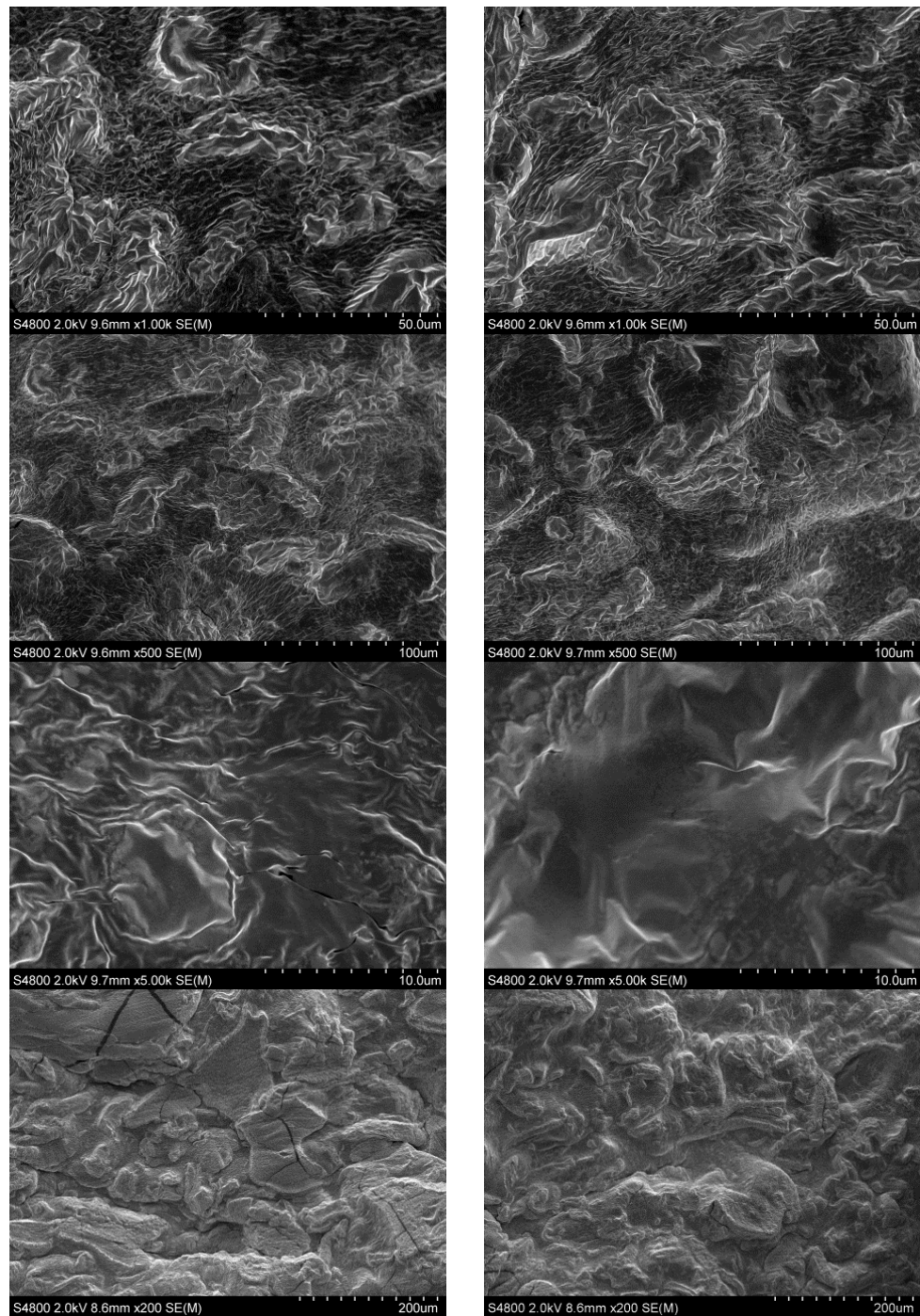


Figura 23 Imágenes SEM del hidrogel D1 [0,600].

Resultados

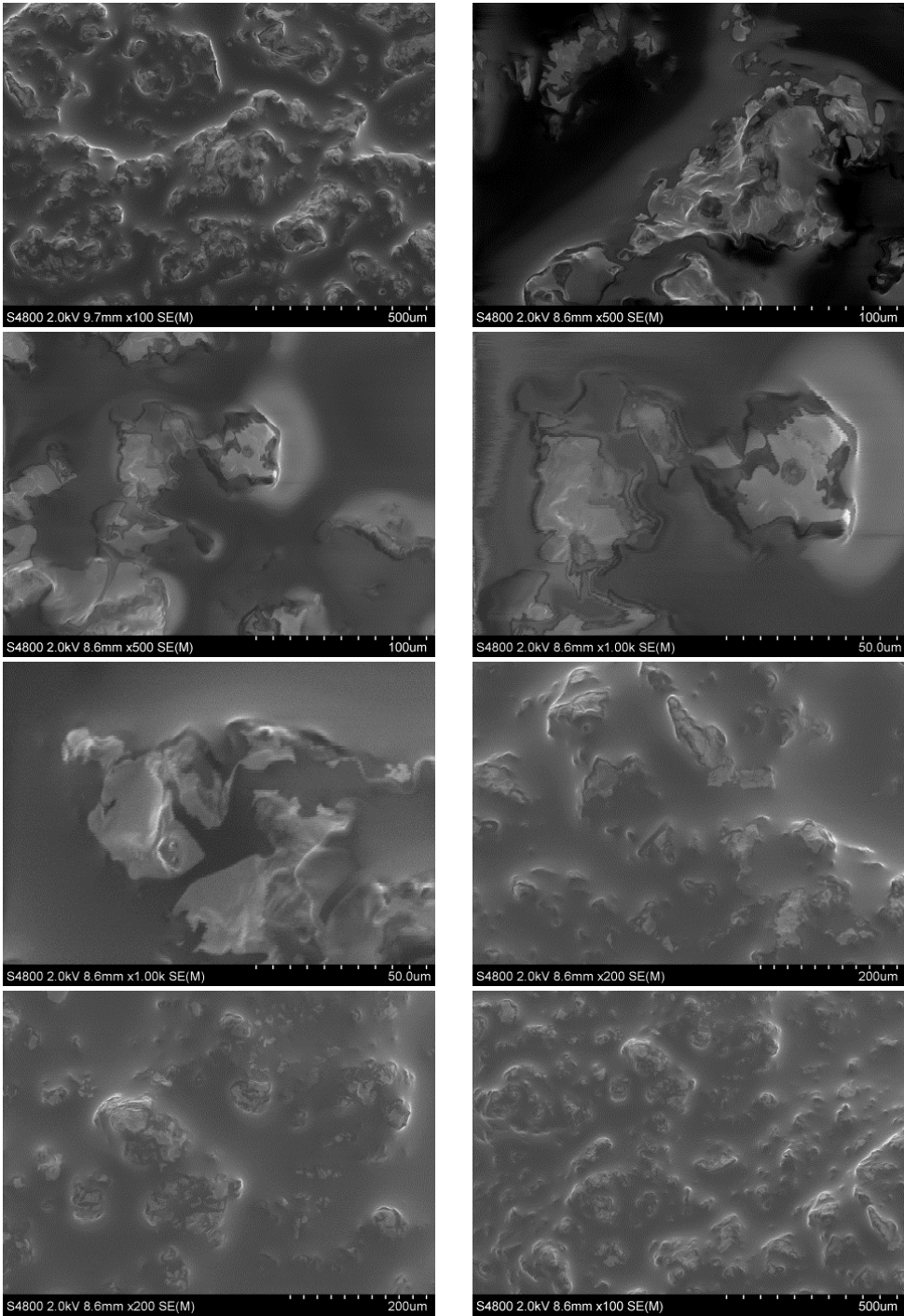


Figura 24 Imágenes SEM del hidrogel D4 [30,600].

3.4. Hidratación del hidrogel

Para realizar el análisis estadístico de las mediciones del porcentaje de agua en cada uno de los 24 tubos, durante las 8 mediciones realizadas, se han agrupado los resultados de RM de los tubos con la misma concentración de agua añadida en su preparación: 170 ml, 180 ml, 190 ml y 200 ml. Cada una de estas concentraciones de agua está formada por 6 tubos con la misma concentración de grasa y concentraciones de hierro crecientes.

Los resultados estadísticos obtenidos nos muestran, figura 25, que la media de concentración de agua, obtenidas por RM, se mantiene estable en el tiempo ($p=n.s.$). Lo que nos indica que los hidrogeles diseñados, en todas sus concentraciones, mantienen en el tiempo el agua atrapada en la red polimérica del hidrogel y que la señal media de agua medida por RM, aumenta proporcionalmente al aumentar la cantidad de agua añadida para formar el hidrogel.

Revisados los datos de la medición número 8, se comprueba que existe un error de lectura y se decide excluir dicha medición. Los nuevos resultados estadísticos obtenidos, excluyendo $time=8$, muestran una mejor estabilidad del porcentaje, medido por RM, de agua del hidrogel en el tiempo, ($p=n.s.$).

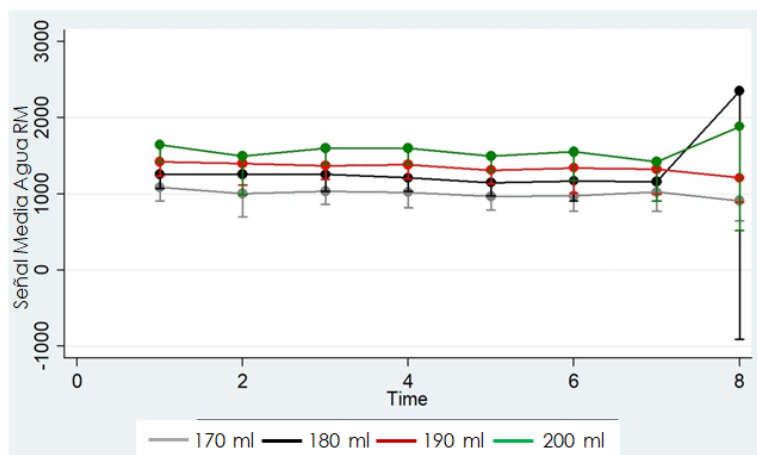


Figura 25 Variación de la media de agua por RM en el Fantoma orgánico.

Resultados

3.5. Determinación del pH

Se realizaron mediciones de pH, antes y después de la gelificación de los tubos del fantoma orgánico.

Tubo	A1 [0,0]	A3 [20,0]	B2 [10,200]	C3 [20,400]	D4 [30,600]	E2 [10,800]	F3 [20,1.000]	I1 [0,2.000]
1º pH	3,7	3,9	4	4,2	4,5	4,7	5	5,2
2º pH	4,7	4	5	5,3	5,5	5,8	6,1	6,5




Tabla 22 Variación del pH de los hidrogeles en el Fantoma orgánico

En la tabla 22, se muestra una representación de las mediciones de pH realizadas a todos los tubos del fantoma orgánico. El pH del hidrogel varía durante el hinchamiento de la red reticulada creada, a medida que le añadimos el triglicérido y el hierro, virando el pH de valores ácidos a valores alcalinos. Lo que nos indica que los hidrogeles contienen átomos de H⁺, que van convirtiéndose en -OH a medida que gelifica el hidrogel creándose redes reticuladas más densas según aumenta la concentración de hierro y grasa añadida.

Si hubiera habido reacción química entre el éster del triglicérido y e H₂O el pH no hubiera virado a valores alcalinos.

4. Comparación del contenido medio de hierro y grasa real del Fantoma orgánico con la concentración medida por RM.

De los 27 tubos que forman el Fantoma orgánico, figura 6, se prepararon inicialmente 24 tubos para comprobar la respuesta en RM del hidrogel diseñado, excluyendo del mismo los tubos G1 [0, 1.200], H1 [0,1.5000] e I1 [0,2.000] por corresponder estos a hidrogeles formados tan solo con concentraciones de hierro de nivel severo en hígado, según se indica en la tabla 8.

Para comparar las concentraciones de grasa y hierro obtenidas por RM, durante las 8 mediciones realizadas, se han agrupado los resultados de RM de los tubos con la misma concentración de Fe^{3+} añadida en su preparación: 200 mgr, 400 mgr, 600 mgr, 800 mgr, 1.000 mgr y tubos sin hierro. Cada una de estas concentraciones de Fe^{3+} está formada por 4 tubos con diferentes concentraciones de grasa que varía de 30 % a 0% de grasa.

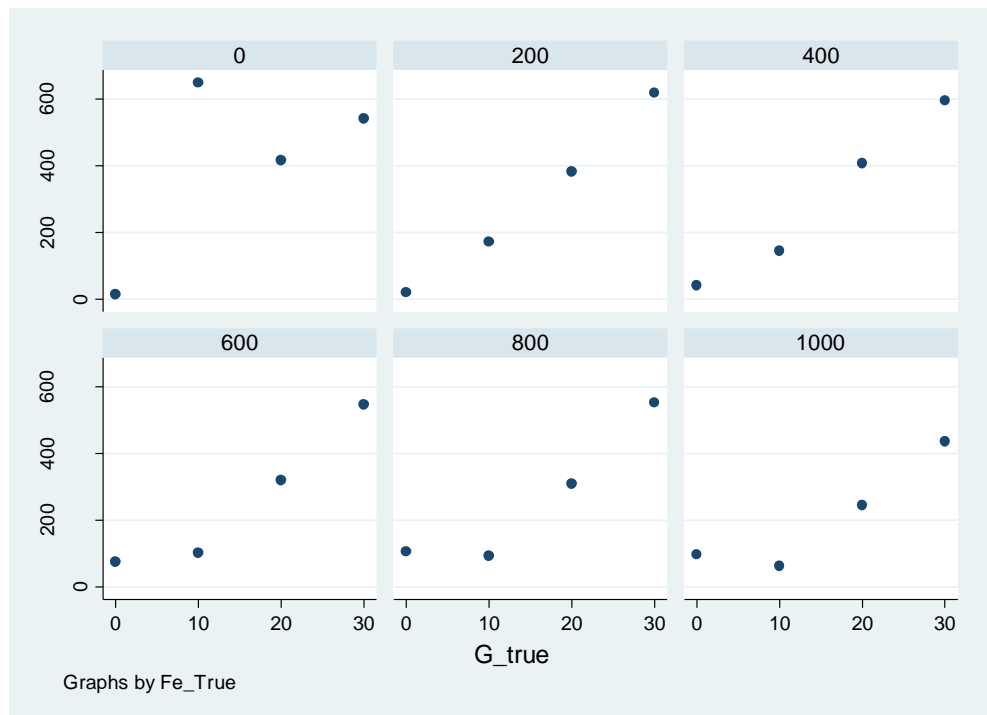


Figura 26 Comparación de la media de grasa medida por RM al variar la concentración de Fe^{3+} .

En la representación gráfica, figura 26, de la señal media de grasa obtenida por RM en función de la cantidad de grasa real o preparada por cada una de las concentraciones de Fe^{3+} , se observa una relación proporcional y lineal entre las concentraciones de grasa medida por RM y real o preparada, para valores bajos de concentración de hierro añadida al hidrogel. A medida que añadimos hierro, la concentración de grasa medida por RM subestima la concentración de grasa real o preparada.

Resultados

Para los tubos con concentración A2 [10,0] se observa un outlier debido a errores de lectura.

Del análisis de la descripción estadística básica, tabla 23, se comprueba que para las concentraciones de grasa real o preparada del 10% se produce una desviación de la diferencia de concentraciones significativa en los tubos con concentración de grasa real del 10%. El outlier de los tubos A2 [10,0] es tan extrema que afecta a la desviación global de todos los tubos con 10% de grasa.

MediaGrasa_1	G_true= 0	G_true= 10	G_true= 20	G_true= 30
Mediana	58.75	123.5	351	550
Media	59.75	204.25	346.5	548.58
Desviación	38.97	221.34	66.91	63.28
Q1 (25%)	21.5	93.5	309	541.5
Q3 (75%)	97.5	173	407.5	595.5
Mínimo	15.5	63	244.5	435.5
Máximo	106.5	649	416	619

Tabla 23 Descripción estadística de la variación de la concentración de grasa medida por RM para el Fantoma orgánico.

Así mismo, en la tabla 23, se observa que la única dispersión de concentraciones aceptable para su uso clínico son las de los tubos sin grasa o grasa cero.

5. Variación de las señales por RM en el Fantoma orgánico.

En las figuras 27 – 30, se presentan los resultados del análisis estadístico realizado a cada una de las señales medidas en RM.

Para cada una de las señales de RM analizadas se presentan los datos agrupados por la concentración del componente que mide cada una de las señales. Para la señal T2* y señal CHH se agrupan los resultados de los tubos con la misma concentración de Fe³⁺: 200 mgr, 400 mgr, 600 mgr, 800 mgr, 1.000 mgr y los tubos sin hierro.

Cada una de estas concentraciones de hierro está formada por 4 tubos con concentraciones de grasa crecientes.

Para la señal media de grasa y la señal de FF se agrupan los resultados de los tubos con la misma concentración de grasa: 10%, 20%, 30% y los tubos sin grasa. Cada una de estas concentraciones de grasa está formada por 6 tubos con concentraciones de hierro crecientes.

5.1. Señal Media de agua

Los resultados de la variación de esta señal medida por RM se presentan en el punto 3.4 de este apartado, ya que como se ha indicado en el mismo los resultados obtenidos han sido utilizados para valorar el grado de hidratación del hidrogel creado.

5.2. Señal T2*

Los resultados del análisis de efectos mixtos por máxima verosimilitud realizado a la señal de T2* en los 24 tubos en las 8 mediciones muestran que el tiempo no influye en la medición ($p=n.s.$). Es decir, que las muestras son estables en el tiempo.

Como se puede observar en la figura 27, la señal T2* se mantiene estable en las 8 mediciones realizadas, salvo en la octava medición. Analizados los datos de la última medición, $time=8$, se detectan errores de lectura, debido a lo cual se decide desestimar esta medición. Realizándose nuevamente el análisis estadístico sin incluir la última medición, $time<8$, se obtiene una similitud no significativa ($p=n.s.$).

Resultados

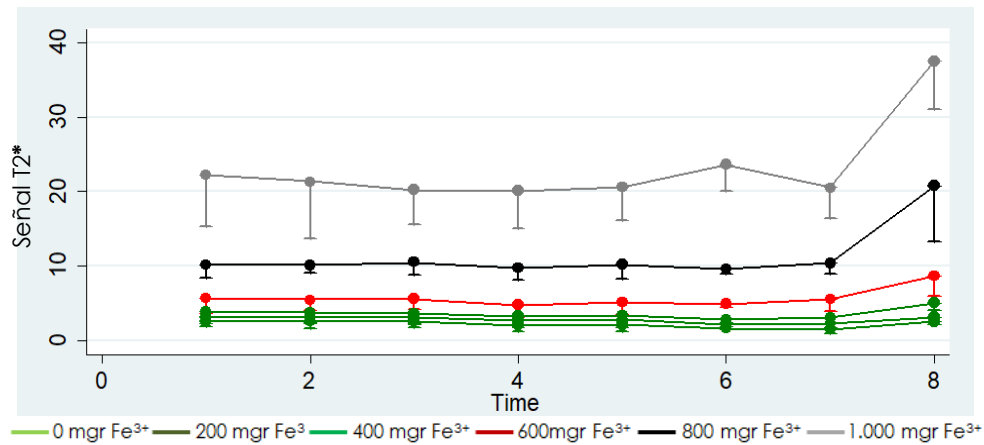


Figura 27 Variación de la señal T2* por RM en el Fantoma orgánico.

5.3. Concentración de Hierro Hepático (CHH)

Los resultados del análisis de efectos mixtos por máxima verosimilitud realizado a la señal de CHH en los 24 tubos en las 8 mediciones muestran que el tiempo no influye en la medición ($p=n.s.$). Es decir, que las muestras son estables en el tiempo.

Como se puede observar en la figura 28, la señal CHH se mantiene estable en las 8 mediciones realizadas, salvo en la séptima medición de los tubos sin concentración de Fe³⁺, considerándose este un error de lectura.

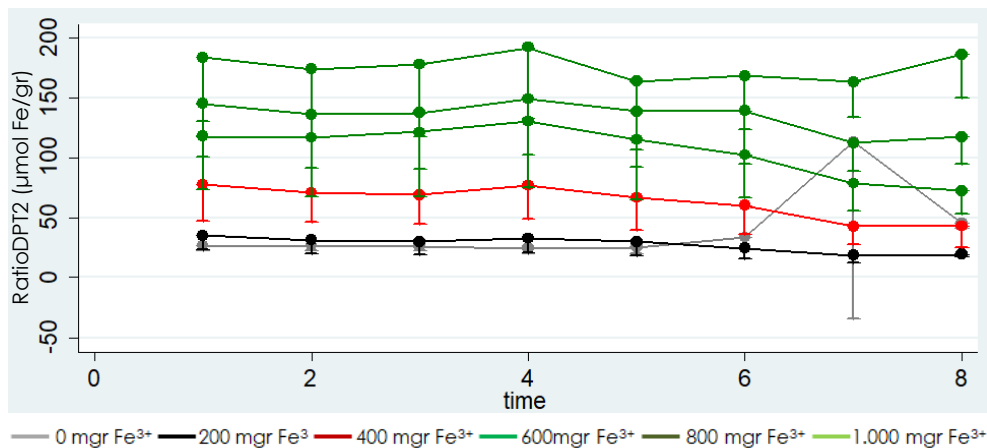


Figura 28 Variación de la señal de CHH por RM en el Fantoma orgánico

5.4. Señal Media de grasa

Los resultados del análisis de efectos mixtos por máxima verosimilitud realizado a la señal de media de grasa en los 24 tubos en las 8 mediciones muestran un cambio temporal de la medición ($p < 0.05$). Es decir, el tiempo influye en la medición.

Como se puede observar en la figura 29, la señal media de grasa se mantiene estable entre las mediciones segunda y séptima. Debido a lo cual se realizan dos nuevos análisis estadísticos, en el primero sin incluir la primera medición, $time > 1$, y en el segundo sin incluir la octava medición, $time < 7$. En la primera medición que incluye desde la segunda a la octava medición, $time > 1$, se obtiene una estabilidad de la señal en el tiempo no significativa ($p = n.s.$), y en el segundo análisis, $time < 7$, se obtiene una estabilidad significativa ($p < 0.05$).

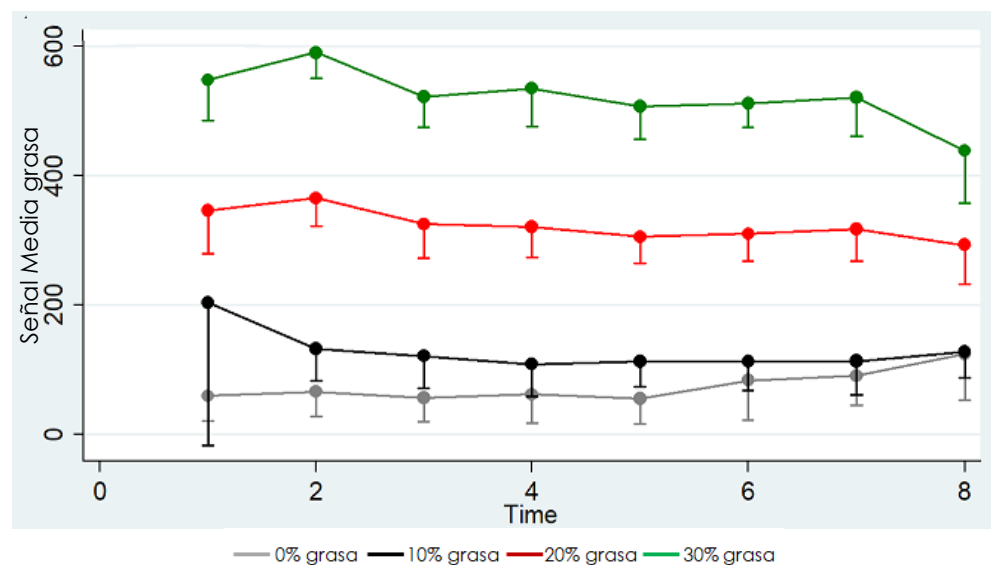


Figura 29 Variación de la señal de Media de Grasa por RM en el Fantoma orgánico

Resultados

5.5. Concentración de Grasa Hepática (FF)

Los resultados del análisis de efectos mixtos por máxima verosimilitud realizado a la señal FF en los 24 tubos en las 8 mediciones muestran que las mediciones no varían en el tiempo ($p < n.s.$).

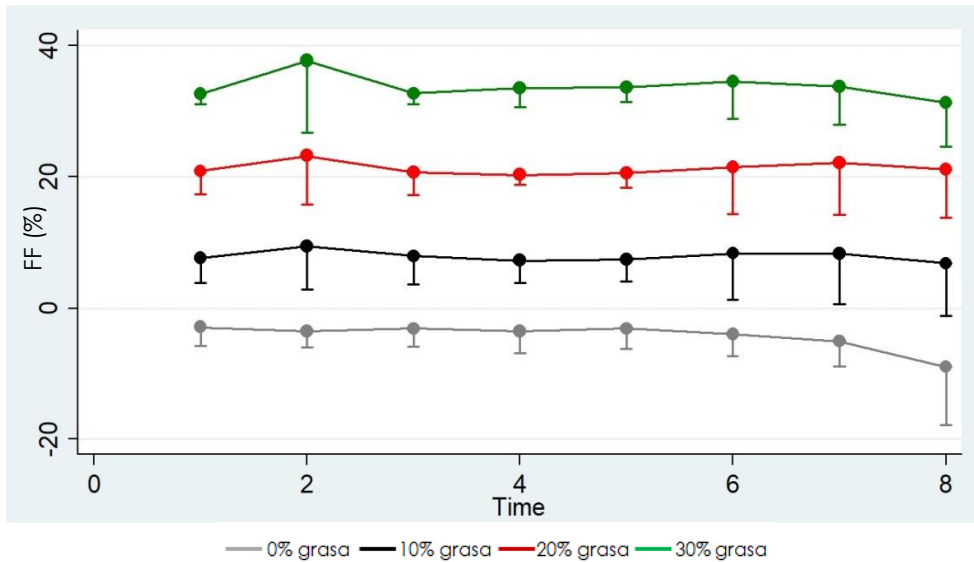


Figura 30 Variación de la señal FF por RM en el Fantoma orgánico

6. Correlación de la concentración de hierro y grasa, del fantoma orgánico, por diferentes métodos de RM.

Para analizar la **correlación de la concentración de hierro** de los 8 tubos que únicamente tienen concentración de hierro, tabla 7, se comparan los datos obtenidos por el método de RIS de Osatek SEDIA (30), utilizado en todas las RM realizadas al fantoma orgánico, con los métodos de Relaxometría T2* de Wood (36) y de Garbowski (37), figura 31 y 32 respectivamente.

La correlación positiva obtenida entre ambos métodos da lugar a la siguiente ecuación que predice la concentración de hierro por el método Osatek SEDIA a partir del método Wood, figura 31.

$$[\text{Fe}] \text{ OSATEK} = -22.8 + 0.86 [\text{Fe}] \text{ Wood} \quad r^2 = 0.99$$

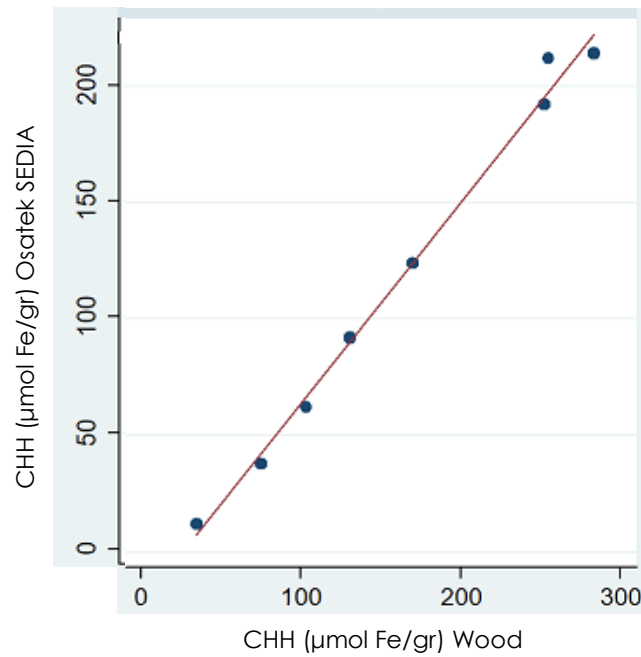


Figura 31 Correlación CHH por RM mediante Osatek SEDIA y Wood en el Fantoma orgánico.

Resultados

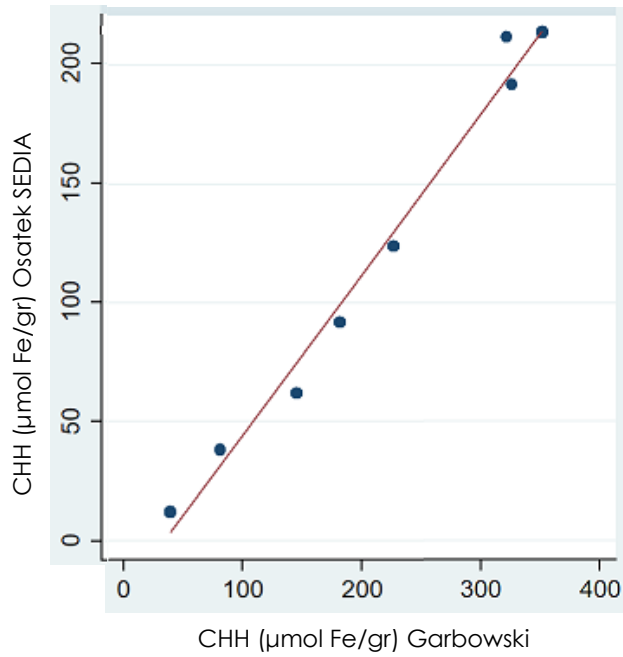


Figura 32 Correlación CHH por RM mediante Osatek SEDIA y Garbowki para el Fantoma orgánico.

La correlación positiva obtenida entre ambos métodos da lugar a la siguiente ecuación que predice la concentración de hierro por el método Osatek SEDIA a partir del método Garbowski, figura 32.

$$[\text{Fe}] \text{ OSATEK} = -23.1 + 0.68 [\text{Fe}] \text{ Garbowski} \quad r^2 = 0.98$$

Para analizar la **correlación de la concentración de grasa** de los 4 tubos del fantoma orgánico que no tienen concentración de hierro, tabla 7, se toma el valor de Fracción Grasa (FF) obtenido de manera automática en la máquina de RM con la secuencia PDFF y se compara con el valor de medición bioquímica de triglicéridos o método Folch (18) de cada tubo, figura 33.

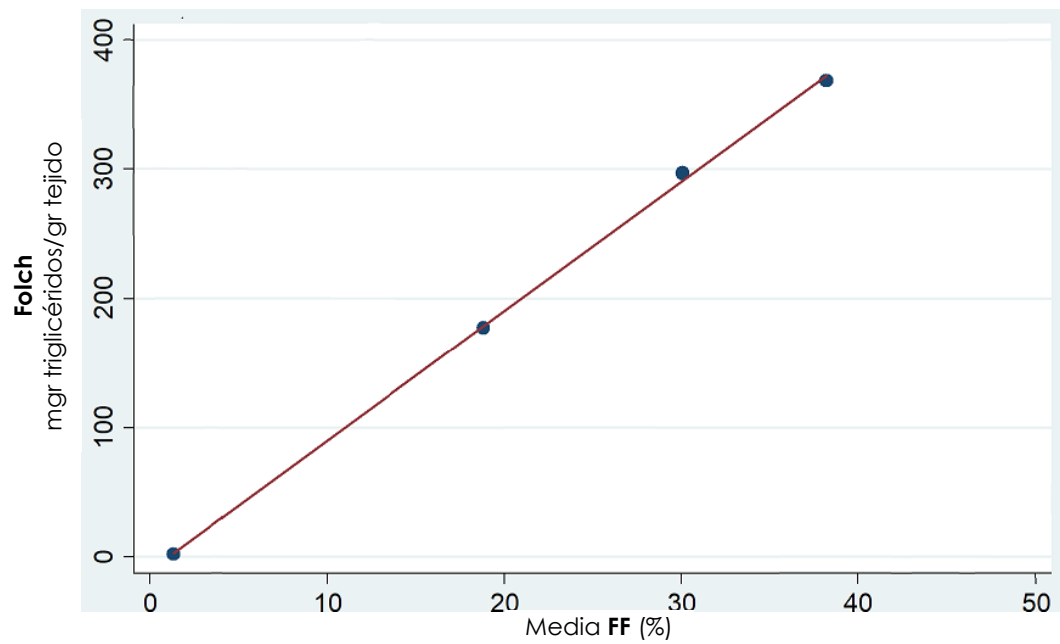


Figura 33 Correlación FF por RM (PDDF) y método de Folch en el Fantoma orgánico.

La correlación positiva obtenida entre ambos métodos da lugar a la siguiente ecuación que predice la concentración de grasa obtenida por RM con la secuencia PDDF a partir del método Folch, figura 33.

$$[FF] \text{ Folch} = -210,36 + 10,02 [FF] \text{ PDDF} \quad r^2 = 0,99$$

7. Correlación de la concentración de hierro y grasa por RM medida en el Fantoma orgánico y en pacientes, por diferentes métodos de RM.

Los valores de concentración de hierro medidos en los 8 tubos que no contienen grasa, tabla 7, se han comparado con los 41 pacientes con diferentes niveles de sobrecarga férrica hepática en los que también se ha cuantificado la CHH con los mismos dos métodos de RM.

En la figura 34, se muestra la correlación positiva obtenida para los pacientes y para los tubos mediante el método Osatek SEDIA y Wood. La correlación entre ambos métodos con los pacientes ha sido $r^2 = 0.90$ y con los tubos $r^2 = 0.99$.

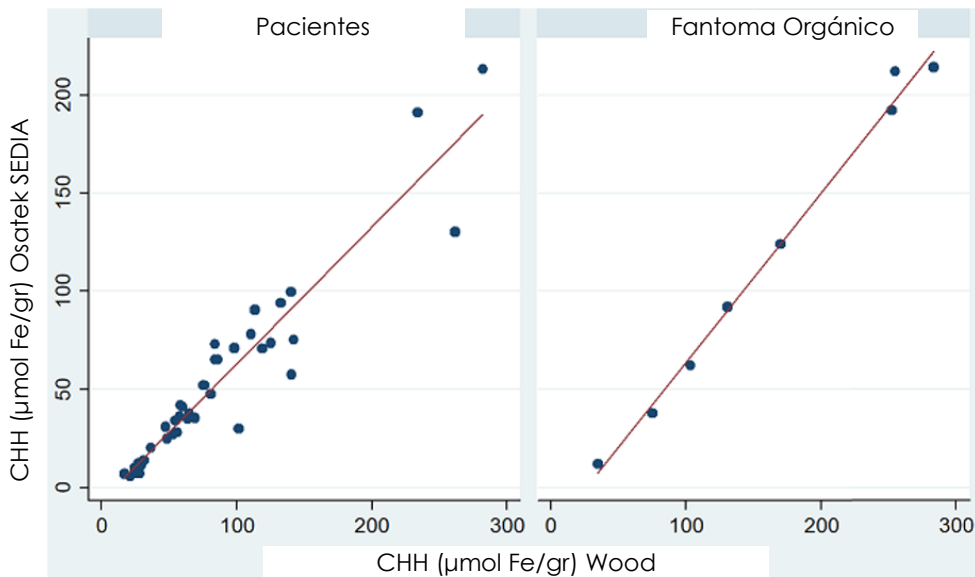


Figura 34 Correlación CHH por RM mediante Osatek SEDIA y Wood para los pacientes y para el Fantoma orgánico.

La correlación positiva obtenida entre ambos métodos para los pacientes, figura 34, da lugar a la siguiente ecuación que predice la concentración de hierro por el método Osatek SEDIA a partir del método Wood.

$$[\text{Fe}] \text{ OSATEK} = -6.4 + 0.70 [\text{Fe}] \text{ Wood} \quad r^2 = 0.90$$

En la figura 35, se muestra la correlación positiva obtenida para los pacientes y para los tubos mediante el método Osatek SEDIA y Garbowski. La correlación entre ambos métodos con los pacientes ha sido $r^2 = 0.89$ y con los tubos $r^2 = 0.98$.

La correlación positiva obtenida entre ambos métodos para los pacientes, figura 35, da lugar a la siguiente ecuación que predice la concentración de hierro por el método Osatek SEDIA a partir del método Garbowski.

$$[\text{Fe}] \text{ OSATEK} = -14,4 + 0.70 [\text{Fe}] \text{ Garbowski} \quad r^2 = 0.89$$

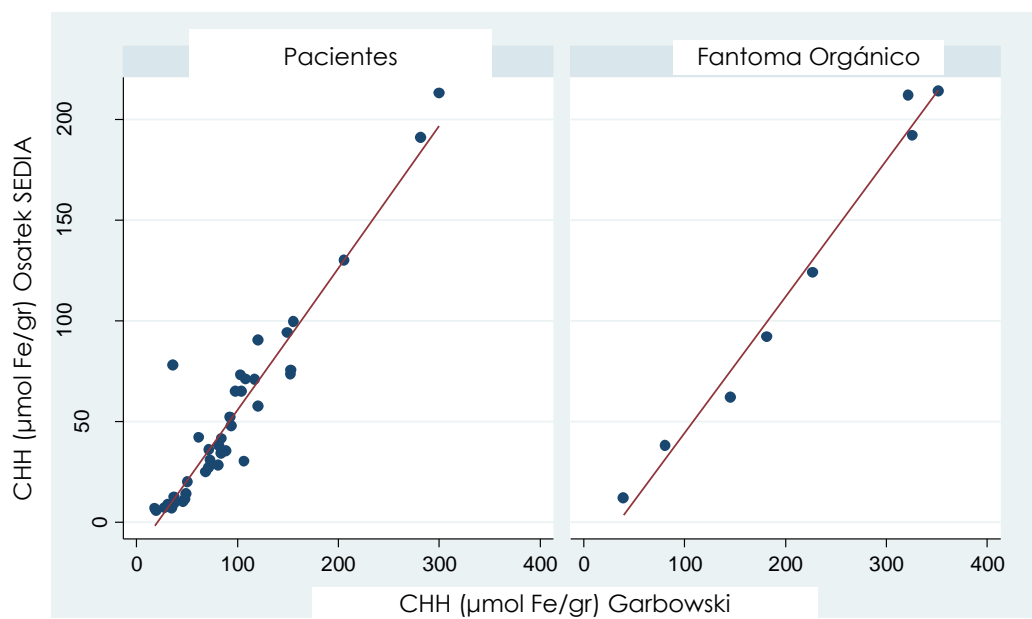


Figura 35 Correlación CHH por RM mediante Osatek SEDIA y Garbowski para los pacientes y para el Fantoma orgánico.

Resultados

Los valores de concentración de grasa medidos en los 4 tubos que no contienen hierro, tabla 7, se han comparado con los 129 pacientes con diferentes niveles de grasa hepática en los que también se ha cuantificado la FF con la secuencia PDFF de RM y el método de medición bioquímico o método Folch.

En la figura 36, se muestra la correlación positiva obtenida para los pacientes y para los tubos a través de RM y mediante el método de Folch. La correlación entre ambos métodos con los pacientes ha sido $r^2 = 0,84$ y con los tubos del Fantoma orgánico $r^2 = 0,99$.

La correlación positiva obtenida entre ambos métodos para los pacientes, figura 36, da lugar a la siguiente ecuación que predice la concentración de grasa por RM a partir del método Folch.

$$[\text{FF}] \text{ Folch} = -5,16 + 4,59 [\text{FF}] \text{ PDFF} \quad r^2 = 0,84$$

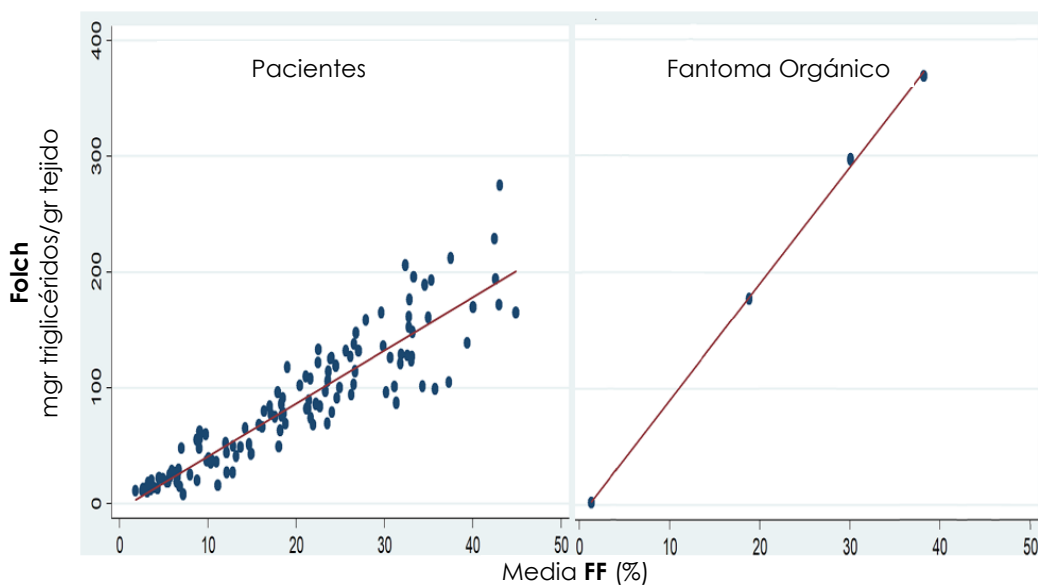


Figura 36 Correlación FF por RM (PDFF) y método de Folch para los pacientes y para el Fantoma orgánico.

DISCUSIÓN

La medicina de precisión es aquella que, entre otros factores, aplica sistemas de diagnóstico exactos para poder adaptar la intervención médica a las características individuales de cada persona y obtener así un beneficio (89).

Para anticiparse y dar una respuesta adecuada a este enfoque de la medicina, es imprescindible abordar el desarrollo y/ o mejora de los sistemas de diagnóstico y seguimiento de enfermedades crónicas. Proporcionando a los facultativos datos clínicos precisos y comparables que les ayuden a decidir sobre la mejor alternativa médica en cuanto a tratamiento o intervención quirúrgica que redunde en una mejora de la salud de las personas.

En este sentido la RM ha demostrado ser una alternativa significativa en la mejora de la precisión de los diagnósticos (1,3). No solo por tratarse de una técnica no invasiva y de menor coste, en comparación con otras alternativas, sino por los avances logrados en los últimos años, que la convierten en un agente clave para el desarrollo de escenarios basados en resultados en salud y de gestión de una medicina de precisión que asegure un envejecimiento saludable de la población.

Centrándonos en las enfermedades sobre las que se ha orientado esta tesis, hemocromatosis y esteatosis, por constituir estas un problema de salud pública debido a su prevalencia en la población actual (2,4), la RM ha demostrado ser una herramienta de diagnóstico excelente, no solo para cuantificar la grasa y hierro en el hígado, sino también para monitorizar la evolución de la hemocromatosis y la esteatosis mediante el desarrollo de máquinas de RM de mayor resolución, la optimización de los sistemas de adquisición de las señales de RM y el desarrollo de distintos sistemas de posproceso que permiten cuantificar las sobrecargas.

Derivado de la existencia de distintos métodos de cuantificación del hierro y la utilización de la RM como alternativa a otras técnicas para la cuantificación de la grasa, surgió el problema de la

Discusión

variabilidad de los resultados entre los diferentes modelos de cuantificación (30,31,36–38), evidenciándose así la necesidad de la estandarización de la técnica de RM para que los resultados puedan ser comparables y reproducibles.

Identificada esta necesidad, en las últimas décadas se han desarrollado investigaciones dirigidas a la construcción de fantasmas para ayudar a generar imágenes más exactas y más consistentes, cuantificar y monitorizar las enfermedades, validar tratamientos, etc.

En este proyecto de investigación, se han diseñado y construido dos fantasmas, biológico y orgánico, desde la perspectiva de la ingeniería de materiales biodegradables para reproducir la estructura de sobrecarga férrica y de grasa en el hígado humano para su cuantificación por RM. Los hallazgos se discuten a continuación.

Fantoma Biológico

El fantoma biológico diseñado, aunque ha sido construido con componentes análogos al del hígado humano con sobrecarga férrica (57,58,63), muestra un comportamiento por RM no similar a las concentraciones de hierro preparadas o reales.

De los cuatro fantasmas biológicos preparados solamente uno de ellos muestra diferencias no significativas, entre la concentración medida por RM y la real o preparada, ($p=n.s.$). Los otros tres fantasmas fabricados muestran diferencias significativas entre las dos concentraciones, $p<0.001$, tabla 13. Comprobándose, así mismo, que en estos tres fantasmas la concentración medida por RM sobreestima el valor real de concentración de hierro preparado.

Tras lo cual se verifica cómo se comporta la diferencia de concentraciones en cada uno de los cuatro fantasmas,

obteniéndose una relación estadísticamente lineal entre ambas concentraciones ($0.92 < r^2 > 0.96$), para los tres fantomas que presentaban diferencias significativas. Y una relación no lineal ($r^2=0.44$) para el fantoma con diferencia de concentraciones no significativa, figura 11. Así mismo, en los cuatro fantomas se comprueba que se produce una saturación de la señal de la concentración de hierro estimada por RM para concentraciones de hierro real superior a 200 mgr Fe^{3+}/gr , que corresponde a señales medidas de $CHH > 400 \mu mol Fe^{3+}/gr$, situación esta ya identificada en estudios previos de RM (1,3).

Y por último, se comprueba el grado de acuerdo o coincidencia entre las concentraciones medidas por RM y las concentraciones reales o preparadas. Obteniéndose valores de acuerdo excesivos en los cuatro fantomas, tabla 15, que hacen que el fantoma biológico sea incompatible para su uso clínico, figura 12.

Pese a estos datos concluyentes de incompatibilidad para su uso clínico, se comprueba la variabilidad de las concentraciones de hierro entre los cuatro fantomas biológicos preparados. Observándose que aunque las concentraciones tienen una relación lineal paralela, de forma sistemática se produce una sobreestimación de la concentración medida por RM respecto a la real o preparada, figura 13.

En RM los núcleos de hidrógeno de los tejidos biológicos son los que generan la señal que permite construir las imágenes. La cantidad de átomos de hidrógeno de una sustancia o tejido determina de forma directa la intensidad de la señal emitida (29). Esta intensidad de señal está afectada por gran cantidad de factores, la mayoría de ellos dependen de los parámetros de la secuencia de adquisición utilizada y de las características técnicas del sistema de RM.

Todos los materiales inmersos en un campo magnético de gran intensidad sufren susceptibilidad magnética. Lo que provoca

Discusión

distorsiones locales del campo magnético a nivel macroscópico que dependen del tipo de material, de su homogeneidad y de su geometría (90).

Durante la fase de diseño del soporte del Fantoma biológico, se tiene en cuenta su geometría para que pueda ser introducido en una bobina de radiofrecuencia o antena craneal de RM. Evitando así interferencias de señales externas al campo y consiguiendo un campo magnético homogeneizado.

Así mismo, se mantiene una distancia entre tubos de 10,22 mm para evitar el alto contraste entre la señal del compuesto de hígado y la pared de vidrio del tubo. Y de igual manera, todos los tubos se encuentran a una distancia de 37,5 mm del fondo para corregir variaciones del campo magnético.

Como se describe en el apartado de preparación de las muestras, para poder añadir en distintas concentraciones el compuesto de sacarato férrico al hígado de cerdo de forma homogénea, éste es triturado, proceso por el cual se introducen inevitablemente partículas de aire a la mezcla de hígado batido.

Este aire introducido, semejable al sincronismo fisiológico de la respiración, produce susceptibilidad magnética incontrolada (51,91), lo que origina una distorsión de la señal de adquisición de RM, derivando en un error de cuantificación de la concentración de hierro por RM en la fase de posproceso de la señal de adquisición.

Debido al aire que se introduce en los tubos del fantoma por la trituración del hígado de cerdo, se produce un artefacto en la señal de adquisición de RM, lo cual genera una sobreestimación de la cantidad de hierro medida por RM respecto a la cantidad de hierro preparada o real en los métodos de posprocesado. Por lo tanto, no se ha podido realizar un diseño matricial de hígado real con diferentes concentraciones de hierro, primer objetivo específico, que permita evaluar y establecer una correspondencia entre las

combinaciones de la concentración de hierro y las variaciones en la señal de RM en máquinas de 1,5 Teslas.

Y por lo tanto, tampoco se ha podido comprobar que diferentes fantasmas biológicos contruidos con las mismas cantidades de hierro, dan las mismas concentraciones de hierro medidas por RM en máquinas de 1,5 Teslas, segundo objetivo específico.

Las burbujas de aire se pueden eliminar o evitar mediante la utilización de sistemas de mezclado por vacío o compresión y mediante la utilización de otro tipo de materiales de porosidad reducida o controlada, como los hidrogeles (51,53,91).

Los hidrogeles son materiales ampliamente utilizados en innumerables aplicaciones, particularmente en el sector biomédico, debido a su biocompatibilidad, a su mecánica y a sus propiedades de transporte (64). Una de las características valiosas de los hidrogeles es su elasticidad, ya que según la naturaleza del hidrogel es similar a la de los tejidos vivos (64).

Fantoma Orgánico

Cuando se diseña un nuevo material, un hidrogel, como en el caso de este proyecto de investigación, se tiene que tener en cuenta la finalidad o aplicabilidad del mismo, que en este caso es reproducir por RM el comportamiento del hígado, con diferentes concentraciones de hierro y grasa.

Para formar este hidrogel heterogéneo, sin interacciones químicas pero con una distribución homogénea de sus componentes en las distintas concentraciones, tabla 7, se ha diseñado un hidrogel mediante un proceso de sintetización por disolución en dos fases (64).

Discusión

En la primera fase se construye un hidrogel emulsionado de agarosa y triglicérido mediante un proceso de sintetización por disolución para emular las vesículas con grasa, que se forman en el hígado graso o esteatosis (5–7), figura 1. Es decir, el triglicérido añadido, debido a su carácter hidrofóbico, debe formar emulsiones en el interior del hidrogel que le resten volumen libre al agua añadida a la agarosa para polimerizar y formar el hidrogel (92), creándose así dos fases heterogéneas.

Para conseguir las dos fases del hidrogel, distribuidas de forma homogénea, se han realizado diversos ensayos con diferentes sistemas mecánicos de disolución, por movimiento de vibración y por movimiento de cizalladura. Finalmente se selecciona el sistema mecánico de cizalladura ya que el movimiento por oscilación armónico no es suficiente para la homogenización del triglicérido en la agarosa, manifestándose en la red del polímero con la apariencia de emulsiones de grasa, visibles al ojo humano. Este sistema mecánico de disolución para formar hidrogeles bifase ha sido utilizado en otras aplicaciones del ámbito de la alimentación principalmente (93).

Una vez seleccionado el sistema mecánico de disolución por cizalladura, según el proceso de sintetización representado en la figura 10, se determinan las variables categóricas de preparación, temperatura, velocidad y tiempo. Consensuándose como óptimas las indicadas en la tabla 24, por la obtención de hidrogeles con textura compacta, figura 37.

	Variables	Parámetros
Hidrogel bifase = (Agarosa + Agua) + Triglicérido		
	Temperatura	70°C
	Velocidad	V5
	Tiempo	5 min
Hidrogel semi-IPN= Hidrogel bifase + Ovoalbúmina Fe³⁺		
	Temperatura	70°C
	Velocidad	V6
	Tiempo	8 min

Tabla 24 Variables categóricas para la sintetización del Fantoma orgánico.

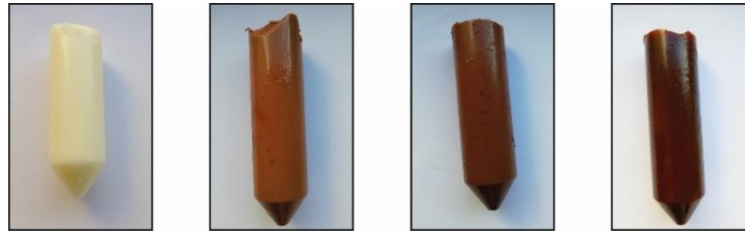


Figura 37 Hidrogeles A1 [0, 0], C3 [20, 400], E4 [30, 800] y G1 [0, 1.200] del Fantoma orgánico.

En las pruebas realizadas para determinar la categorización de la variable de temperatura, además de las comprobaciones realizadas preparando diferentes hidrogeles, se tiene en cuenta que el mecanismo de gelificación de la agarosa se basa en la formación de dobles hélices de las cadenas de este polímero cuando se somete a temperaturas entre 40°C y 90°C, temperatura de gelificación y fusión respectivamente (92). Así como, la temperatura de fusión ($88^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$) y gelificación ($36^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$) de la agarosa utilizada (92). Optándose finalmente por una temperatura de 70°C, para contribuir así a una mayor movilidad de la red polimérica lo que favorece el proceso de disolución de los componentes añadidos (64,94).

Una vez formado el hidrogel bifase de agarosa éste presenta una tendencia a conservar sus propiedades aunque se vuelva a calentar, también conocido como fenómeno de histéresis (92). Característica esta utilizada en la segunda fase de sintetización del hidrogel final para añadirle la proteína férrica, ovoalbúmina Fe^{3+} , mediante un sistema mecánico de cizallamiento con las variables categóricas de preparación indicadas en la tabla 24.

La ovoalbúmina férrica añadida debe emular el comportamiento de la ferritina en el hígado, tabla 5, formando un hidrogel semi-IPN por entrecruzamiento de la red del hidrogel bifase con la red de la proteína ovoalbúmina añadida. Quedando constituido el hidrogel semi-IPN final mediante interacciones físicas de ambas redes, que aseguren que el hierro introducido con la ovoalbúmina se mantiene en su forma Fe^{3+} .

Discusión

La ferritina es una importante proteína globular en forma de casquete hueco, donde se almacena el hierro en su interior, formando un núcleo mineral inorgánico de fórmula $[\text{Fe}(\text{OH})]_8 [\text{FeO}(\text{H}_2\text{PO}_4)]$, denominado normalmente ferrihidrita, en el cual los iones de Fe^{3+} se encuentran coordinados con iones O^{2-} . De esta estructura, el 10% corresponde a iones Fe^{3+} coordinados con 5 iones O^{2-} cada uno y un grupo fosfato. La mayor parte de los grupos fosfatos se encuentran en la parte externa de la estructura cristalina y son utilizados para unir de forma covalente el mineral con las cadenas laterales carboxiladas de los residuos del interior de la proteína, figura 38, (95).

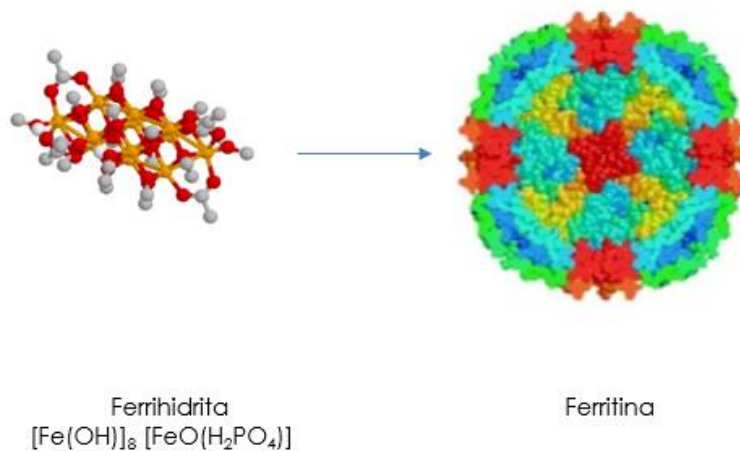


Figura 38 Estructura del núcleo mineral de hierro que se forma en el interior de la ferritina (95).

Para dar respuesta al cuarto objetivo específico, indicado en el apartado de hipótesis y objetivos, y para corroborar las interacciones físicas entre los componentes añadidos al hidrogel, se realiza la caracterización de este último. Además, se comprueba la estabilidad del fantoma orgánico con una elaboración estandarizada.

La complejidad de la determinación de las interacciones entre los compuestos de un hidrogel, también llamada elucidación estructural, es tal que se requiere la utilización de distintas técnicas complementarias para su determinación (96).

Se exponen a continuación los hallazgos fruto de los cinco ensayos de caracterización realizados, a los hidrogeles en sus diferentes concentraciones.

Caracterización del Hidrogel

Del análisis global de los FTIR realizados, figuras 14, 15, 16 y 17, se concluye que no se produce ninguna desviación de las bandas de tensión características de cada uno de los principales grupos funcionales de los compuestos añadidos. Únicamente se observa una disminución de las bandas de tensión del grupo funcional –OH, debido a la disminución del grado de polimerización del hidrogel de agarosa por la incorporación del triglicérido.

Estos resultados indican que no hay interacción química entre los compuestos utilizados para formar el hidrogel.

Del análisis de las curvas DSC, figura 19, que representan la interacción de la grasa con el hidrogel de agarosa, en sus distintas concentraciones, se concluye que al ir añadiendo triglicérido al hidrogel se necesita más temperatura para poder cambiar de fase, lo que indica una buena interacción entre ambos componentes.

De la figura 20, curvas DSC que representan la interacción del compuesto de hierro con el hidrogel de agarosa, en sus distintas concentraciones, se observa un aumento de la temperatura pico y del flujo de calor, a medida que se añade el compuesto férrico, lo que muestra una muy buena interacción entre el hidrogel de agarosa y la ovoalbúmina.

Si se analiza la variación de las curvas DSC según se añaden ambas componentes al hidrogel de agarosa, figuras 21 y 22, a

Discusión

medida que se incorpora hierro, se observa una falta de espacio del hidrogel formado con los tres componentes. Esta falta de espacio viene representada por las variaciones de la temperatura del pico endotérmico según se añade el triglicérido a altas concentraciones de hierro añadido.

Del estudio morfológico realizado a los tubos D1 [0 ml grasa, 600 mgr Fe^{3+}] y D4 [20ml grasa, 600 mgr Fe^{3+}], se observa que la superficie del hidrogel es densa, compacta y lisa, debido a la formación de una capa de piel característica de los hidrogeles semi-IPN (88).

Respecto al ferrimanitol ovoalbúmina añadido, figura 23, se observa un entrecruzamiento uniforme con el hidrogel de agarosa, con áreas y distribución homogénea en forma laminar, así como la aparición de valles de hierro anclados, lo que indica que no hay interacción química entre ambos componentes, únicamente un entrecruzamiento entre la proteína ovoalbúmina y el hidrogel de agarosa. Todo ello indica la buena interacción física entre la agarosa polimerizada y la ovoalbúmina de hierro.

Así mismo, este entrecruzamiento uniforme observado, con una distribución homogénea en forma laminar de la ovoalbúmina en el polímero de agarosa, valida el sistema mecánico de cizalladura utilizado para disolver los compuestos. El uso de sistemas mecánicos de rotación o extrusión física favorece la ultra homogeneización de los hidrogeles (97).

Al añadir grasa al hidrogel formado, figura 24, se comprueba la aparición de emulsiones, lo que muestra el carácter hidrofóbico de ambos elementos. También se observa una distribución no homogénea del triglicérido, lo que corrobora lo detectado en los ensayos de calorimetría, esto es, que al ir añadiendo grasa a la red polimérica de la agarosa se presentan impedimentos de espacio para los hidrogeles con concentraciones elevadas de hierro.

De la medición de la señal media de agua medida por RM, hidratación del hidrogel, se comprueba la estabilidad del hidrogel en las siete mediciones realizadas durante 4 años ($p=n.s.$), figura 25.

Se excluye la octava medición por considerarse un error de lectura de esta señal por RM, ya que la medición de las señales CHH y FF por RM, figuras 28 y 30 respectivamente, presentan datos concordantes en la octava medición con el resto de mediciones realizadas en el tiempo, para cada una de estas señales. Excluyendo esta octava medición, se continúa obteniendo una estabilidad estadísticamente no significativa mejorada ($p=n.s.$).

Así mismo, se comprueba que el porcentaje de agua medio medido por RM aumenta al aumentar la cantidad de agua añadida para formar los distintos hidrogeles.

Para determinar si este porcentaje de agua medido por RM es suficiente para crear un tamaño de red reticulada que permita al hidrogel albergar los dos componentes, el hierro y la grasa, se mide el pH de los hidrogeles antes y después de su gelificación.

El tamaño de la malla del hidrogel, es la distancia entre puntos de reticulación de la red polimerizada y es una medida del espacio disponible entre la macromolécula polimerizada para entrecruzarse con otras cadenas o albergar en su interior otras macromoléculas. Este tamaño de malla se ve influenciado por la temperatura y el pH final del hidrogel e indica la densidad de reticulación del hidrogel (64).

Las mediciones de pH realizadas a los tubos de hidrogel del fantoma orgánico muestran que, a medida que aumenta la concentración de los compuestos añadidos, la densidad de reticulación del polímero es mayor, ya que el pH va virando hacia valores de pH alcalino. Lo que indica un menor espacio en el interior de la red polimérica del hidrogel, que se relaciona con la falta de

Discusión

espacio del triglicérido, detectada en el ensayo de DSC para concentraciones elevadas de hierro.

Analizados los resultados de todos los ensayos de caracterización realizados, se concluye que se ha cumplido el cuarto objetivo específico, conocer cómo interacciona la red polimérica reticulada formada del hidrogel final diseñado donde se acomoda el hierro, en su forma Fe^{3+} y el triglicérido, con las siguientes características:

- El elemento polimerizante seleccionado para formar hidrogeles con uniones secundarias, muestra la capacidad de reorganizarse para poder contener la ovoalbúmina Fe^{3+} y el triglicérido añadidos, en diferentes concentraciones, sin interacciones químicas, ensayos FTIR.
- No se producen interacciones químicas entre el polímero de agarosa y los dos compuestos añadidos, la ovoalbúmina férrica y el triglicérido, ensayos FTIR.
- Las uniones secundarias que generan el entrecruzamiento de la molécula de ovoalbúmina y el encapsulamiento del triglicérido, es buena en ambos componentes, ensayo DSC y SEM.
- La agarosa presenta un comportamiento viscolástico, siendo capaz de adaptar el tamaño de la red polimérica a las diferentes cantidades de componentes añadidas. Detectándose un problema de espacio con el triglicérido en la red polimérica para niveles altos de hierro, ensayos DSC y SEM.
- Los hidrogeles formados son estables, repetibles y con una elaboración estandarizada, ensayos de hidratación y medición del pH.
- El hidrogel presenta una distribución homogénea que asegura la ausencia de aire en su interior, ensayos SEM.

Tras lo cual, se exponen a continuación los hallazgos del comportamiento del material por RM, para simular al Hígado por RM con sobrecarga de hierro y grasa.

Resultados de la RM

El Fantoma orgánico construido, en base a un diseño matricial de hidrogel de agarosa con diferentes concentraciones de hierro y grasa, figura 26, muestra tener una variación proporcional y lineal entre la concentración de grasa medida por RM y la real o preparada para sobrecargas normales o moderadas de hierro en el hígado, tabla 8. Es decir, para valores altos y muy altos de hierro, la media de grasa medida por RM subestima la cantidad real o añadida.

Esta conclusión está en línea con lo observado en el ensayo de calorimetría, donde se evidencia que para concentraciones de hierro elevadas la grasa en sus distintas concentraciones presentaba problemas de espacio.

En la fase de diseño del soporte del Fantoma orgánico se tiene en cuenta su geometría para que pueda ser introducido en una bobina de cuerpo integrado de RM. Evitando así interferencias de señales externas al campo y consiguiendo un campo magnético homogeneizado.

Así mismo, se ha mantenido una distancia para todos los tubos de 11 mm al fondo del soporte y una distribución equidistante entre los mismos, para corregir variaciones del campo magnético.

Por todo lo indicado anteriormente, se concluye que se cumple el tercer objetivo específico para sobrecargas combinadas normales o moderadas, ya que el diseño matricial de concentraciones de hierro y grasa, permite evaluar y establecer una correspondencia con las sobrecargas normales y moderadas de hierro con grasa en el hígado por RM.

Discusión

Una vez evaluada la correspondencia por RM de las sobrecargas añadidas al Fantoma orgánico, se comprueba la estabilidad en el tiempo de los hidrogeles formados a través de las distintas señales obtenidas por RM, quinto objetivo específico, concluyéndose que el compuesto diseñado es estable durante al menos 4 años.

Las señales T2*, CHH y FF, figura 27, 28 y 30, analizadas muestran una similitud no significativa en el tiempo y cada una de las señales medidas por RM aumentan proporcionalmente al aumentar la cantidad de hierro y triglicérido añadido, respectivamente.

Respecto a la señal media de grasa se detectan errores de lectura en la primera y octava medición. Excluyendo la primera medición del estudio se obtiene una similitud no significativa en el tiempo. La cuantificación FF, o señal FF, se obtiene de forma automática por la máquina de RM a partir de la señal de agua y de grasa, por lo tanto, si no se hubieran producido errores de lectura en alguno de sus valores, no se hubiera obtenido una similitud no significativa en el tiempo de esta señal. Es decir, la similitud no significativa de la señal FF en el tiempo confirma los errores de lectura detectados en algunas de las mediciones de grasa y agua.

Una vez comprobado que los hidrogeles de agarosa del Fantoma orgánico presentan un buen comportamiento solo para valores normales y moderados de hierro con grasa, se decide realizar la estimación por separado, de cada una de las sobrecargas de hierro y grasa, con diferentes métodos de cuantificación.

En el caso de los tubos de **hidrogel con sobrecarga férrica**, se comparan las estimaciones de CHH obtenidas por el método Osatek SEDIA (30), con los métodos de Relaxometría T2* de Wood (36) y de Garbowski (37), sexto objetivo específico. Presentando ambos métodos una muy buena correlación $r^2=0.99$ y $r^2=0.98$, respectivamente, figura 31 y 32.

Los valores de concentración de hierro medidos en los tubos, figura 31, están comprendidos entre 12 y 214 $\mu\text{mol Fe/gr}$ según el método Osatek-SEDIA y entre 34 y 283 $\mu\text{mol Fe/gr}$ según el método de Wood. Y para el método de Garbowski entre 39,3 y 351,71 $\mu\text{mol Fe/gr}$. Por lo tanto, mediante estos métodos estamos cuantificando CHH en todo el rango de hemocromatosis, tabla 8.

Para finalizar la **validación** de los **hidrogeles** formados **con sobrecarga férrica**, se analiza la capacidad para remedar el funcionamiento del hígado respecto al contenido de hierro de los **pacientes**, séptimo objetivo específico. Se comparan con los mismos métodos que se han utilizado para los tubos de hidrogel con sobrecarga férrica, Wood y Garbowski, presentando ambos métodos una buena correlación $r^2=0.90$ y $r^2=0.89$, respectivamente, figura 34 y 35.

En los 41 pacientes estudiados por RM los niveles de concentración de hierro están entre 5,6 y 213 $\mu\text{mol Fe/gr}$ con el método Osatek-SEDIA, entre 17 y 282 $\mu\text{mol Fe/gr}$ con el método de Wood y para el método de Garbowski entre 18 y 300 $\mu\text{mol Fe/gr}$. Es decir, a través de los diferentes métodos estamos cuantificando la CHH de todo el rango de hemocromatosis, tabla 8.

Este alto nivel de correlación demuestra que los hidrogeles de agarosa con diferentes concentraciones de ferrimanitol ovoalbúmina reproducen el comportamiento de los pacientes con diferentes niveles de CHH en estos métodos de cuantificación de la sobrecarga de hierro por RM.

Desde el punto de vista del comportamiento del hidrogel con sobrecarga férrica diseñado, se concluye que esta alta correlación obtenida, entre diferentes métodos de RM, es debida a la incorporación del Fe^{3+} a través de la proteína ovoalbúmina, asegurándose así la no oxidación del hierro férrico por contacto con el hidrogel de agarosa y su estabilidad durante al menos 4 años.

Discusión

Y por tanto se puede decir que el Fantoma orgánico diseñado puede utilizarse para comparar la reproducibilidad de nuevos métodos de cálculo de la concentración de hierro, todavía no validados sin recurrir a la biopsia hepática.

En el caso de los tubos de **hidrogel con sobrecarga grasa**, se comparan las estimaciones de FF, de los 4 tubos del fantoma orgánico que no tienen concentración de hierro (tabla 7), obtenidas por RM a través de la secuencia PDFF con el valor de medición bioquímica de triglicéridos o método Folch (18) de cada tubo, sexto objetivo específico. Presentando una muy buena correlación $r^2=0.99$, figura 33.

Los valores de FF medidos en los tubos, figura 33, están comprendidos entre 2,1 y 368,8 μmol Triglicéridos/gr según el método Folch y entre 0% y 37,25% según la secuencia PDFF de RM. Mediante ambos métodos estamos cuantificando FF en todo el rango de esteatosis, tabla 9.

Para finalizar la **validación** de los **hidrogeles** formados **con sobrecarga grasa**, séptimo objetivo específico, se analiza la capacidad para remedar el funcionamiento del hígado respecto al contenido de grasa de los **pacientes** con los mismos métodos que se han utilizado para los tubos de hidrogel con sobrecarga grasa, secuencia PDFF de RM y método Folch. Presentando ambos métodos una buena correlación $r^2=0.84$, figura 36.

En los 129 pacientes estudiados por RM los niveles de concentración de grasa están entre 8 y 275 μmol Triglicéridos/gr con el método de Folch y entre 1,8% y 44,9% con la secuencia PDFF de RM. A través de ambos métodos estamos cuantificando la FF en todo el rango de esteatosis, tabla 9.

Este alto nivel de correlación demuestra que los hidrogeles de agarosa con diferentes concentraciones de manteca de oca

reproducen el comportamiento de los pacientes con diferentes niveles de FF mediante la secuencia PDFF de RM.

Y por tanto se puede considerar que el Fantoma orgánico diseñado puede utilizarse para comparar la reproducibilidad de nuevos métodos de cálculo de la concentración de grasa sin recurrir a la medición bioquímica de la biopsia o método Folch.

Desde el punto de vista del diseño del hidrogel, se puede concluir que el hidrogel bifase construido a partir de agar como fase acuosa y manteca de oca como fase apolar es capaz de emular el comportamiento de la grasa del hígado por RM. Esto se debe a que las formulaciones a base de bigel combinan las ventajas de las formulaciones bifásicas (emulsiones) y la estabilidad inherente de las formulaciones a base de gel (92).

CONCLUSIONES

1. La construcción de fantomas, para reproducir el comportamiento del hígado humano por RM, mediante la utilización de hígado triturado no ha resultado válida debido a la generación de aire que se introduce en la mezcla y que origina susceptibilidad magnética incontrolable.
2. Hidrogeles semi-IPN formados a partir del bigel de agarosa con emulsiones de grasa al cual se le añade la ovoalbúmina de hierro, son factibles para reproducir el comportamiento de los tejidos del hígado con sobrecarga férrica, grasa o sobrecargas combinadas normales o moderadas, por RM.
3. La incorporación de la sobrecarga férrica mediante la proteína ovoalbúmina, en el hidrogel del Fantoma orgánico, asegura que las cantidades de hierro (Fe^{3+}) añadidas no se oxidan y proporcionan similares concentraciones de hierro medidas por RM.
4. El hidrogel diseñado para el fantoma orgánico, presenta durante 4 años estabilidad para reproducir por RM el comportamiento de sobrecarga de hierro y grasa.
5. Existe una correlación positiva muy alta entre la estimación de concentración de hierro medida en el Fantoma orgánico, mediante el método Osatek SEDIA y los métodos de Wood y Garboski.
6. El Fantoma orgánico diseñado es capaz de remedar el funcionamiento del hígado con sobrecarga de hierro de los pacientes, a través de su cuantificación mediante los métodos Osatek SEDIA, Wood y Garboski.
7. Existe una correlación positiva muy alta entre la estimación de concentración de grasa medida mediante la secuencia PDFF de RM y el método bioquímico o Folch.

Conclusiones

8. El Fantoma orgánico diseñado es capaz de remedar el funcionamiento del hígado con sobrecarga de grasa de los pacientes, a través de la cuantificación de FF mediante la secuencia PDFF de RM.

Líneas futuras de trabajo

El desarrollo de nuevos hidrogeles, profundizando en el estudio de variables como las relacionadas con la cadena polimérica (longitud o peso molecular de la unidad repetitiva) y las relacionados con los enlaces cruzados (peso molecular entre dos enlaces cruzados o tamaño de la malla), ayudaría a mejorar su estructura para remedar por RM el comportamiento del hígado humano con sobrecarga de hierro y grasa simultáneamente.

El desarrollo de esta Tesis se ha basado en la utilización de máquinas RM de 1,5 Tesla por su amplia disponibilidad en los centros de RM y por la disponibilidad de datos de cuantificación de grasa y hierro de pacientes validados, en estudios previos, mediante biopsias. Se cree que en el futuro estas máquinas serán paulatinamente sustituidas por máquinas 3 Tesla por lo cual es necesario realizar nuevos estudios de validación.

El fantoma orgánico validado en esta tesis permitirá adaptar de manera fiable a máquinas de 3 teslas los modelos de cálculo de la concentración de hierro y grasa hepática previamente validados a 1,5 Teslas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yokoo T, Browning JD. **Fat and iron quantification in the liver: past, present, and future.** *Top Magn Reson Imaging TMRI* 2014, 23(2):73-94.
2. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. **The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States.** *Impacto de etnia Hepatología.* 2004, 1387–1395.
3. Labranche R, Gilbert G, Cerny M, Vu K-N, Soulieres D, Olivie D, et al. **Liver Iron Quantification with MR Imaging: A Primer for Radiologists.** *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc* 2018, 38(2):392-412.
4. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, et al. **Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study.** *Hepatology* 2005, 42:44–52.
5. Brunt EM. **Pathology of nonalcoholic fatty liver disease.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010, 195–203.
6. Brunt EM, Tiniakos DG. **Pathology of steatohepatitis.** *Best Pr Res Clin Gastroenterol.* 2002, 691–707.
7. Levene AP, Goldin RD. **The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease.** *Histopathology.* 2012, 61:141–152.
8. *Mayo Clinic: Enfermedad hepática del hígado graso no alcohólico.* 2020.
9. Targher G, Day CP, Bonora E. **Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease.** *N Engl J Med* 2010, 1341-1350.
10. Cuadrado A, Orive A, Garcia-Suarez C, Dominguez A, Fernandez-Escalante JC, Crespo J, Pons-Romero F. **Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatocellular carcinoma.** *Obes Surg* 2005, 153442-446.
11. Stepanova M, Rafiq N, Younossi ZM. **Components of metabolic syndrome are independent predictors of mortality in patients with chronic liver disease: a population-based study.** *Gut* 2010, 59101410-1415.
12. Brittenham GM, Badman DG. **Noninvasive measurement of iron.** *Rep NIDDK Workshop Blood.* 2013, 101: -19.
13. Frazer DM, Anderson GJ, Ramm GA, Subramaniam VN, Powell LW. **How much iron is too much?.** *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2008, 287-290.
14. O’Neil J, Powell L. **Clinical aspects of hemochromatosis.** *Semin Liver Dis.* 2005, 381-391.

Referencias Bibliográficas

15. Villeneuve JP, Bilofdeau M, Lepage R et al. **Variability in hepatic iron concentration measurement from needle-biopsy specimens.** *J Hepatol.* 1996, 172-177.
16. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, et al. **Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions.** *Am J Gastroenterol.* 1999, 94:2467-2474.
17. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. **Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology.* 2005, 41:1313-1321.
18. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.** *J Biol Chem.* 1957.
19. Iverson SJ, Lang SL, Cooper MH. **Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue.** *Lipids* 2001, 36:11283-1287.
20. Llorenç Caballeriaa,b,s, Salvador Augustinc,d,s, Teresa Broquetas. **Recommendations for the detection, diagnosis and follow-up of patients with non-alcoholic fatty liver disease in primary and hospital care.** *Med Clínica.* 2019.
21. Yeh BM, Shepherd JA, Wang ZJ, Teh HS, Hartman RP,, Prevrhal S. **Dual-energy and low-kVp CT in the abdomen.** *AJR Am J Roentgenol* 2009, 193:147-54.
22. Karçaaltıncaba M, Aktas A. **Dual-energy CT revisited with multidetector CT: review of principles and clinical applications.** *Diagn Interv Radiol* 2011, 173:181-194.
23. Rose C, Vandevenne P, Bourgeois E, Cambier N, Ernst O. **Liver iron content assessment by routine and simple magnetic iron concentration and comparison with R2 Ferriscan.** *Cardiovasc Magn Reson* 2014, 1640.
24. Longo R, Pollesello P, Ricci C, et al. **Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis.** *J Magn Reson Imaging.* 1995, 281-285.
25. Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, et al. **Measurement of intracellular triglyceride stores by H spectroscopy: validation in vivo.** *Am J Physiol.* 1999, 276(pt):E977-E989.
26. Reeder SB, Hu HH, Sirlin CB. **Proton density fat-fraction: a standardized MR-based biomarker of tissue fat concentration.** *J Magn Reson Imaging.* 2012, 36:1011-1014.

27. Hu HH, Bornert P, Hernando D, et al. **ISMRM workshop on fat-water separation: insights, applications and progress inMRI.** *Magn Reson Med.* 2012, 68:378–388.
28. Brittenham GM, Badman DG. **Noninvasive measurement of iron: report of an NIDDK workshop.** *Blood.* 2003, 101: -19.
29. Miguel A. Pastrana Ledesma. **Técnicas de imagen por resonancia magnética.**
30. Alustiza JM, Artetxe J, Castiella A, Agirre C, Emparanza JI, Otazua P, et al. **MR quantification of hepatic iron concentration.** *Radiology.* 2004, 230(2):479-84.
31. Gandon Y., Olivie D., Guyader D., Aube C., Oberti F., Sebille V., et al. **Non-invasive assessment of hepatic iron stores by MRI.** *Lancet.* 2004, 363(9406):357-62.
32. Ernst O, Sergent G, Bonvarlet P, Canva-Delcambre V, Paris JC, L'Hermine C. **Hepatic iron overload: diagnosis and quantification with MR imaging.** *AJR Am J Roentgenol.* 1997, 168(5):1205-8.
33. Gianesin B, Zefiro D, Musso M, Rosa A, Bruzzzone C, Balocco M, et al. **Measurement of liver iron overload: noninvasive calibration of MRI-R2* by magnetic iron detector susceptometer.** *Magn Reson Med.* 2012, 67(6):1782-6.
34. Carson SM, Martin MB. **Effective iron chelation practice for patients with beta-thalassemia major.** *Clin J Oncol Nurs* 2014, 181102–111.
35. Farhangi H, Badiei Z, Moghaddam HM, Keramati MR. **Assessment of Heart and Liver Iron Overload in Thalassemia Major Patients Using T2* Magnetic Resonance Imaging.** *Indian J Hematol Blood Transfus Off J Indian Soc Hematol Blood Transfus.* 2017, 33(2):228-34.
36. Wood JC1, Enriquez C, Ghugre N, Tyzka JM, Carson S, Nelson MD, Coates TD. **MRI R2 and R2* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients.** *Blood.* 2005.
37. Garbowski MW, Carpenter J-P, Smith G, Roughton M, Alam MH, He T, et al. **Biopsy-based calibration of T2* magnetic resonance for estimation of liver iron concentration and comparison with R2 Ferriscan.** *J Cardiovasc Magn Reson Off J Soc Cardiovasc Magn Reson.* 2014, 6(d4g, 9815616):40.
38. Hankins JS, McCarville MB, Loeffler RB, Smeltzer MP, Onciu M., Hoffer FA, et al. **R2* magnetic resonance imaging of the liver in patients with iron verload.** *Blood* 2009, 1134853---5.

Referencias Bibliográficas

39. Bonkovsky HL, Rubin RB, Cable EE, Davidoff A, Rijcken TH, Stark DD. **Hepatic iron concentration: noninvasive estimation by means of MR imaging techniques.** *Radiology.* 1999, 212:227-234.
40. St Pierre TG, Clark PR, Chua-anusorn W, Fleming AJ, , et al. **Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance.** *Blood.* 2005, 105:855-61.
41. Ernst O, Rose C, Sergent G et al. **Hepatic iron overload: quantification with MR imaging at 1.5 T.** *AJR.* 1999, 172:1141-1142.
42. Virtanen JM. **Quantitative liver iron measurement by MRI: in vitro and in vivo assessment of the liver to muscle signal intensity and the R2* methods** *Magnetic Resonance Imaging.* 2008, 1175-1182.
43. TH M Okada, M Kudo. **Phantom study of liver fat quantification in dual-energy CT: comparison to single-energy CT and MR spectroscopy.** *ECR2 2013.*
44. **Quantification of liver iron content with CT added value of dual-energy.** *Eur Radiol* 2011, 1727-1732.
45. Lerski R, Schad L. **The use of reticulated foam in texture test objects for magnetic resonance imaging.** *Magn Reson Imaging* 1998, 16:1139-1144.
46. Jirak D, Dezortova M, H_ajek M. **Phantoms for texture analysis of MR images. Long-term and multi-center study.** *Med Phys* 2004, 31:616-622.
47. Waugh SA, Lerski RA, Bidaut L, Thompson AM. **The influence of field strength and different clinical breast MRI protocols on the outcome of texture analysis using foam phantoms.** *Med Phys* 2011, 38:5058-5066.
48. Mayerhoefer ME, Szomolanyi P, Jirak D, et al. **Effects of magnetic resonance image interpolation on the results of texture-based pattern classification a phantom study.** *Invest Radiol* 2009, 44:405-411.
49. Mayerhoefer ME, Szomolanyi P, Jirak D, Materka A, Trattnig S. **Effects of MRI acquisition parameter variations and protocol heterogeneity on the results of texture analysis and pattern discrimination: an application-oriented study.** *Med Phys* 2009, 36:1236-1243.
50. Guidetti M, Lorgna G, Hammersly M, et al. **Anisotropic composite material phantom to improve skeletal muscle characterization using magnetic resonance elastography.** *Mech Behav Biomed Mater* 2019, 89:199-208.
51. Brown GC, Cowin GJ, Galloway GJ. **A USPIO doped gel phantom for R2* relaxometry.** *Magma N Y N.* 2017, 30(1):15-27.

52. Pickhardt PJ, Graffy PM, Reeder SB, Hernando D, Li K. **Quantification of Liver Fat Content With Unenhanced MDCT: Phantom and Clinical Correlation With MRI Proton Density Fat Fraction.** *AJR Am J Roentgenol.* 2018, 211(3):W151-7.
53. Arai T, Misawa M, Arai M, Shinozaki M, Sakamoto K, Yajima Y, et al. **Accuracy analysis of intrahepatic fat density measurements using dual-energy computed tomography: Validation using a test phantom.** *J X-Ray Sci Technol.* 2017, 25(3):403-15.
54. Nazanin Mobini; Malakeh Malekzadeh; · Hamidreza Haghhighatkah. **A hybrid (iron–fat–water) phantom for liver iron overload quantification in the presence of contaminating fat using magnetic resonance imaging.** *Eur Soc Magn Reson Med Biol ESMRMB* 2019.
55. Allen SP, Vlaisavljevich E, Shi J, Hernandez-Garcia L, Cain CA, Xu Z, et al. **The response of MRI contrast parameters in in vitro tissues and tissue mimicking phantoms to fractionation by histotripsy.** *Phys Med Biol.* 2017, 62(17):7167-80.
56. Braenne KR, Flinder LI, Almenning Martiniussen M, Jensen K, Risse CH, Julsrud L, et al. **A Liver Phantom Study: CT Radiation Dose Reduction and Different Image Reconstruction Algorithms Affect Diagnostic Quality.** *J Comput Assist Tomogr.* 2016, 40(5):735-9.
57. DJ de Milán¹, MacRae CA. **Animal models for arrhythmias.** *Res Cardiovasc* 2005.
58. Clauss S, Bleyer C, Schüttler D, Tomsits P, Renner S, Klymiuk N, Wakili R, Massberg S, Wolf E, Käb S. **Animal models of arrhythmia: classic electrophysiology to genetically modified large animals.** *Nat Rev Cardiol* 199.
59. Brissot P, Loréal O. **Iron metabolism and related genetic diseases.** *Clear Land Keep Mysteries J Hepatol* 2016, 64(2):505–515.
60. Ohnishi S, Hara M, Furuno T, Sasabe H. **Imaging the ordered arrays of water-soluble protein ferritin with the atomic force microscope.** *Biophys J.* 1992, 63(5):1425–1431.
61. Brunt EM. **Pathology of hepatic iron overload.** *Semin Liver Dis* 2005, 392–401.
62. Iancu TC. **Ferritin and hemosiderin in pathological tissues.** *Electron Microsc* 1992, Rev. 209–229.
63. Vifor France. **Ficha técnica Venofer 20 mg/ml solución inyectable o concentrado para solución para perfusión** 2019.

Referencias Bibliográficas

64. Caccavo D, Cascone S, Lamberti G, Barba AA. **Hydrogels: experimental characterization and mathematical modelling of their mechanical and diffusive behaviour.** *Chem Soc* 2018, 47(7):2357-73.
65. S. M. Willerth and S. E. Sakiyama-Elbert, **Adv. Drug Deliv.** 2007, Rev. 30, 325.
66. T. R. Hoare; D. S. Kohane, **Polymer.** 2008, 49, 1993.
67. T. Gros, J. S. Sakamoto, A. Blesch, L. A. Havtane and M. H. Tuszynski, **Biomaterials** 2010, 31, 6719.
68. S. Mehrotra, D. Lynam, R. Maloney, K. M. Pawelec, M. H. Tuszynski, I. Lee, C. Chan and, J. Sakamoto. **Adv. Funct. Mater.** 2010, 20, 247.
69. R. Schulz, S. Höhle, G. Zernia, M. Zscharnack, J. Schiller, A. Bader, K. Arnold and D. Huster. **Nanosci. Nanotechnol.** 2006.
70. M. Rinaudo. **Polym. Int.** 2008, 57, 397.
71. Tedec-Meiji. **Prospecto Informativo para el usuario del PROFER 40 mg Granulado (Ferrimanitol ovoalbúmina)** 2009.
72. Zilg, H., Schneider, H., & Seiler, F. R. **Molecular aspects of albumin functions: indications for its use in plasma substitution.** *Dev Biol.* 1980.
73. Nain González, Jesús Contreras, Francisco López-Carrasquero, Amal El-Halah, Carlos Torres, José Luis Prin, José Benítez and, Blanca Rojas de Gáscue. **Study of the synthesis and characterization of semi -IPN hydrogels obtained from polyacrylamide and the biopolymer poly (hydroxybutyrate -co-hydroxyvalerate).** *INTERCIENCIA* 2013, VOL 38 N° 06.
74. Diana Soto, Haydée Oliva. **MÉTODOS PARA PREPARAR HIDROGELES QUÍMICOS Y FÍSICOS BASADOS EN ALMIDÓN: UNA REVISIÓN.** *Rev Lat Met Mat* 2012, 32 2 154-175.
75. OSATEK. **Manual de adquisición y cálculo de Hierro Hepático en RM.** SEDIA 2004.
76. Hijona E, Sanchez-Gonzalez J, Alustiza JM, Hijona L, **Accurate fat fraction quantification by multiecho gradient-recalled-echo magnetic resonance at 1.5T in rats with nonalcoholic fatty liver disease.** *Eur J Radiol.* 2012, 81(6):1122-1127.
77. Raúl Jiménez-Agüero, José I Emparanza, Adolfo Beguiristain, Luis Bujanda, **Novel equation to determine the hepatic triglyceride concentration in humans by MRI: diagnosis and monitoring of NAFLD in obese patients before and after bariatric surgery.** *BMC Med* 2014.
78. Larkin, Peter J. **INFRARED AND RAMAN SPECTROSCOPY PRINCIPLES AND SPECTRAL INTERPRETATION.** ELSEVIER 2011.

79. Richard H SAUNDRY Andrew D NISBET, Arthur J G MOIR, Linda A FOTHERGILL, and John E FOTHERGILL. **The Complete Amino-Acid Sequence of Hen Ovalbumin.** *Eur J Biochem* 1980, 115 335-345.
80. E.Pretsch; P.Bühlmann; C.Affolter; A.Herrera; R.Martínez. **Determinación estructural de compuestos orgánicos.** *Springer* 2001.
81. A.O.C.S. **American Oil Chemists' Society**, *Official methos Ce 1-62*, USA.
82. J.G. Bartlet, J.H. Mahon. **Identification of oils and the detection of oil adulteration by differential infrares spectroscopy.** *JOACS* 1958, 41(2)450– 459.
83. M.D. Guillen, N. Cabo. **Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats.** *J Sci Food Agric.* 1997, 75 () – 11.
84. F.R. Van de voort, A.A. Ismail. **Proximate analysis of foods by mid-FTIR spectroscopy.** *Trends Food Sci Technol* 1991, 2113– 17.
85. L.J. Bellamy. **The Infrared Spectra Of Complex Molecules.** *Chapman & Hall, London, UK* 1980, Vol. 2, 2nd ednR.
86. F.R. Van de voort, J. Sedman, G. Emo, A.A. Ismail. **A rapid FTIR quality control method for fat and moisture determination in butter.** *Food Res Int* 1992, 25 3 193– 198.
87. Alfred A. Christy, Per K. Egeberg. **Quantitative determination of saturated and unsaturated fatty acids in edible oils by infrared spectroscopy and chemometrics.** *Chemom Intell Lab Syst* 82 2006, 130 – 136 ELSEVIER.
88. Vardar E, Vert M, Coudane J, Hasirci V, Hasirci N. **Porous Agarose-Based Semi-IPN Hydrogels: Characterization and Cell Affinity Studies.** *J Biomater Sci Polym Ed.* 2012, 23(18):2273-86.
89. Departamento de Salud del Gobierno Vasco. **Marco Estratégico 201-2024** 2020.
90. Hashemi RH. **Artefacts in MRI.** *Philadelphia, Pa: Wolters Kluwer*, 2010; 206–207.
91. Amini I., Akhlaghi P., Sarbakhsh P. **Construction and verification of a physical chest phantom from suitable tissue equivalent materials for computed tomography examinations.** *Radiat Phys Chem. Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences* 2018, 51-7.
92. Sarika Patel Kodela, Preeti Madhuri Pandey, Suraj K. Nayak, K. Uvanesh,, Arfat Anis & Kunal Pal. **Novel agar-stearyl alcohol oleogel-based bigels as structured delivery vehicles.** *Int J Polym Mater Polym Biomater* 2017.

Referencias Bibliográficas

93. Thomas S. Skelhon, Patrik K. A. Olsson, Adam R. Morgan and Stefan A. F. Bon. **High internal phase agar hydrogel dispersions in cocoa butter and chocolate as a route towards reducing fat content.** *Food Funct* RSC Publishing 2013.
94. Jiménez Vargas J. Macarulla J. Ma. F de los. **Fisicoquímica Fisiológica (Quinta edición).** *Importecnica, S.A.* 1979.
95. Ojeda, Rodrigo. **Ferritina: estructura y función** 2010, Disponible en: <https://es.slideshare.net/dodo0620/ferritinaestructura-y-funcion>
96. UPV. **Práctica 6: Análisis de contaminates mediante técnicas de resonancia magnética nuclear, gases/masas e infrarrojo.**
97. F.O.M.S. Abreu, C. Bianchini, M.M.C. Forte, T.B.L. Kist. **Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behaviour of alginate– chitosan hydrogels.** *Carbohydr Polym* 74 2008, 283–289.

ANEXOS

Comparación del contenido medio de hierro real del Fantoma biológico con la concentración medida por RM.

Fantoma biológico 1

Comparación *t*-Student pareada

```
. ttest Fe_True == RatioC_ if Fantoma ==1
```

```
Paired t test
```

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
Fe_True	8	70	17.32051	48.98979	29.04351	110.9565
RatioC_	8	151.5	18.39352	52.02472	108.0062	194.9938
diff	8	-81.5	4.602018	13.01647	-92.38204	-70.61796

```
mean(diff) = mean(Fe_True - RatioC_)          t = -17.7096
Ho: mean(diff) = 0                            degrees of freedom = 7
Ha: mean(diff) < 0          Ha: mean(diff) != 0          Ha: mean(diff) > 0
Pr(T < t) = 0.0000          Pr(|T| > |t|) = 0.0000          Pr(T > t) = 1.0000
```

Modelo de regresión lineal.

```
regress Fe_True RatioC_ if Fantoma==1
```

Source	SS	df	MS	Number of obs = 8		
Model	15760.4983	1	15760.4983	F(1, 6)	=	90.97
Residual	1039.50174	6	173.25029	Prob > F	=	0.0001
Total	16800	7	2400	R-squared	=	0.9381
				Adj R-squared	=	0.9278
				Root MSE	=	13.162

Fe_True	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
RatioC_	.9120659	.0956265	9.54	0.000	.6780763	1.146055
_cons	-68.17798	15.21649	-4.48	0.004	-105.4114	-30.94458

Fantoma biológico 2

Comparación t-Student pareada

. ttest Fe_True == RatioC_ if Fantoma ==2

Paired t test

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]
Fe_True	12	161.6667	50.35982	174.4515	50.825446 272.5079
RatioC_	12	121.0358	20.30244	70.3297	76.3504 165.7211
diff	12	40.63091	38.84135	134.5504	-44.85832 126.1201

mean(diff) = mean(Fe_True - RatioC_) t = 1.0461
 Ho: mean(diff) = 0 degrees of freedom = 11
 Ha: mean(diff) < 0 Ha: mean(diff) != 0 Ha: mean(diff) > 0
 Pr(T < t) = 0.0000 Pr(|T| > |t|) = 0.3180 Pr(T > t) = 0.1590

Modelo de regresión lineal.

regress Fe_True RatioC_ if Fantoma==2

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	12
Model	165932.483	1	165932.483	F(1, 10)	=	9.83
Residual	168834.183	10	16883.4183	Prob > F	=	0.0106
Total	334766.667	11	30433.3333	R-squared	=	0.4957
				Adj R-squared	=	0.4452
				Root MSE	=	129.94

Fe_True	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
RatioC_	1.746347	.5570512	3.13	0.011	.5051599 2.987535
cons	-49.7038	77.15457	-0.64	0.534	-221.6149 122.2073

Fantoma biológico 3

Comparación *t*-Student pareada

```
. ttest Fe_True == RatioC_ if Fantoma ==3
```

```
Paired t test
```

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
Fe_True	8	70	17.32051	48.98979	29.04351	110.9565
RatioC_	8	122.6916	18.61257	52.6443	78.67988	166.7034
diff	8	-52.69162	2.916771	8.249873	-59.58868	-45.79455

```

      mean(diff) = mean(Fe_True - RatioC_)          t = -18.0651
Ho: mean(diff) = 0                                degrees of freedom =      7
Ha: mean(diff) < 0      Ha: mean(diff) != 0      Ha: mean(diff) > 0
Pr(T < t) = 0.0000      Pr(|T| > |t|) = 0.0000      Pr(T > t) = 1.0000

```

Modelo de regresión lineal.

```
regress Fe_True RatioC_ if Fantoma==3
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	8
Model	16445.5378	1	16445.5378	F(1, 6)	=	278.37
Residual	354.462157	6	59.0770262	Prob > F	=	0.0000
Total	16800	7	2400	R-squared	=	0.9789
				Adj R-squared	=	0.9754
				Root MSE	=	7.6862

Fe_True	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
RatioC_	.9207116	.0551835	16.68	0.000	.7856826	1.055741
_cons	-42.9636	7.295543	-5.89	0.001	-60.81515	-25.11205

Fantoma biológico 4

Comparación *t*-Student pareada

. ttest Fe_True == RatioC_ if Fantoma ==4

Paired t test

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
Fe_True	10	94	21.09239	66.69999	46.2857	141.7143
RatioC_	10	145.3123	19.667	62.19252	100.8224	189.8021
diff	10	-51.31228	5.48794	17.3476	-63.72201	-38.90255

mean(diff) = mean(Fe_True - RatioC_) t = -9.3537
 Ho: mean(diff) = 0 degrees of freedom = 9
 Ha: mean(diff) < 0 Ha: mean(diff) != 0 Ha: mean(diff) > 0
 Pr(T < t) = 0.0000 Pr(|T| > |t|) = 0.0000 Pr(T > t) = 1.0000

Modelo de regresión lineal.

. regress Fe_True RatioC_ if Fantoma==4

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	10
-----+-----				F(1, 8)	=	112.29
Model	37377.1645	1	37377.1645	Prob > F	=	0.0000
Residual	2662.83554	8	332.854443	R-squared	=	0.9335
-----+-----				Adj R-squared	=	0.9252
Total	40040	9	4448.88889	Root MSE	=	18.244

Fe_True	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
-----+-----						
RatioC_	1.0362	.097784	10.60	0.000	.8107101	1.261691
_cons	-56.57265	15.33582	-3.69	0.006	-91.9371	-21.2082

Variabilidad de la concentración de hierro estimado por RM entre los diferentes Fantomas biológicos

Modelo de regresión lineal.

```
. regress RatioC_ Fe_True if NumTubo <9
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	32
Model	83999.0255	1	83999.0255	F(1, 30)	=	125.38
Residual	20098.571	30	669.952368	Prob > F	=	0.0000
Total	104097.597	31	3357.98698	R-squared	=	0.8069
				Adj R-squared	=	0.8005
				Root MSE	=	25.883

RatioC_	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
Fe_True	1.118028	.0998475	11.20	0.000	.9141116 1.321943
_cons	43.95545	8.353844	5.26	0.000	26.89462 61.01627

Variación de las señales por RM en el Fantoma orgánico.

Señal Media Agua

Modelo estadístico de efectos mixtos.

```
. mixed MediaUra_ Time Ura_True
```

Mixed-effects ML regression	Number of obs	=	192
	Wald chi2(2)	=	17.67
Log likelihood = -1517.3268	Prob > chi2	=	0.0001

MediaUra_	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
Time	13.63914	20.61345	0.66	0.508	-26.76248 54.04075
Ura_True	17.53802	4.2245	4.15	0.000	9.258154 25.81789
_cons	-1981.86	788.434	-2.51	0.012	-3527.163 -436.5582

Random-effects Parameters	Estimate	Std. Err.	[95% Conf. Interval]
var(Residual)	428313.5	43714.57	350660.1 523163.2

Anexos

```
. mixed MediaUra_ Time Ura_True if Time<8

Mixed-effects ML regression      Number of obs   =      168
                                Wald chi2(2)     =      111.60
Log likelihood = -1161.7876      Prob > chi2     =      0.0000
-----+-----
MediaUra_ |      Coef.  Std. Err.  z      P>|z|   [95% Conf. Interval]
-----+-----
      Time | -17.89732   9.405879   -1.90  0.057   -36.3325    .537862
      Ura_True |  17.48417   1.682575   10.39  0.000    14.18638   20.78195
      _cons | -1877.288  314.1057   -5.98  0.000  -2492.924  -1261.652
-----+-----

Random-effects Parameters | Estimate Std. Err. [95% Conf. Interval]
-----+-----
      var(Residual) | 59452.21 6486.768 48005.87 73627.78
-----+-----
```

Señal T2*

Modelo estadístico de efectos mixtos.

```
. mixed MediaT2S_ Time Fe_True

Mixed-effects ML regression      Number of obs   =      192
                                Wald chi2(2)     =      330.83
Log likelihood = -581.74958      Prob > chi2     =      0.0000
-----+-----
MediaT2S_ |      Coef.  Std. Err.  z      P>|z|   [95% Conf. Interval]
-----+-----
      Time |  .383631   .1577325   2.43  0.015   .0744809   .692781
      Fe_True | -.0190728   .0010581  -18.03  0.000  -.0211466  -.0169989
      _cons |  15.9564   .9562026   16.69  0.000   14.08228   17.83052
-----+-----

Random-effects Parameters | Estimate Std. Err. [95% Conf. Interval]
-----+-----
      var(Residual) | 25.07859 2.559573 20.53183 30.63222
-----+-----
```

```

. mixed MediaT2S_ Time Fe_True if Time<8
Mixed-effects ML regression      Number of obs      =       168
                                Wald chi2(2)       =       364.18
Log likelihood = -469.74115      Prob > chi2      =       0.0000
-----+-----
MediaT2S_ |      Coef.  Std. Err.   z    P>|z|   [95% Conf. Interval]
-----+-----
      Time |  -.1072173  .1528972  -0.70  0.483  -.4068903   .1924558
      Fe_True | -.0170735  .0008953 -19.07  0.000  -.0188282  -.0153188
      _cons |  16.42929   .81727   20.10  0.000   14.82747   18.03111
-----+-----

Random-effects Parameters | Estimate  Std. Err. [95% Conf. Interval]
-----+-----
      var(Residual) |  15.70972  1.714071  12.68512  19.45549
-----+-----

```

Concentración de Hierro Hepático (CHH)

Modelo estadístico de efectos mixtos.

```

. mixed RatioDPT2_ Time Fe_True
Mixed-effects ML regression      Number of obs      =       191
                                Wald chi2(2)       =       303.48
Log likelihood = -978.49812      Prob > chi2      =       0.0000
-----+-----
RatioDPT2_ |      Coef.  Std. Err.   z    P>|z|   [95% Conf. Interval]
-----+-----
      Time | -2.157711  1.287166 -1.68  0.094  -4.680509   .3650872
      Fe_True | .1498078  .0086302 17.36  0.000   .1328929   .1667228
      _cons |  26.11261  7.754734  3.37  0.001   10.91361   41.31161
-----+-----

Random-effects Parameters | Estimate  Std. Err. [95% Conf. Interval]
-----+-----
      var(Residual) | 1649.416 168.7829  1349.67  2015.732
-----+-----

```

Señal Media de grasa

Modelo estadístico de efectos mixtos.

```
. mixed MediaGrasa_ Time G_true

Mixed-effects ML regression           Number of obs   =          192
                                      Wald chi2(2)     =       1015.87
Log likelihood = -1100.9869           Prob > chi2     =          0.0000
-----+-----
MediaGrasa_ |      Coef.  Std. Err.   z    P>|z|  [95% Conf. Interval]
-----+-----
      Time | -5.46131   2.357275  -2.32  0.021  -10.08148  -0.841135
      G_true | 15.35687   .4830977  31.79  0.000   14.41002  16.30373
      _cons | 56.65506  13.93586   4.07  0.000   29.34127  83.96885
-----+-----
Random-effects Parameters | Estimate  Std. Err.  [95% Conf. Interval]
-----+-----
      var(Residual) | 5601.2    571.6701   4585.701   6841.581
-----+-----
```

```
. mixed MediaGrasa_ Time G_true if Time<7

Mixed-effects ML regression           Number of obs   =          144
                                      Wald chi2(2)     =       892.32
Log likelihood = -821.57403           Prob > chi2     =          0.0000
-----+-----
MediaGrasa_ |      Coef.  Std. Err.   z    P>|z|  [95% Conf. Interval]
-----+-----
      Time | -8.678571  3.547735  -2.45  0.014  -15.632  -1.725139
      G_true | 16.13389   .5419255  29.77  0.000   15.07173  17.19604
      _cons | 53.72083  16.03037   3.35  0.001   22.30188  85.13978
-----+-----
Random-effects Parameters | Estimate  Std.Err.  [95% Conf. Interval]
-----+-----
      var(Residual) | 5286.298  622.9962   4196.01   6659.884
-----+-----
```

```

. mixed MediaGrasa_ Time G_true if Time>1

Mixed-effects ML regression      Number of obs      =      168
                                Wald chi2(2)         =     1068.98
Log likelihood = -946.4869       Prob > chi2         =      0.0000
-----+-----
MediaGrasa_ |      Coef.  Std. Err.  z      P>|z|  [95% Conf. Interval]
-----+-----
      Time | -4.286458  2.611129  -1.64  0.101  -9.404178   .8312614
      G_true |  15.2525   .467093  32.65  0.000  14.33701   16.16799
      _cons |  51.17158  15.71024  3.26  0.001  20.38008   81.96307
-----+-----

Random-effects Parameters | Estimate  Std. Err.  [95% Conf. Interval]
-----+-----
      var(Residual) |  4581.694  499.9038   3699.58  5674.137
-----+-----

```

Concentración de Grasa Hepática (FF)

Modelo estadístico de efectos mixtos.

```

. mixed MediaFF_ Time FF_true

Mixed-effects ML regression      Number of obs      =      192
                                Wald chi2(2)         =     1511.33
Log likelihood = -584.94371     Prob > chi2         =      0.0000
-----+-----
MediaFF_ |      Coef.  Std. Err.  z      P>|z|  [95% Conf. Interval]
-----+-----
      Time | -.25687   .1603785  -1.60  0.109  -.5712062   .0574661
      FF_true |  2.553354  .0657356  38.84  0.000  2.424515   2.682194
      _cons | -3.327314  .9481342  -3.51  0.000  -5.185623  -1.469005
-----+-----

Random-effects Parameters | Estimate  Std. Err.  [95% Conf. Interval]
-----+-----
      var(Residual) |  25.92704  2.646168   21.22646  31.66857
-----+-----

```

Correlación de la concentración de hierro y grasa por RM medida en el Fantoma orgánico, por diferentes métodos de RM.

Comparación RM de Osatek SEDIA y de Wood

Modelo de correlación-regresión lineal bivalente

-> etiqueta = 1

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	
Model	44653.8527	1	44653.8527	F(1, 6)	=	749.13
Residual	357.647331	6	59.6078884	Prob > F	=	0.0000
Total	45011.5	7	6430.21429	R-squared	=	0.9921
				Adj R-squared	=	0.9907
				Root MSE	=	7.7206

μmolg	Coef.	Std. Err.	T	P> t	[95% Conf. Interval]
Constata	.8640604	.0315694	27.37	0.000	.7868128 .9413079
_cons	-22.76897	5.830698	-3.91	0.008	-37.03617 -8.501767

Comparación RM de Osatek SEDIA y de Garbowski

Modelo de correlación-regresión lineal bivalente

-> etiqueta = 1

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	
Model	44286.706	1	44286.706	F(1, 6)	=	366.61
Residual	724.793995	6	120.798999	Prob > F	=	0.0000
Total	45011.5	7	6430.21429	R-squared	=	0.9839
				Adj R-squared	=	0.9812
				Root MSE	=	10.991

μmolg	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
Truncation	.6753704	.0352726	19.15	0.000	.5890615 .7616792
_cons	-23.05353	8.340394	-2.76	0.033	-43.46173 -2.645317

Comparación RM secuencia PDFF y método Folch

Modelo de correlación-regresión lineal bivalente

```
regress Folch meanFF
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	
Model	77052.8998	1	77052.8998	F(1, 2)	=	2919.21
Residual	52.7901595	2	26.3950798	Prob > F	=	0.0003
Total	77105.69	3	25701.8967	R-squared	=	0.9993
				Adj R-squared	=	0.9990
				Root MSE	=	5.1376

Folch	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
meanFF	10.03518	.1857342	54.03	0.000	9.236026 10.83433
_cons	-10.36466	4.841283	-2.14	0.166	-31.19502 10.4657

Correlación de la concentración de hierro y grasa por RM medida en pacientes, por diferentes métodos de RM.

Pacientes hierro entre Osatek y Wood

Modelo de correlación-regresión lineal bivalente

```
. by etiqueta, sort : regress umolg Constate
```

```
-> etiqueta = 0
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	
Model	75602.3078	1	75602.3078	F(1, 39)	=	357.24
Residual	8253.62468	39	211.631402	Prob > F	=	0.0000
Total	83855.9325	40	2096.39831	R-squared	=	0.9016
				Adj R-squared	=	0.8991
				Root MSE	=	14.548

umolg	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
Constate	.6972158	.0368884	18.90	0.000	.622602 .7718296
_cons	-6.418748	3.817182	-1.68	0.101	-14.13973 1.302232

Pacientes hierro entre Osatek y Garbowski

Modelo de correlación-regresión lineal bivalente

```
. by etiqueta, sort : regress umolg Truncation
```

```
-> etiqueta = 0
```

```
-----+-----
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	
Model	75046.8149	1	75046.8149	F(1, 39)	=	332.25
Residual	8809.11756	39	225.874809	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.8949
				Adj R-squared	=	0.8923
Total	83855.9325	40	2096.39831	Root MSE	=	15.029

```
-----+-----
```

umolg	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
Truncation	.7035475	.0385977	18.23	0.000	.6254763 .7816187
_cons	-14.3911	4.312711	-3.34	0.002	-23.11438 -5.667821

```
-----+-----
```

Pacientes con grasa entre secuencia PDFF de RM y método Folch

Modelo de correlación-regresión lineal bivalente

```
regress Folch MediaFF_1 if Pax ==1
```

```
-----+-----
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	
Model	334309.101	1	334309.101	F(1, 126)	=	656.66
Residual	64147.4977	126	509.107125	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.8390
				Adj R-squared	=	0.8377
Total	398456.599	127	3137.45354	Root MSE	=	22.563

```
-----+-----
```

Folch	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
MediaFF_1	4.589865	.1791143	25.63	0.000	4.235403 4.944327
_cons	-5.16023	4.063838	-1.27	0.206	-13.20245 2.881986

```
-----+-----
```


(c) 2020 Coloma Álvarez de Eulate López