

UNIVERSITAT DE VALENCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Cirurgia



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado 3042 - MEDICINA - 444 Tumores cerebrales: estudio  
genético e inmunohistoquímico

---

PERFILES METABÓLICOS IN VIVO Y EX VIVO: APOYO AL DIAGNOSTICO Y  
MANEJO CLÍNICO DE GLIOMAS

---

D. Vicente Rovira Lillo

Directores:

Dr. D. Guillermo García March

Dr. D. Bernardo Celda Muñoz

Dr. D. José Piquer Belloch

Valencia, 2017



D. GUILLERMO GARCIA MARCH. , Profesor Titular de Neurocirugía del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de Valencia; D. BERNARDO CELDA MUÑOZ, Catedrático de Química Física del Departamento de Química Física de la Universitat de Valencia y D. JOSE PIQUER BELLOCH, Profesor Titular de Neuroanatomía y Neurocirugía de la Universidad CEU-Cardenal Herrera de Valencia.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Perfiles metabólicos in vivo y ex vivo: apoyo al diagnóstico y manejo clínico de gliomas”, realizado bajo nuestra dirección en este departamento por D. Vicente Rovira Lillo , licenciado en Medicina y Cirugía por la Universitat de Valencia, reúne a nuestro juicio los requisitos necesarios para su presentación y defensa pública para optar al título de Doctor en Medicina.

Y para que así conste y obre a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado a 18 de Enero de 2017.

Fdo: Prof. Dr. D. G. García March

Fdo: Prof. Dr. D. Bernardo Celda Muñoz

Fdo: Prof. Dr. D. José Piquer Belloch



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero en especial agradecer a mi director Bernardo por sus aportaciones y ayuda desinteresada en el desarrollo de este trabajo doctoral , así como a su equipo de la Facultad de Químicas de Valencia.

Gracias a los Profesores Guillermo y José por alentar el inicio de este trabajo y proporcionar el sustrato para su posterior desarrollo.

Al resto de compañeros del servicio de neurocirugía del Hospital de la Ribera por su apoyo constante.

Y gracias en especial a mi familia por su comprensión en los momentos en los que sin su soporte esta Tesis no hubiese sido posible.



## **TÍTULO**

PERFILES METABÓLICOS IN VIVO Y EX VIVO: APOYO AL DIAGNOSTICO Y MANEJO CLÍNICO DE GLIOMAS

## **AUTOR**

VICENTE ROVIRA LILLO.

Licenciado en Medicina y Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia  
Médico especialista en Neurocirugía  
Servicio Neurocirugía. Hospital Universitario La Ribera

## **DIRECTOR**

D. GUILLERMO GARCIA MARCH.

Médico especialista en Neurocirugía  
Profesor Titular .Departamento Neurocirugía . Facultat de Medicina i Odontología.  
Universitat de Valencia.

## **CODIRECTORES**

D. JOSE VICENTE PIQUER BELLOCH.

Médico especialista en Neurocirugía.  
Profesor. Departamento de Anatomía. Facultad de Medicina. Universidad CEU  
Cardinal Herrera.

D. BERNARDO CELDA MUÑOZ

Doctor en Ciencias Químicas.  
Catedrático de Química Física. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de  
Valencia

## **CENTRO DE REALIZACIÓN**

Servicio de Neurocirugía Hospital Universitario La Ribera. Alzira  
Departamento Química-Física, Universitat de València.



## ABREVIATURAS

<b>GBM</b>	Glioblastoma Multiforme
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>TAC</b>	Tomografía Axial Computerizada
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>RMNF</b>	Resonancia Magnética Nuclear Funcional
<b>SPECT</b>	Tomografía computerizada de Emisión Monofotónica
<b>CAD's</b>	Diagnóstico por Espectroscopía asistido por Computadora
<b>ERMN</b>	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear
<b>HR-MAS</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Ángulo Mágico
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>ERMNi</b>	Espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear de Imagen
<b>MRM</b>	Microscopia de Resonancia Magnética
<b>MRS</b>	Magnetic Resonance Spectroscopy
<b>RMI</b>	Resonancia Magnética de Imagen
<b>TBS</b>	Tampón de Fosfato Salino
<b>MO</b>	Microscopía Óptica
<b>H&amp;E</b>	Hematosilina Eosina



PERFILES METABÓLICOS IN VIVO Y EXVIVO: APOYO AL DIAGNÓSTICO Y MANEJO CLÍNICO DE GLIOMAS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
1.1 Astrocitomas cerebrales alto grado	15
1.2 Hallazgos radiológicos Astrocitomas alto grado	17
1.3 Anotaciones acerca de la biología molecular	20
1.3.1 Alteraciones de genes localizados en el Cromosoma	20
1.3.2 Alteraciones de la vía TP53/MDM2/P14 <sup>arf</sup>	23
1.3.3 Alteraciones de la vía p16 <sup>ink4</sup> /RBI/ CDK4	24
1.3.4 Alteraciones en el gen EGFR	25
1.3.5 Factores de crecimiento y angiogénicos sobreexpresados en glioblastomas	26
1.3.6 Perspectivas futuras	27
1.4 Enfoque del tratamiento	28
1.4.1 Tratamiento Quirúrgico	28
1.4.2 Quimioterapia	29
1.4.3 Rol de la Radioterapia	30
1.4.4 Tratamiento de soporte	30
1.4.5 Tratamiento con quimioterápicos wafers de carmustina	31
1.4.6 Uso de las Citotoxinas	32
1.4.7 Quimioterapia Intraarterial	33
1.4.8 Terapia Antiangiogénica	33
1.5 Pronóstico de los pacientes con Glioblastoma	35
1.6 Bases biofísicas y bioquímicas de la ERM <sup>1</sup> H	37
1.6.1 Biofísica	37
1.6.1.1 Bases biofísicas. Ley de Lamor.	37
1.6.1.2 Aspectos adicionales Gliomas	39
1.6.1.2.1 Selección del área a estudiar	39
1.6.1.2.2 Homogenización del área a estudiar	39
1.6.1.2.3 Supresión de la señal del agua	39
1.6.1.2.4 Obtención del espectro del voxel seleccionado. Constitución del espectro	40
1.6.1.2.5 Influencia del tiempo de eco sobre el espectro	40
1.6.1.2.6 Secuencias de voxel único frente a secuencias Multivoxel	41
1.6.1.2.7 CADS. Sistemas de apoyo al diagnóstico radiológico automatizado de tumores cerebrales	43
1.6.2 Metabolitos presentes en los espectros de tumores	44

1.7	ERM <sup>1</sup> H en el estudio de tumores cerebrales	47
1.7.1	Antecedentes	
1.7.2	Interés de la ERM <sup>1</sup> H en el diagnóstico de tumores cerebrales	47
1.7.3	Limitaciones en la correlación entre ERM <sup>1</sup> H y anatomía Patológica	48
1.7.4	Diferenciación parénquima cerebral normal / tumor	49
1.7.5	Tumores gliales. Diferenciación del grado de tumor	50
1.7.5.1	Incremento de los compuestos derivados de la colina con el grado tumoral	50
1.7.5.2	Papel del lactato en la gradación de tumores	51
1.7.5.3	Papel de los lípidos en la gradación de tumores	51
1.7.5.4	Papel del Mio-Inositol y la glicina en la gradación de tumores	51
1.8	HR-MAS (Espectroscopia de resonancia magnética de alta resolución con giro a ángulo mágico)	52
1.8.1	Diferenciación tumor glial / metástasis	53
1.9.	Desarrollo ERMi en el diagnóstico de Gliomas	54
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>59</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>63</b>
3.1.	USO DE NUEVO PROTOCOLO DE RMN ESPECTROSCÓPICA IN VIVO PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE LOS DIFERENTES TUMORES GLIALES	64
3.1.1.	Desarrollo y Evaluación se un Sistema de Apoyo al Diagnóstico Clínico (CADS) de tumores del SNC mediante ERM	67
3.1.2.	Imágenes nosológicas en el diagnóstico diferencial entre lesiones solitarias de Glioblastoma y Metástasis	73

3.2. RMN EX VIVO (HR-MAS)	77
3.2.1. Correlación del perfil metabólico mediante HR-MAS de la muestra de biopsia cerebral y tipo de tejido tumoral	77
3.2.2. Clasificación metabólica ex vivo (HR-MAS) de tumores del SNC	80
3.3. DESARROLLO DE LA MICROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA (MRM) COMO SOPORTE AL DIAGNÓSTICO DE GLIOMAS CEREBRALES	84
<b>4. RESULTADO Y DISCUSION</b>	<b>87</b>
4.1. ESPECTROSCOPIA de RMN IN VIVO (ERMN)	87
4.1.1.- Diseño y aplicación de un nuevo protocolo de ERMN para el diagnóstico diferencial entre tumores gliales	87
4.1.2.- Desarrollo y evaluación de un Sistema de Apoyo al Diagnóstico Clínico (CADS) de tumores del SNC mediante ERM	100
4.1.3.- Imágenes nosológicas en el diagnóstico diferencial entre lesiones solitarias de GBM y metástasis	114
4.2 PERFIL METABÓLICO EX VIVO MEDIANTE HR-MAS	130
4.2.1 Correlación del perfil metabólico mediante HR-MAS de la muestra de biopsia cerebral y la localización Tumoral	130
4.2.2 Clasificación metabólica ex vivo (HR-MAS) de tumores del SNC	140
4.3. DESARROLLO DE LA MICROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA (MRM) COMO SOPORTE AL DIAGNÓSTICO DE GLIOMAS CEREBRALES	142
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>151</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>155</b>



## **1.INTRODUCCIÓN**

### **1. 1. ASTROCITOMAS CEREBRALES ALTO GRADO**

El glioblastoma multiforme es el tumor primario más frecuente en el sistema nervioso central, siendo uno de los tumores malignos más complejos de tratar. De hecho en las últimas siete décadas solo a aumentado en 7 meses la supervivencia. Son tumores con difícil tratamiento quimioterápico por la pobre penetrancia a través de la Barrera Hematoencefálica. Durante mucho tiempo se ha considerado que el tratamiento del glioblastoma multiforme (GBM) es de índole paliativo, sin esperanza de cura, convirtiéndose en una patología de alta mortalidad (1,2).

El glioblastoma multiforme ocurre más frecuentemente en africanos, latinos y asiáticos; se pueden diferenciar básicamente dos tipos de glioblastoma: el glioblastoma de novo o primario, que se manifiesta tardíamente con una media de 55 años y una historia clínica de corta duración y el glioblastoma secundario, que afecta principalmente a personas jóvenes con una media de 40 años y es un glioblastoma, originado de la progresión histológica de una lesión de menor grado (II,III) hasta grado IV. La evidencia (3,4,5) ha revelado que en estos dos tipos de glioblastomas tienen diferentes vías genéticas de desarrollo.

En Occidente el glioblastoma multiforme se constituye en el tumor primario del sistema nervioso más frecuente, con alrededor de 3/100.000 personas nuevas diagnosticadas al año, representando más del 51% de todos los gliomas. La Organización Mundial de la Salud establece su diagnóstico basada sobre sus características histológicas, correlacionado au vez con el pronóstico y la supervivencia.

El glioblastoma que representa en la clasificación de la OMS el astrocitoma grado IV es el más agresivo (6,7,8)

Muchos glioblastomas se originan de forma esporádica excepto los asociados a entidades como el síndrome de Turcot o síndrome de Li-Fraumeni. Se han estudiado factores como el tabaco, la dieta, la radiación ionizante, teléfonos móviles, exposición a campos electromagnéticos, estatus socioeconómico y nivel educativo, como también factores de riesgo médicos como alergias, estatus inmunológico e infecciones virales. No ha surgido evidencia de ninguna de las anteriores excepto la exposición a radiaciones ionizantes. Es importante mencionar que pacientes jóvenes y con un alto porcentaje en la escala de Karnofsky al momento del diagnóstico se asocia con mayor supervivencia (9,10)

Resulta interesante que el estudio CE3 realizado por el Instituto Nacional de Cáncer de Canadá y la organización Europea para la investigación y el tratamiento del cáncer haya mostrado el beneficio de la terapia adyuvante con el uso concomitante de temozolamida y radioterapia seguida por uso de seis meses de temozolamida. La aplicación terapéutica de la temozolamida a la radioterapia se asoció con un incremento de hasta 2,5 veces en la tasa de supervivencia a los dos años, la supervivencia se incrementó en 2,5 meses y la reducción relativa del riesgo de muerte en 37%.

Histológicamente los glioblastomas presentan múltiples patrones arquitecturales y citológicos que están en correlación con su apellido de multiforme. Independientemente de tipo de glioblastoma, el origen de la célula es glial, sin embargo este puede originarse sobre tejido glial astrocitario, oligodendroglial o ependimario. Los tumores varían en un espectro de células monomórficas (incluso pequeñas) hasta células muy pleomórficas con bizarrismo e hiperchromatismo nuclear. Se asocia un incremento de la actividad mitótica, proliferación endotelial vascular de patrón glomeruloide y necrosis, esta última casi siempre en patrón de empalizada. Resulta interesante que a pesar de las propiedades altamente invasivas y proangiogénicas del glioblastoma el hecho de que no metastatiza fuera del sistema nervioso (11, 12,13,14)

El glioblastoma (grado IV de la OMS), conocido también como glioblastoma multiforme, se genera a partir de un astrocitoma difuso o de un astrocitoma anaplásico, pero más frecuentemente se presenta de novo sin manifestación de un precursor menos maligno. Histológicamente, este tumor es un glioma celular anaplásico compuesto por células tumorales astrocíticas, escasamente diferenciadas, generalmente pleomórficas, con atipia nuclear marcada y actividad mitótica enérgica. El glioblastoma secundario es el término empleado para describir un glioblastoma que se desarrolló a partir de un astrocitoma difuso o de un astrocitoma anaplásico.

## **1.2 HALLAZGOS RADIOLÓGICOS ASTROCITOMAS ALTO GRADO**

La TAC y los datos clínicos del paciente, pueden ser suficientes para el diagnóstico certero de un glioma. El uso de material de contraste endovenoso mejora significativamente la agudeza diagnóstica y contribuye a distinguir un tumor intraaxial de otras entidades como la desmielinización, infartos, abscesos intracraneales, granulomas, gliosis, malformaciones vasculares, etcétera.

Aproximadamente el 98 % de los gliomas malignos son detectados por la TAC en el momento de iniciar sus síntomas.

Según algunos autores, el intervalo de tiempo entre un resultado tomográfico negativo y el descubrimiento del tumor en un nuevo estudio con TAC puede variar entre 2 y 9 meses (15). La sospecha de un tumor intracraneal no demostrada por imagen tomográfica, debe ser aclarada con un estudio de RMN.

Es importante describir como hallazgos radiológicos: La cantidad de lesiones, localización, forma, tamaño y márgenes del tumor; presencia de quistes, hemorragias, calcificaciones o necrosis intratumoral, grado de edema peritumoral, existencia de desplazamiento de estructuras de la línea media, captación o no de contraste. Estas características nos pudieran sugerir la composición quística de la lesión y en algunos casos, predecir el pronóstico de ella (15,16,17,18,19,20,21).

La densidad tumoral con respecto al parénquima cerebral puede ser hipodensa, isodensa o hiperdensa. El aspecto más común de todos los tipos de gliomas astrocíticos es hipodenso, pero varía en función de lesiones más o menos malignas. Las lesiones de bajo grado de malignidad habitualmente son de forma regular y bien definidas. El área de baja densidad puede representar la parte sólida del tumor o un componente quístico,

el edema peritumoral es escaso o está ausente y pocas lesiones captan contraste homogéneamente (21,22).

En el caso de los gliomas anaplásicos el área de baja densidad es más irregular y está pobremente definida, el edema se presenta en el 90 % de los casos y puede provocar desplazamiento de estructuras de la línea media y colapso del sistema ventricular ipsilateral al tumor. Pueden captar contraste de forma variable, algunos incluso lo hacen de forma homogénea y simulan la apariencia tomográfica de los meningiomas. Otros gliomas malignos no captan contraste y es posible confundirlos con lesiones de baja malignidad, de ahí la importancia del diagnóstico histológico definitivo en todos los casos de sospecha de astrocitoma de alto grado. En ocasiones los astrocitomas fibrilares de bajo grado y su lento crecimiento se manifiesta como una tumoración con los bordes difusos e irregulares, mientras que el glioblastoma multiforme se presenta con los bordes definidos y bien limitados (15).

La RMN se considera superior a la TAC en el estudio de los tumores neuroepiteliales. Permite detectar tumores no identificados por la tomografía, ofrece mayor detalle morfológico de la lesión, delimita sus bordes, la forma e incluso diferencia las distintas partes quísticas del tumor después del uso de contraste endovenoso (gadolinio). Se asume que una lesión tumoral que no capta contraste es un tumor de bajo grado.

La RMN permite una rápida adquisición de imágenes. Está exenta del uso de yodo y la exposición a radiaciones ionizantes. Es más sensible que la TAC para diferenciar el tejido normal del patológico; evita los artefactos a causa de huesos o superposiciones, por lo que se logra una mejor calidad de imágenes sobre todo de fosa posterior y base de cráneo. En el caso específico del astrocitoma anaplásico, éste se observa hipointenso en T1 e hiperintenso en T2, el tejido tumoral aparece más homogéneo y se realza intensidad tras el uso de agentes de contraste.

Para el diagnóstico del glioblastoma multiforme se considera la prueba de elección y evidencia la variada composición del tumor, así como la distorsión de las estructuras por su efecto masa. La región de necrosis central es hipointensa en T1, el resto de los componentes sólidos del tumor se "encienden" posterior a la administración de contraste. En T2 el tumor se aprecia hiperintenso y el edema peritumoral se observa prolongado en T1 y T2 (18).

El desarrollo de la resonancia magnética angiográfica ha ofrecido imágenes del flujo sanguíneo dentro de los vasos cerebrales sin inyección de agentes de contraste. La RMN y la resonancia magnética de perfusión constituyen métodos no invasivos de medición de importantes variables biomédicas, cada vez con nuevas posibilidades de medición del flujo sanguíneo cerebral y de actividad cerebral.

Nuevas técnicas de RMN imagenológica proveen información adicional en relación con la afección tumoral y la función cortical, así tenemos la RMNF y la RMN espectroscópica. La RMNF se basa en el principio físico de la obtención de imágenes en dependencia del nivel de oxigenación de la sangre. Permite estimar el volumen sanguíneo cerebral en determinadas áreas del tejido, correlacionar el volumen sanguíneo, la microvascularización y el grado patológico de los tumores neuroepiteliales (15). Facilita también el mapeo funcional de áreas elocuentes del cerebro, así como la integración de datos neurofisiológicos, con datos neuroanatómicos y neuropatológicos, obtenidos por la RMN convencional.

La RMNF se ha utilizado para identificar la relación espacial entre el tumor y la corteza elocuente, pues favorece la elección adecuada entre biopsia estereotáxica u operación a "cielo abierto". Todas estas ventajas se ofrecen por la RMNF, que obtiene imágenes simultáneas a la producción de eventos neurofisiológicos (23,24)

Otro proceder funcional lo constituye la SPECT. La funcionabilidad de la SPECT se evalúa en dependencia del grado de captación y eliminación del isótopo utilizado (16).

Existen varios trazadores para el estudio de los tumores cerebrales: tecnecio 99 (Tc 99 m), galio 67, HMPAO, MIBI, etc. Sin dudas, el talio-201 aporta mayor información acerca del grado de malignidad de las lesiones, permite identificar las recidivas de radioterapia y puede diferenciar zonas intratumorales de distinta malignidad quística.

La captación de talio-201 por el tejido enfermo, está relacionada con los cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, el flujo sanguíneo cerebral regional, el metabolismo del tumor y la relación con el mecanismo de la bomba sodio-potasio (marcada analogía con el potasio). Esto permite distinguir tumores de alto y bajo grado de malignidad a través del cálculo de los índices de captación precoz y de retención, de manera que se ha convertido en un predictor histológico de los tumores cerebrales.

Una alta y rápida captación del talio-201 con lenta eliminación (elevado índice de retención), está asociado a tumores malignos muy vascularizados. La rápida eliminación del isótopo con rápida captación inicial se observa en los tumores benignos hipervascularizados (25)

La PET por su parte, proporciona información cuantificada sobre el flujo y el metabolismo cerebral. Utiliza técnicas de tomografía, pero con mayor resolución espacial que la SPECT.

El principio general de las mediciones de la PET requiere un modelo matemático que permita medir el valor del flujo sanguíneo cerebral regional. Este puede ser calculado durante el aumento o disminución de la reactividad del cerebro alrededor del bolo de inyección de la sustancia utilizada (16)

En pacientes con gliomas se ha demostrado una clara relación entre el consumo de glucosa y la malignidad. La PET con fluorodeoxiglucosa [18 F] (FDG) es una técnica que permite medir el grado de utilización de la glucosa por el tejido, parece existir una relación proporcional entre el consumo de glucosa y la malignidad tumoral. Esta afirmación ha permitido determinar tempranamente la degeneración maligna de los gliomas de bajo grado.

La PET también tiene la capacidad de diferenciar la recurrencia clínica de un tumor de la necrosis postradiación, fundamentado en la baja captación de FDG en la radionecrosis y la captación elevada en los tumores recurrentes, por poseer un rango metabólico mayor; ayuda también a diferenciar el tejido tumoral sólido del tejido edematoso, puede localizar estructuras corticales elocuentes y contribuir en el mapeo funcional preoperatorio (15,16,17,18)

En resumen, la PET no es de uso rutinario en la práctica clínica por sus altas implicaciones tecnológicas y su elevado costo, pero posee una trascendencia vital en el conocimiento de la biología tumoral y por tanto, en la terapéutica médico-quirúrgica.

Los resultados de las imágenes no son definitivos como base para la terapia. Los estudios funcionales contribuyen a diferenciar los gliomas de bajo grado de otras entidades como infartos, esclerosis múltiples, panencefalitis esclerosante y linfomas; y los de alto grado, de tumores metastásicos, abscesos cerebrales, etc.

### 1.3. ANOTACIONES ACERCA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

#### 1.3.1 Alteraciones de genes localizados en el cromosoma 10

La alteración más frecuente identificada en glioblastomas es la pérdida de heterocigocidad (LOH) en 10q<sup>58</sup>. La frecuencia de LOH en 10q es similar en GBM1 (70%) y en GBM2 (63%) aunque en GBM1 se ha observado que la pérdida es del cromosoma 10 completo en la mayoría de los casos, mientras que en GBM2 se observa generalmente pérdida de 10q pero no de 10p<sup>27</sup>. En el cromosoma 10 se han identificado varios GST: *PTEN* (homólogo de la tensina y fosfatasa) en 10q23.3, *DMBT1* (supresor de tumores cerebrales malignos) localizado en 10q25.3-q26.1, *FGFR2* (receptor del factor del crecimiento fibroblástico) en la región 10q26 y un gen reparador de ADN, la O<sup>6</sup>-metilguanina-DNAmetiltransferasa (*MGMT*), se localiza en 10q26<sup>49</sup>. Estos GST intervienen en el control del ciclo celular y reparación de ADN. La inactivación de un GST ha de producirse en homocigosis, para que el gen pierda completamente su funcionalidad. En glioblastomas una copia de *PTEN*, *DMBT1*, *FGFR2* y/o *MGMT* se pierde normalmente por LOH 10q y la otra copia del gen está sujeta a mutaciones o a procesos epigenéticos que lo inactivan (26,27,28)

En glioblastomas se han observado alteraciones epigenéticas, que se definen como aquéllas que influyen en la actividad del gen pero no implican cambios en la secuencia del ADN. La principal modificación epigenética en humanos es la metilación de la citosina localizada en los dinucleótidos CpG.

Las mutaciones de *PTEN* son más frecuentes en GBM1 (25%) pero no exclusivas, ya que algunos autores han identificado mutaciones de *PTEN* en GBM2 (4%). Se han identificado alrededor de 78 mutaciones diferentes de *PTEN* en glioblastomas, de las cuales el 12,8% son mutaciones silenciosas, el 32,1% son deleciones o inserciones distribuidas por todos los exones y el 33% son mutaciones con cambio de aminoácido; estas mutaciones se han localizado preferentemente en los exones 1-6 de *PTEN*, región que presenta homología con ciertos dominios de las fosfatasa. *PTEN*, como fosfatasa que es, puede retirar el fosfato del fosfatidil inositol 3 fosfato (PIP3), deteniéndose la señal de crecimiento celular y provocando generalmente una disminución de la actividad celular. Dado que la deleción en homocigosis de *PTEN* es bastante rara, otro mecanismo que se postula para su inactivación es la metilación de su promotor. Las

mutaciones de *PTEN* son más frecuentes en glioblastomas que en astrocitomas anaplásicos (29). Estos datos sugieren que dichas mutaciones constituyen una alteración importante en el desarrollo de gliomas, pudiendo representar un paso molecular necesario en la transformación de gliomas de bajo a alto grado de malignidad.

Las mutaciones de *DMBT1* son bastante escasas en glioblastomas, por lo que la pérdida de función del gen se debe principalmente a una delección en homocigosis; esta alteración ya se observa en astrocitomas de bajo grado. La pérdida de función de *DMBT1* se postula que podría estar sujeta a la metilación en su promotor pero todavía no existen suficientes trabajos que lo permitan afirmar de forma concluyente. También se postula que *FGFR2* podría funcionar como GST, ya que se pierde su expresión en estos tipos de tumores, pero todavía no se conoce muy bien su función en la génesis de los gliomas (26).

El gen *MGMT*, cuya pérdida de expresión suele estar vinculada a hipermetilación, codifica para una proteína reparadora de ADN que actúa eliminando los radicales mutagénicos y citotóxicos en posición O<sup>6</sup> guanina del ADN. Para ello, transfiere estos radicales a la cisteína en una reacción que inactiva a una molécula de *MGMT* por cada lesión reparada. De este modo, la capacidad de reparación de lesiones en el ADN de una célula, depende del número de moléculas de *MGMT* y por tanto de la tasa de síntesis de novo de la misma. La acumulación de mutaciones en gliomas subsecuente a la inactivación de *MGMT* no parece ser aleatoria ya que si bien esta inactivación produce acumulación de mutaciones en el oncosupresor *TP53*, dichas alteraciones son prácticamente inexistentes en otro gen, *TP73*, estrechamente relacionado con *TP53*. Esteller y colaboradores demostraron que la metilación aberrante de *MGMT* producía una mejor respuesta a tratamientos con temozolomida en gliomas. Por lo tanto la ausencia de la proteína o la inactivación del gen es un factor de mal pronóstico debido a que los pacientes que poseen metilación en este gen acumulan más mutaciones, pero a la vez también podría representar un factor predictivo de respuesta a la quimioterapia en este tipo de tumores.

### 1.3.2 Alteraciones de la vía *TP53/MDM2/P14<sup>arf</sup>*

La vía genética *TP53/MDM2/P14<sup>arf</sup>* también está sujeta a alteraciones en glioblastomas y astrocitomas (30,31). Es una vía implicada en respuesta a estrés celular que va a provocar la activación de genes relacionados con el control del ciclo celular, reparación de ADN y apoptosis. *TP53* es un gen que codifica para la proteína p53 que actúa como factor de transcripción (FT) uniéndose a los promotores de genes implicados en la reparación de ADN. En condiciones normales p53 está secuestrado por su represor MDM2 por lo que la proteína no es funcional; cuando la célula entra en división (fase G1-S), MDM2 libera a p53. Este FT va a promover la transcripción de otros genes implicados en reparación de ADN y/o apoptosis. En las células que no presentan alteraciones en esta vía y que poseen su material genético dañado, p53 se une a los promotores que van a activar a genes implicados en la reparación del ADN; sin embargo, si el material genético no puede ser reparado la célula entra en apoptosis antes de dividirse.

Por contra, si la célula posee mutaciones en p53 los daños producidos en el ADN no podrán ser reparados provocando un aumento de la división celular y una disminución en la apoptosis y en las reparaciones del material genético. En esta vía también interviene p14<sup>arf</sup>, esta proteína es un represor de MDM2 cuando no está unida a p53. En caso de que p14<sup>arf</sup> no ejerza su correcta función, va a desencadenar un exceso de MDM2 libre, como consecuencia MDM2 secuestrará en unos niveles mayores a los normales a p53 y como resultado se producirá una mayor acumulación de daños en el ADN. Esta suma de alteraciones conduce a la célula a desencadenar un proceso tumoral. Alrededor del 65% de GBM2 presentan mutaciones en *TP53*; esta alteración molecular también está presente en astrocitomas anaplásicos y astrocitomas de bajo grado de malignidad por lo que se postula que sea un evento temprano en la transformación neoplásica. Las mutaciones en *TP53* frecuentemente encontradas en GBM2 son las transiciones G:C → A:T. Alrededor del 57% de estas transiciones han sido identificadas en los codones 248 y 273 del gen, representando puntos calientes y van a estar sujetos a una mayor tasa de mutación que el resto de los exones(50). Por el contrario, las mutaciones de *TP53* en GBM1 son menos abundantes, no sobrepasando el 28%. Las mutaciones de este gen en los GBM1 están distribuidas por todos los exones sin existir puntos preferenciales a sufrir mutación, y en la mayoría de los casos constituyen

eventos secundarios debido a la inestabilidad genómica durante la progresión del tumor (32).

Por otra parte, se ha observado que alrededor del 10% de GBM1 sufren amplificación de *MDM2*, cuando *TP53* no se encuentra alterado (52), evento bastante infrecuente en GBM2. Se han identificado deleciones en homocigosis de *p14<sup>arf</sup>* en GBM1 y se ha comprobado que alrededor de 1/3 de los astrocitomas de bajo grado presentan metilación en el promotor de *p14<sup>arf</sup>*. Así pues, la inactivación de *p14<sup>arf</sup>* suele ser por deleción en homocigosis en GBM1 y por metilación en GBM2 (33)

Mutaciones en *TP53*, amplificaciones de *MDM2* y/o deleciones y metilaciones de *p14<sup>arf</sup>* son alteraciones moleculares que dan lugar a un acúmulo de otras mutaciones en el ADN, pudiendo originar una muerte celular o una transformación neoplásica.

En un principio se creyó que las mutaciones de *TP53* eran exclusivas de GBM2 por lo que mediante un análisis mutacional de este gen, seríamos capaces de distinguir entre un GBM1 y un GBM2. En la actualidad varios grupos de investigación también han encontrado mutaciones en GBM1 por lo que esta teoría se ha descartado. *Schmidt et al* formulan que la presencia de mutaciones en *TP53* es un factor pronóstico de supervivencia debido a que las mutaciones de este gen ya se encuentran en gliomas de bajo grado, que comportan un mejor pronóstico. Sin embargo, dado que ahora se admite que las mutaciones de *TP53* también están presentes en GBM1, la capacidad predictiva de estas alteraciones debería ser revisada.

### **1.3.3 Alteraciones de la vía *p16<sup>ink4</sup>/RBI/CDK4***

Otra de las vía afectadas en glioblastomas es *p16<sup>ink4</sup>/RBI/CDK4*<sup>32</sup>. *RBI* (gen del retinoblastoma) se localiza en 13q14.2, su proteína es la que controla la transición G1—S en el ciclo celular. Cuando *rb1* no está fosforilado secuestra a E2F, un factor de transcripción que activa genes implicados en la transición G1—S del ciclo celular cuando no está unido a *rb1*. La fosforilación de *rb1* es producida por *CDK4* (ciclina dependiente de la quinasa 4) y la proteína encargada de inhibir a esta ciclina es *p16<sup>ink4</sup>* (inhibidor de la ciclina dependiente de la quinasa 4). La pérdida en homocigosis de *p16<sup>ink4</sup>*, y/o la amplificación de *CDK4* provoca que *rb1* esté continuamente fosforilada y no pueda

unirse a E2F; como resultado se produce una división celular incontrolada. Estas dos alteraciones se encuentran presentes en glioblastomas así como también la metilación del promotor de RB1, aunque esta metilación es más frecuente en GBM2 que en GBM1 (34,35). En astrocitomas de bajo grado, hasta el momento no existen suficientes datos que nos demuestren que existe metilación del promotor de RB1. En astrocitomas anaplásicos es bastante infrecuente la metilación de dicho promotor, por lo que se cree que esta alteración sería un evento tardío en la progresión del astrocitoma a GBM2.

#### **1.3.4 Alteraciones en el gen *EGFR***

Otra de las alteraciones genéticas presentes en glioblastomas es la amplificación del gen codificador del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) (36,37). *EGFR* se localiza en 7p12 y su sobreexpresión génica puede deberse, entre otras alteraciones, a una amplificación en tándem que da lugar a diferentes variantes de la proteína; la más común es la variante EGFRvIII. Esta alteración estructural se debe preferentemente a una delección de 801 pares de bases (p.b.), que abarca desde los exones 2 hasta el 7 y una posterior fusión del resto de los exones, dando lugar a una amplificación en tándem del gen. Ello provoca la síntesis de la proteína con el receptor truncado y constitutivamente activado independientemente del ligando; como resultado la célula comienza a dividirse de forma incontrolada (10). La detección de EGFRvIII por inmunohistoquímica no parece estar relacionada con la supervivencia en los GBM pero sí con los astrocitomas anaplásicos, lo cual sugiere que la detección de EGFRvIII puede ser utilizada para identificar y/o confirmar la identidad de un astrocitoma que se comportaría como un GBM1. La habilidad de las células tumorales para generar estas formas mutantes funcionales de *EGFR* puede contribuir a la capacidad de los gliomas para evadir la quimioterapia, así como las mutaciones presentes en el gen también pueden influir en el pronóstico o el tratamiento a utilizar. La figura 3 ilustra una delección de 18 p.b. del exon 19 de *EGFR* en un GBM1.

Otro de los mecanismos por los que puede existir una sobredosis del gen sería la polisomía del cromosoma 7 que frecuentemente se observa en este tipo de tumores. Por último, la amplificación de *EGFR* ocurre en el 40% de GBM1 siendo abundante en GBM2 (19,61). Inicialmente se pensó que esta alteración era exclusiva de GBM1 con respecto a GBM2 pero con el tiempo otros trabajos han demostrado que en GBM2 también puede existir amplificación de *EGFR* (38,39).

### **1.3.5 Factores de crecimiento y angiogénicos sobreexpresados en glioblastomas**

Para el crecimiento celular se requiere un balance entre los factores angiogénicos y antiangiogénicos. La remodelación de los vasos sanguíneos se inicia por las señales de crecimiento que interactúan con su ligando en la superficie celular. La activación no regulada de la angiogénesis puede ser el paso de una neoplasia benigna a una maligna. Esta hipótesis se ha formulado en gliomas de bajo grado que progresan a glioblastoma multiforme. Uno de los principales estímulos para la síntesis de factores angiogénicos es la hipoxia, que induce la síntesis del factor de crecimiento endotelial (VEGF) (40,41,42). Se considera que el VEGF es el mediador más importante en la neovascularización de gliomas y su expresión aumenta durante el proceso de malignización de los gliomas. VEGF tiene tres receptores (VEGFR-1,2,3), dos de ellos, el VEGFR-1 y el VEGFR-3 están sobreexpresados en las células endoteliales de astrocitomas y oligodendrogliomas anaplásicos así como también en los ependimomas (43)

Hay otros factores de crecimiento que también juegan un papel importante en la génesis y formación de un glioma. En general estos factores de crecimiento interactúan con proteínas tirosín-kinasas para inducir la dimerización, autofosforilación y expresión de sitios de unión para que interactúen las proteínas de señal. El complejo así formado activa una cascada de señales por parte de unas proteínas llamadas transductores de señales y activadores de la transcripción (STATs) que provocará un aumento de la división celular debido a la activación de genes antiapoptóticos y genes que intervienen en la división celular. Los factores de crecimiento que están involucrados en la génesis de un glioma son:

1. EGF (Factor de crecimiento epidérmico): provoca proliferación celular por estimulación autocrina, resistencia a la quimioterapia y aumento de la tumorigenicidad. Su receptor es EGFR.
2. Factor de crecimiento fibroblástico (FGF): provoca proliferación celular por estimulación autocrina y además presenta un efecto sinérgico con VEGF y el factor de crecimiento hepatocítico (HGF) para estimular la angiogénesis. Se ha descrito que existe incremento de FGF y sus receptores en gliomas.

3. VEGF: es el principal mediador de la angiogénesis involucrado en el aumento de edema cerebral y también actúa en la proteólisis de las proteínas de la matriz extracelular.

4. Factor de crecimiento plaquetario (PDGF): potencia a VEGF para estimular la angiogénesis y está involucrado en el aumento de la transcripción de los factores angiogénicos. Suele estar sobreexpresado en gliomas de bajo grado teniendo implicaciones pronósticas.

5. HGF: cuya actividad provoca un aumento de resistencia a la quimioterapia, aumento de la proliferación celular, estimulación de la angiogénesis. Los gliomas de alto grado de malignidad contienen niveles más elevados de HGF que los gliomas de bajo grado o el tejido sano.

6. Factor de crecimiento insulínico (IGF): interviene en la proliferación celular por estimulación paracrina. Se encuentran sobreexpresados en gliomas de bajo grado y otras neoplasias del SNC relacionándose con un proceso de proliferación y disminución de la apoptosis.

### **1.3.6 Perspectivas estudio genético futuras**

La dificultad para obtener tratamientos satisfactorios quizás radique en que los gliomas malignos presentan alteraciones múltiples y donde se encuentran muchas vías genéticas de señalización y control de la proliferación celular implicadas, mostrando mucha heterogeneidad molecular incluso dentro del mismo tumor. Para intentar combatir el desarrollo de estos tumores con tratamientos satisfactorios, son necesarios tratamientos múltiples para abordar todas las vías que se encuentran alteradas. Ello requiere una caracterización molecular de los gliomas para poder establecer el mejor tratamiento en función de las alteraciones y patrón de expresión génica. En un futuro se esperan identificar patrones de expresión molecular en gliomas y de esta forma poder aproximarnos mejor al pronóstico y al tratamiento.

## 1.4 ENFOQUE DEL TRATAMIENTO

El tratamiento actual del glioblastoma multiforme es una combinación de diferentes modalidades de tratamiento, tales como la cirugía, quimioterapia y radiación.

### 1.4.1 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

Uno de los pilares de la neurocirugía oncológica es obtener una sobrevida con una importante resección de la lesión tumoral. Con el advenimiento de nuevas técnicas imagenológicas y un mayor conocimiento neuroanatómico, se ha obtenido una menor morbilidad durante el procedimiento resectivo. El tratamiento estándar aceptado actualmente es cirugía mas radioterapia y quimioterapia con temozolamida. Se realiza radioterapia con planeación tridimensional mediante fraccionamiento de 2 Gy/día, 5 días/semana adjunto temozolamida 75 mg/ m<sup>2</sup>/día por 7 días/semana, las 6 semanas de la radioterapia seguido de temozolamida adyuvante, 6 ciclos de 5 días cada 28 días a 150-200 mg/m<sup>2</sup>/día.

En cuanto a la resección de glioblastoma guiada se evaluó la microcirugía convencional versus la cirugía guiada con ácido aminolevulínico (ALA) para determinar la profundidad de la resección en 408 pacientes con glioblastoma multiforme seguidos de radioterapia, la resección con ALA se asocio con resecciones mayores pero mayor tasa de secuelas neurológicas a las 48 horas de postcirugía (45).

Un estudio que evaluó la relación entre el contenido tumoral de MGMT y la sobrevida sugiere que no hubo beneficio para la sobrevida en los pacientes que sobreexpresaron MGMT.

#### 1.4.2 QUIMIOTERAPIA

El papel de la quimioterapia fue cuestionado antes de la disponibilidad de temozolomida (TMZ). Los fármacos habituales tienen dificultades para alcanzar el tumor a niveles terapéuticos efectivos debido a la existencia de la BHE. Las nitrosoureas, que atraviesan la BHE debido a su liposolubilidad, como carmustina (BCNU, lomustina (CCNU), y procarbazona, un agente alquilante que se combina con CCNU y vincristina en el régimen de combinación PCV, han sido ampliamente utilizadas en los gliomas de alto grado. Sin embargo, nunca se ha demostrado en ensayos aleatorizados que las nitrosoureas mejoren la supervivencia. Con BCNU se había observado un aumento de supervivientes a los 18 meses de los pacientes con GB tratados de forma adyuvante (44). Sin embargo, 3 metaanálisis, uno en 1992, otro en 2003 y el último en el 2007, mostraron un beneficio de supervivencia para los pacientes tratados con quimioterapia tras la cirugía y la irradiación, con un aumento de la supervivencia a los 12 y los 24 meses del 10,1% y el 8,6%, respectivamente y una modesta pero clara disminución del riesgo de muerte del 15%, que se traduce en dos meses de aumento de la mediana de supervivencia para los pacientes tratados con quimioterapia. El beneficio de la quimioterapia se extiende en los metaanálisis a todos los subtipos histológicos, a todos los grupos de edad y a todos los tipos de cirugía .

Desde el año 2005 en que se publicaron los resultados del estudio internacional de la EORTC-NCI Canadá, el tratamiento estándar del GB es la irradiación a dosis de 60 Gy con temozolomida (TMZ) administrada por vía oral diariamente durante 42 (o hasta 49) días y posteriormente 6-12 ciclos de TMZ a dosis de 150-200 mg/m<sup>2</sup>/d durante 5 días cada 28 días. Se recomienda profilaxis para las infecciones oportunistas facilitadas por la linfopenia secundaria a la TMZ y a los corticoides. La mediana de supervivencia según los resultados del estudio fue de 14,6 meses con el tratamiento, frente a 12,1 meses si no se añade la quimioterapia a la radioterapia. Los resultados tras 5 años de seguimiento siguen confirmando un beneficio en supervivencia para el grupo de pacientes tratados con TMZ.

### 1.4.3 ROL DE LA RADIOTERAPIA

La irradiación ha sido el tratamiento estándar en los gliomas de alto grado durante mucho tiempo. Demostró aumentar la supervivencia de 6 a 8 meses ya en los primeros ensayos. La intensificación de la dosis de radiación, los radiosensibilizadores, la radiocirugía, el hiperfraccionamiento etc., no han demostrado mejorar los resultados. La radioterapia postoperatoria (focal, 60Gy, tumor +/- edema con margen) es el tratamiento estándar (Laperriere, Zuraw et al.; 2002). Incluso los pacientes mayores de 70 años con buen estado general se benefician del tratamiento con irradiación (46). En pacientes ancianos o muy afectados neurológicamente, pautas de tratamiento más cortas con hipofraccionamiento de dosis (focal, 40Gy) consiguen un efecto paliativo similar, sin afectar la supervivencia (47).

La radioterapia en ocasiones no se ofrece a pacientes con ‘solo biopsia’ y con compromiso neurológico importante o con grandes masas tumorales que afectan más de un lóbulo cerebral. El tratamiento neo-adyuvante para reducir el tamaño de la enfermedad podría estar indicado en dichos pacientes, pues algunos estudios fase II muestran resultados interesantes.

### 1.4.4 TRATAMIENTO DE SOPORTE

**CORTICOIDES:** La dexametasona se utiliza para disminuir el edema y mejorar los síntomas neurológicos. La dosis utilizada debe ser siempre la mínima necesaria, para evitar los efectos secundarios a largo plazo de los corticoides (hiperglucemia, cushing yatrógeno, miopatía, osteoporosis, fragilidad capilar, etc). Suelen ser necesarios durante la radioterapia (aunque no siempre) y tras la misma para evitar la sintomatología aguda secundaria. Posteriormente deben reducirse las dosis a la mínima dosis posible y si es posible, retirarlos cuanto antes.

ANTICOMICIALES: No existe evidencia de la utilidad de los anticomiciales como profilaxis primaria en pacientes que nunca han presentado crisis. En general se utilizan durante la primera semana post-cirugía y posteriormente se retiran si el paciente no ha presentado crisis. En cualquier caso, se recomiendan los anticomiciales que no producen interferencias con otros fármacos (no inductores del citocromo hepático cp450). Ejemplos de estos fármacos son el levetiracetam, la gabapentina y el ácido valproico.

1.4.5 TRATAMIENTO CON QUIMIOTERÁPICOS OBLEAS DE CARMUSTINA: Los polímeros de liberación controlada han sido diseñados para llevar agentes quimioterapéuticos directamente dentro de los lugares de resección de un glioma maligno. Estos sistemas permiten una exposición local prolongada pero con exposición sistémica limitada.

De manera invariable todos los pacientes con glioblastoma progresan o recurren después del tratamiento, con una media de supervivencia de seis meses después de la recurrencia, a pesar de un tratamiento quimioterapéutico agresivo y esquema de radioterapia. Entre el 80 o 90% de la recurrencia postoperatoria (48).

El desarrollo de polímeros impregnados de BCNU o carmustina que permiten proporcionar altas dosis de quimioterapia en el lecho tumoral al momento de la resección quirúrgica, disminuyéndose así los efectos de la toxicidad sistémica. El gliadel es una de los medicamentos aprobados para el tratamiento del glioblastoma multiforme que está basado en el mecanismo anteriormente mencionado. El otro avance capital fue el desarrollo de la temozolamida, un agente alquilante que penetra la barrera hematoencefálica. La carmustina hace parte de una familia llamada mostaza que ha sido un medicamento quimioterapéutico utilizado en una variedad de tumores malignos tales como astrocitoma, medulblastoma, glioblastoma, mieloma múltiple y linfomas. La carmustina tiene una biodisponibilidad del 5 al 28% y una vida media entre 15 a 30 minutos, debido a sus propiedades lipofílicas y relativa falta de ionización en pH fisiológico. La carmustina cruza en algún grado la barrera hematoencefálica, es importante vigilar el cuadro hemático por los potenciales efectos de mielosupresión. Los ciclos no deben ser dados más frecuentes a seis semanas, además un efecto adverso conocido es la toxicidad a nivel pulmonar enmarcada en fibrosis pulmonar que puede

aparecer desde el noveno día de tratamiento hasta los 43 meses. En la actualidad a pesar de la llegada intersticial de carmustina con los biopolímeros, invariablemente todos los pacientes experimentan recurrencia localmente. Por otro lado, existe interés en la utilización de los biopolímeros en las metástasis cerebrales, más del 30 % de los pacientes con cáncer desarrollan extensión hematológica de la enfermedad al cerebro, en este punto se han realizado algunos estudios donde el gliadel puede ofrecer una ayuda para las alternativas convencionales de tratamiento, pero más estudios deberán realizarse para esclarecer este punto(49).

#### 1.4.6 USO DE CITOTOXINAS

Una nueva aproximación al tratamiento del glioblastoma multiforme es el uso de citotoxinas manipuladas molecularmente. Las citotoxinas recombinantes son dirigidas a las células tumorales de glioblastoma por medio de un ligando o anticuerpo que se une a un receptor internalizado en la membrana plasmática. Entre las citotoxinas ensayadas se encuentran las derivadas de la exotoxina A de *Pseudomonas* (PE38QQR) y la IL-13.

Es importante mencionar aquí en estudio ASPECT, un ensayo que evaluó la eficacia de un vector adenoviral HSV-tk (*Cerepro*) y el ganciclovir sistémico para glioblastoma de diagnóstico nuevo. El fundamento es la capacidad de transferencia del adenovirus sobre la timidinacinasasa e inducir la expresión de la misma y de esta manera se produce una sensibilización al ganciclovir sistémico. Este estudio aleatorizado de 251 paciente concluyó que el *Cerepro* tenía un impacto positivo en la enfermedad, si bien el grupo tratado con *cerepro* presentó algunos síntomas neurológicos tales como hemiparesia, disfasia entre otros cuando en relación al otro grupo.

1.4.7 QUIMIOTERAPIA INTRAARTERIAL: esta técnica basada en la colocación del agente quimioterapéutico en el sistema arterial y tiene la ventaja de incrementar la recaptación durante el primer pasos de la droga a través de los capilares. La administración intraarterial de etoposido se cree que puede alterar de manera transitoria la barrera hematoencefálica. En instituciones americanas como Stony Brook University Hospital en Nueva York desde 1990 se utiliza quimioterapia intraarterial con cisplatino y etoposido administrado previo a la radioterapia en el manejo de pacientes con glioblastoma multiforme. Con sobrevida media de 20 meses es uno de los logros más importantes en cuanto a estrategias de tratamiento. La quimioterapia intraarterial para glioblastoma no ha sido aprobada por la FDA debido a la carencia de ensayos randomizados que comparen esta estrategia con la quimioterapia sistémica (intravenosa) para los tumores cerebrales.

1.4.8. TERAPIA ANGIOGÉNICA: dos diferentes procesos han sido descritos para describir la formación de la vasculatura, la vasculogenesis se refiere al proceso de la formación de vasos sanguíneos primitivos a partir del mesodermo por diferenciación de los angioblastos durante el desarrollo embriogénico. En el siglo pasado se determinó la asociación entre la angiogénesis y el cáncer. Folkman y cols fueron los primeros en mostrar que los tumores para crecer necesitaban la formación de nuevos vasos sanguíneos. La angiogenesis se ha reconocido como pieza clave para la progresión de los gliomas. Entre estos el glioblastoma multiforme se conoce como el más antigénico por mostrar gran proliferación vascular e hiperplasia de células endoteliales, esta hipervasculización es parcialmente responsable de las propiedades de este tumor maligno incluyendo el edema peritumoral resultante de la disrupción de la barrera hematoencefálica. Estos vasos neoformados se han asociado a incremento de riesgo de hemorragia intratumoral y también son responsables del aumento del contraste en las neuroimágenes. La proliferación microvascular es un criterio de diagnóstico que ayuda a distinguir a los astrocitomas de bajo y alto grado y es una propiedad histopatológica del glioblastoma. Aunque es incierta si la proliferación microvascular es la causa del comportamiento de los tumores malignos, la neovascularización en los gliomas se correlaciona de manera positiva con su agresividad biológica, el grado de malignidad y la recurrencia clínica e inversamente con la sobrevida posoperatoria de los pacientes.

La angiogenesis implica una serie de eventos secuenciados que se inician con la expresión de factores angiogenicos con el VEGF con posterior unión a su receptor afín sobre las células endoteliales. El VEGF incrementa la permeabilidad vascular, lo cual conduce a la extravasación de proteínas plasmáticas y alteración de los pericitos. La degradación de la membrana basal vascular y la matrix extracelular ocurre simultáneamente la alteración de esta última involucra a la catepsina B, metaloproteinasas de la matrix y otras enzimas además de la expresión de proteínas de la matrix como la fibronectina, laminina, tenascina-C y vitronectina.

Se conoce igualmente que la homeostasis vascular es gobernada por un balance entre factores antigénicos y antiangiogénicos. Más de 25 factores de crecimiento y citoquinas diferentes se han identificado capaz de inducir angiogenesis. La producción de factores de crecimiento antigénicos es el resultado de alteraciones genéticas o son inducidos por hipoxia.

La familia VEGF que corresponde a los factores de crecimiento vascular y sus receptores son los mediadores más importantes de la angiogenesis en los gliomas. Esta familia VEGF incluye seis glicoproteínas conocidas como VEGF- A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y el factor de crecimiento placentario. El VEGF-A ha sido el mejor caracterizado. La expresión del gen VEGF-A es sobrerregulado por la hipoxia, mediado por la transcripción del factor HIF y el producto de el gen de supresión tumoral de von Hippel-Lindau. Otros son: Angiopoyetinas, factores de crecimiento fibroblasticos, Factor de crecimiento derivados de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico/factor de crecimiento transformante alfa, factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento del hepatocito, interleucina 6 y 8, Factor de crecimiento tumoral alfa, inductor 61 rico en cisteina, factor de crecimiento conectivo tisular y factor de crecimiento relacionado a la insulina 1, integrinas, metaloproteinasas de la matrix, células progenitoras endoteliales, inhibidores angiogenicos endógenos.

En la actualidad están en curso diversos estudios en Fase I usando la perspectiva desde la terapia antiangiogénica para el manejo de los gliomas malignos; las estrategias pueden ir dirigidas a bloqueo de la producción de factores de crecimiento, neurotralización de factores de crecimiento circulante, inhibición y supresión de cascadas relacionadas con

el RTK (receptor de tirosina kinasa). En la actualidad se han reportado datos en relación al Bevacizumab solo o en combinación con el Irinotecan (CPT-11) los cuales han demostrado tasa de respuestas y supervivencia global. Estos fármacos están actualmente bajo investigación y se espera que en un futuro pueden abrir una esperanza basados en esta estrategia terapéutica.

## **1.5 PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES CON GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

En cuanto a la pregunta, si el volumen tumoral está asociado con la supervivencia. Es importante comentar que el astrocitoma anaplasico y el glioblastoma multiforme tienen la tendencia característica de infiltrar microscópicamente tejido cerebral perilesional y está claro que la tomografía cerebral y la resonancia magnética no pueden fácilmente diferenciarla. La mayoría de estudios no ha mostrado efecto directo del volumen tumoral y el pronóstico. Un alto nivel de vascularización ha sido reconocido como indicador de potencial maligno, puesto que este refleja el grado de angiogénesis tumoral, reflejando la relación entre angiogénesis y la habilidad del tumor para alimentarse y aumentar la masa tumoral. En los tumores de alto grado, la proliferación de células endoteliales es un evento clave, en los gliomas de bajo grado este suceso es más bien raro. La densidad de microvasos, un medidor histológico de la vascularidad, ha sido estudiada y se ha demostrado que en los gliomas de bajo grado fue un indicador de supervivencia. En dicho estudio se incluyeron pacientes con gliomas de alto grado. A pesar del tratamiento agresivo multimodal que comprende la resección quirúrgica, quimioterapia local y sistémica, la supervivencia media está en el rango de los doce meses, se ha encontrado un grupo de pacientes, aunque pequeña con supervivencia de más de 36 meses, que son conocidos como los sobrevivientes a largo plazo.

Resulta interesante mencionar a los sobrevivientes a largo plazo, los cuales son raros, y en donde se han identificado diversas variables tamaño del tumor y localización, edad de presentación, estado funcional (Karnofsky) al momento del diagnóstico, hallazgos histológicos, factores genéticos y moleculares. Solo el 2% de los pacientes logra vivir hasta tres años (50)

Diversos estudios han mostrado una relación negativa entre la edad avanzada y la sobrevida postoperatoria, algunos estudio han revelado que los pacientes menores de 40 años sobrevivirán alrededor de 34% a los 5 años comparados con los pacientes mayores de 40 años.

En relación a los pacientes ancianos, ésta ejerce una fuerte influencia negativa sobre la sobrevida, la cual es realmente pobre. Analizando datos del registro de tumores cerebrales en los estados Unidos se revela que las tasas de sobrevida a 1 año están alrededor del 16.9 % en pacientes entre los 65 y 74 años de edad y en 8.2 % en pacientes mayores de 75 años. A los 2 años la tasa de sobrevida disminuye a 2.7 % y 1.3% respectivamente.

Un trabajo reciente propone que los pacientes con glioblastomas multiforme manejados con medicamentos antiepilépticos inductores enzimáticos sobreviven más tiempo, además de ocurrir de manera interesante un enlentecimiento de la progresión de la enfermedad que cuando se comparan con pacientes manejados con otras drogas antiepilépticas, estos inductores enzimáticos son el fenobarbital, fenitoína, carbamazepina y la primidona, los cuales modulan enzimas microsomales como la P450 que mejoran la función de los agentes quimioterapéuticos, siendo este un factor predictivo independiente de supervivencia libre de progresión en gliomas de alto grado.

Se ha conceptualizado también que pacientes con mayores puntajes de Karnofsky pueden tener mejor pronóstico. Es importante definir un concepto reciente conocido como pseudoprogresión, el cual denota la aparente progresión después del tratamiento incluido radioterapia y temozolamida y es mayormente definido por la resonancia magnética posradioterapia. La pseudoprogresión fue inicialmente descrita por Hoffman y Cols. (51) en pacientes con glioblastoma diagnosticado de primera vez y en tratamiento de radioterapia con o sin carmustina. De los pacientes observados experimentaron progresión de la enfermedad después de radioterapia 28 a 51% y del 38 al 33% revelaron mejoría o estabilización de la enfermedad.

## 1.6. BASES BIOFÍSICAS Y BIOQUÍMICAS DE LA ERM<sup>1</sup>H

Con el descubrimiento del fenómeno de la resonancia magnética (RM) se inició la utilización de la espectroscopia por resonancia magnética (ERM) en el campo de la química. En la actualidad, la ERM se utiliza de forma rutinaria para el análisis estructural de los compuestos químicos. Con los avances tecnológicos, la ERM se extendió al campo de la bioquímica como técnica de análisis estructural de macromoléculas y de las interacciones entre moléculas. Hoy en día, estos estudios se pueden realizar en órganos o tejidos de animales y personas “in vivo” (52), con la posibilidad de estudiar de forma directa algunos procesos metabólicos sin interferir en ellos.

Existe un alto número de núcleos atómicos que presentan el fenómeno de resonancia magnética nuclear. La información que se obtiene de cada uno de ellos es diferente. Con mucho, el núcleo más utilizado en el estudio del cerebro ha sido el protón.

### 1.6.1. Biofísica

#### 1.6.1.1. Bases biofísicas. Ley de Larmor.

El fenómeno de la RMN se basa en la propiedad que presentan ciertos núcleos atómicos para absorber selectivamente la energía de radiofrecuencia cuando se someten a un campo magnético. Este exceso energético es liberado por los núcleos mediante un proceso de relajación nuclear. La frecuencia de resonancia de este proceso se denomina frecuencia de precesión ( $f_p$ ), y es directamente proporcional al valor del campo magnético efectivo (B) que percibe el núcleo, según viene definido por la ley de Larmor

$$f_p = \gamma \times B/2\pi$$

En la fórmula de la ley de Larmor  $\gamma$  es la constante giromagnética, constante y característica para cada núcleo. El campo magnético (B) viene determinado por un B externo ( $B_{ext}$ ), constituido por el B producido por el imán y un B interno ( $B_{int}$ ), que

está inducido por cargas en movimiento que forman parte de las diferentes. El  $B_{int}$  siempre se opone al  $B_{ext}$ , por lo que ejerce un efecto de pantalla. Su efecto es que el núcleo perciba un  $B$  inferior al  $B_{ext}$  ( $B = B_{ext} - B_{int}$ ). Es proporcional al  $B_{ext}$  a través de una constante que recibe el nombre de constante de apantallamiento ( $\sigma$ ) ( $B_{int} = \sigma \times B_{ext}$ ). (53)

Dado que  $\sigma$  es constante y que el  $B_{ext}$  también lo será para cada experimento, la  $f_p$  dependerá, en último término, de la  $\sigma$ . Esta constante no depende únicamente del núcleo considerado, sino que será característica para la estructura molecular de su entorno molecular. Así, la  $f_p$  que percibimos será característica de cada compuesto, y la ERM proporcionará la posibilidad de detectar los compuestos que hay en una determinada muestra a partir de la valoración del espectro.

Con mucho, el núcleo más utilizado en el estudio del cerebro ha sido el protón, y se habla de espectroscopía por resonancia magnética de protón (ERM  $^1H$ ).

En una gráfica del dominio de frecuencias, la posición del pico nos identificará el compuesto, y el área bajo la gráfica será proporcional a su concentración. Cabe decir que la frecuencia de precesión de los protones no se representa como unidad de frecuencia (en Hz), sino en partes por millón (ppm). Este valor se obtiene de calcular el desplazamiento químico ( $\delta$ ) del radical en cuestión respecto de un compuesto de referencia según la fórmula:

$$\delta = (f_{pA} - f_{pR}) / f_{pR}$$

Donde  $f_{pA}$  es la  $f_p$  del metabolito a estudio (A) y  $f_{pR}$  es la  $f_p$  del metabolito de referencia (R). En el caso de la ERM $^1H$  este metabolito de referencia es el 3-trimetilsilil[2,2,3,3- $^2H$ ] propionato sódico (TSP).

Una vez obtenido y procesado, se puede extrapolar cada resonancia en el espectro (según su localización) con un metabolito en el tejido, y la cantidad de este compuesto se puede valorar en relación con el área de la resonancia.

## 1.6.1.2. Algunos aspectos adicionales Gliomas

### 1.6.1.2.1. Selección del área a estudiar

Para realizar un estudio de ERM  $^1\text{H}$  “in vivo” tendremos que identificar en un primer momento el área que queremos estudiar y posicionar en ella el “voxel” que nos indica el volumen específico que vamos a estudiar. Para ello realizaremos secuencias de IRM que nos proporcionarán imágenes de referencia .

### 1.6.1.2.2. Homogeneización del área a estudiar

Constituye un paso de especial importancia en la preparación previa a la obtención del espectro. Consiste en modificar los gradientes de manera que el campo magnético externo al que están sometidos los diferentes compuestos sea lo más similar posible. En la fórmula “ $f_p = \gamma \cdot B_{\text{ext}} \cdot (1 - \sigma) / 2 \pi$ ”, si conseguimos que todas las moléculas estén sometidas a un  $B_{\text{ext}}$  idéntico, o muy similar, las diferencias de precesión entre ellas serán debidas únicamente al apantallamiento, o lo que es lo mismo, a su entorno eléctrico. Si el campo magnético no es homogéneo, el  $B_{\text{ext}}$  en una localización “A” será diferente del  $B_{\text{ext}}$  en una localización “B”, y parte de las diferencias en las frecuencias de precesión entre protones de moléculas localizadas en los puntos “A” y “B” serán debidas a la diferencia del  $B_{\text{ext}}$  y no únicamente a diferencias del apantallamiento. Esto dificultaría o, en casos extremos, impediría la identificación del compuesto dado que puede llegar a producir un solapamiento de las resonancias del espectro.

### 1.6.1.2.3. Supresión de la señal del agua

Es otro de los pasos de preparación. Es necesario debido a que el agua es el compuesto más abundante en el parénquima cerebral con mucha diferencia. Su concentración es aproximadamente entre  $10^4$  y  $10^5$  veces la del resto de compuestos, de manera que nos los enmascararía. Existen diferentes métodos para suprimir la señal del agua(55).

#### 1.6.1.2.4. Obtención del espectro del voxel seleccionado. Constitución del espectro

Para obtener la señal del voxel el aparato de resonancia envía una serie de pulsos que excitan selectivamente los  $^1\text{H}$  del área de interés seleccionada, y recibe la señal enviada por los mismos al relajarse, por medio de una antena receptora. Este proceso se repite un número de veces determinado y el resultado final será el promedio de la señal obtenida con todos los pulsos. Con ello, se obtiene una gráfica que nos muestra la evolución de la señal (corriente eléctrica) respecto al tiempo, denominada FID (“free induction decay”).

La información que nos ofrece la FID está constituida por la suma de las sinusoides de relajación de los múltiples protones incluidos en el voxel. Mediante el procesado y análisis de la FID se pretende evaluar el número de sinusoides que la componen y la amplitud de cada uno. El procesado implica TF que permite pasar del dominio tiempo a frecuencia el espectro que analizamos (56)

#### 1.6.1.2.5. Influencia del tiempo de eco sobre el espectro

Para optimizar la adquisición del espectro se pueden variar diferentes parámetros. La modificación de estos parámetros influirá no sólo en la apariencia del espectro, sino también en la información que puede ser extraída. Uno de los más relevantes es el tiempo de eco (TE). En la actualidad, el TE usado “in vivo” por la mayoría de grupos varía entre 18 ms y 288 ms. A este respecto, se habla de estudios con TE corto o largo, utilizando la mayoría de estudios con TE corto un TE entre 18 y 45 ms, y los estudios con TE largo entre 120 y 288 ms. Se han aducido diferentes argumentos a favor y en contra de cada opción. Un TE largo permite observar un número reducido de metabolitos con menor distorsión de la línea de base. El resultado es un espectro más sencillo de procesar, analizar e interpretar. Con TE de alrededor de 136 ms los dobletes de alanina y lactato se encuentran invertidos, siendo más sencillo diferenciarlos de lípidos y otras macromoléculas (57). Por otro lado, en TE corto son visibles un mayor número de resonancias debido a que la señal de compuestos con fuerte modulación puede perderse a TE largo. De esta manera, es necesario un TE corto para mejor

valoración de algunos compuestos como por ejemplo lípidos, mio-inositol, glutamina o glutamato. La influencia del TE en la clasificación de tumores cerebrales “in vivo” no

ha sido estudiada en profundidad, y no existe una decisión unánime sobre el TE a ser utilizado con este fin. Aunque en esta tesis defendemos que TE corto y largo es la mejor opción.

En los trabajos de esta tesis se ha utilizado secuencias con TE corto y largo (136 ms) porque:

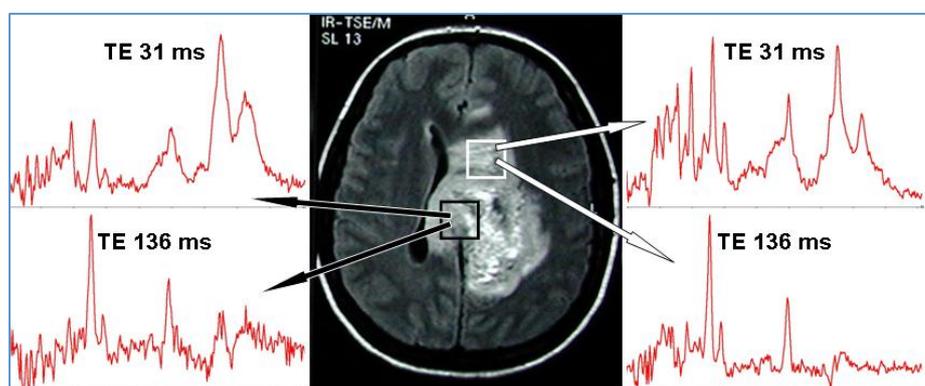
1. Producen mejor diferenciación entre lactato, alanina y lípidos
2. Probablemente existe un significado diferente en la observación de lípidos a TE largo respecto a TE corto
3. La cuantificación es más sencilla y por lo tanto se ha considerado que los resultados deberían ser más reproducibles
4. El hecho de ser más sencillo de analizar, cuantificar e interpretar puede condicionar una aplicación más satisfactoria en la práctica clínica.

#### 1.6.1.2.6. Secuencias de voxel único frente a secuencias multivoxel.

Una de las limitaciones de la utilidad clínica de la ERMN de volumen único (58) estriba en la correcta localización del voxel en la zona de la lesión mas representativa, que pueda diferenciar adecuadamente:

- a) El tipo de lesión, algunos perfiles metabólicos son parecidos entre diferentes patologías como, por ejemplo, absceso, infarto, lesión desmielinizante, gliosis y tumores gliales de grado bajo
- b) La agresividad en tumores gliales, que está directamente relacionada con el protocolo de su tratamiento clínico.

Los tumores gliales, en particular los GBM, son bastante heterogéneos. Esta heterogeneidad en la composición (necrosis, celularidad, edema, ...) puede incluso limitar el diagnóstico por anatomía patológica, técnica de referencia, ya que el resultado de la misma depende directamente de la muestra recogida tanto en el proceso de toma de biopsia o resección total. La RMI y la ERMI tienen acceso a una visión total anatómica y metabólica de la lesión así como de las regiones periféricas contiguas y contralaterales. Como ejemplo de la heterogeneidad metabólica y a su vez anatómicas en la Figura 1 se muestra las diferencias en perfiles neuroquímicos en un GBM.



**Figura 1.** Parte central: imagen transversal de una lesión de elevada agresividad (GBM). Parte derecha: espectros a TE corto y largo de la zona de alta celularidad. Parte izquierda: espectros a TE corto y largo de la región con prevalencia de necrosis

Como se comprueba en la figura anterior, la diversidad en la estructura anatómica (zona central) se refleja de manera directa en la heterogeneidad de los perfiles metabólicos en las diferentes partes, superior izquierda, según dirección radiológica, de elevada celularidad (alto contenido en compuestos de Colina señal mas intensa) y media derecha necrótica (elevada composición en Lípidos) en mayor proporción. Este ejemplo muestra de forma directa la necesidad de seleccionar de manera adecuada el volumen de interés, así como la muestra de biopsia, para el diagnóstico correcto tanto del tipo como de la agresividad de la lesión así como la diferente y complementaria información proporcionada por la adquisición a TE largo y corto.

#### 1.6.1.2.7 CADS. Sistemas de apoyo al diagnóstico radiológico automatizado de tumores cerebrales

Como se ha descrito en el apartado anterior los perfiles metabólicos obtenidos mediante ERMN in vivo, y en particular mediante el protocolo diseñado en este trabajo de investigación, aportan información adicional complementaria y relevante para el apoyo al diagnóstico clínico mediante RMI. No obstante, esta ayuda al diagnóstico requiere de la cuantificación de las cantidades de cada uno de los metabolitos observables y ya comentados. Por otro lado, la evaluación cuantitativa de las resonancias de los neurometabolitos implica una experiencia en el análisis de espectros de RMN. La automatización del proceso de transformación, análisis y cuantificación de los espectros de ERMN in vivo podría constituir una alternativa al requerimiento de dicha experiencia. Además, supondría un incremento en el grado de objetividad en la evaluación de las cantidades de los metabolitos. Para alcanzar dicho objetivo dentro del proyecto europeo eTUMOUR (FP6-2002-LIFESCIHEALTH 503094) (59) se desarrolló un programa de soporte a la decisión para tumores del SNC, denominado CADS. Tanto en el desarrollo, aportando información clínica fundamental, como en la parte de evaluación clínica final el servicio de Neurocirugía del Hospital La Ribera ha participado activamente, en particular en el proceso de evaluación clínica.

La automatización del proceso de análisis cuantitativo de los espectros ERMN ha sido abordada en diversos programas de amplio uso biomédico (2,3). No obstante, estos programas no son totalmente automáticos y requieren de ciertos conocimientos previos y habilidades en espectroscopía de RMN por parte de los usuarios. Asimismo, se han desarrollado programas que ayudan a la clasificación los tumores del SNC, como INTERPRET (4). Este último utiliza jMRUI para la transformación y análisis de los datos espectroscópicos iniciales función tiempo, paso previo a su uso en el proceso de clasificación. Durante el proyecto eTUMOUR se consideró fundamental el desarrollo de un programa (CADS) totalmente automatizado, tanto para la transformación y cuantificación de las resonancias de los espectros ERMN de volumen único, como para el proceso de clasificación de los tumores cerebrales a partir de los datos anteriores. De

esta manera, se intentaba garantizar el uso clínico directo del programa de CADS como una herramienta informática mas en los servicios de neuroradiología.

El proceso del desarrollo del CADS se dividió en tres etapas:

- i) Diseño e implementación del conjunto de módulos para la transformación y cuantificación de los espectros ERMN in vivo.
- ii) Inclusión y aplicación de los módulos originales desarrollados para la clasificación de tumores.
- iii) Evaluación de la utilidad clínica de CADS.

### **1.6.2. Metabolitos presentes en los espectros de tumores**

Una vez obtenido y procesado el espectro, se puede relacionar cada resonancia en el espectro con un metabolito en el tejido, y la cantidad de este compuesto se puede valorar según el área de la resonancia (60). A continuación se describe la información que aportan diferentes metabolitos que se pueden observar en un espectro de protón de tumores y que han sido utilizados en el análisis de los espectros:

— *N-acetil aspartato (NAA) y otros compuestos N-acetilados (NACC)*. Su resonancia se encuentra centrada en 2,02 ppm y es la más intensa que se observa en la ERM  $^1\text{H}$  del parénquima sano. Diversos estudios sugieren que estos compuestos están presentes de manera específica en la neurona del cerebro de personas adultas y que, por tanto, sería un marcador específico neuronal. Se ha descrito disminución de NAA en enfermedades que presentan pérdida de neuronas o axones (demencia, placas antiguas de esclerosis múltiple, isquemia, esclerosis mesial, tumores) (61)

— *Creatina y fosfocreatina*. Presentan una resonancia principal en 3,03 ppm y una segunda resonancia en 3,90 ppm. Son compuestos relacionados con la capacidad energética celular. Se ha sugerido como marcador de los sistemas dependientes de energía en las células del sistema nervioso central (SNC). Se considera la resonancia con menor variabilidad del cerebro. No obstante, disminuye en tumores cerebrales, ya sea por existencia de un bajo nivel energético o, en el caso de tumores secundarios, por originarse de células que no contienen este compuesto.

— *Derivados de la colina*. Esta resonancia aparece en 3,20 ppm. Presenta contribuciones de diferentes metabolitos, como la colina libre, la fosforilcolina, la glicerofosforilcolina y la fosfatidilcolina. Refleja metabolismo de *destrucción y regeneración* celular y está aumentada en procesos que producen hiper celularidad. La explicación más habitual al incremento de este compuesto es la presencia de productos de degradación de la mielina por destrucción de ésta. Se han correlacionado los valores de colina *in vivo* con el potencial de proliferación tumoral, determinado por el análisis inmunohistoquímico de biopsias utilizando Ki-67 para gliomas y meningiomas.

— *Lactato*. Se detecta en 1,35 ppm y proporciona información sobre el grado de metabolismo aerobio-anaerobio de la región. En condiciones normales no se detecta en el parénquima cerebral. Su presencia indica que la respiración oxidativa normal está alterada y que los carbohidratos están siendo catabolizados por la vía anaerobia. Esta situación se da en lesiones altamente celulares y metabólicas que han crecido por encima de lo que su aporte vascular les permite. Las situaciones de hipoxia originan, de manera prácticamente instantánea, incremento de lactato por activación de la vía anaerobia de degradación de la glucosa. También se encuentra en lesiones quísticas o necróticas. Está aumentado en lesiones de alto grado, pero su correlación con el grado tumoral o con el metabolismo tumoral valorado por tomografía de emisión de positrones (PET) no es buena.

— *Mioinositol*. Produce su señal predominante a 3,56 ppm. Es un azúcar que forma parte de un tipo de lípidos, fosfatidilinositol, y también de un grupo de mensajeros, los inositol polifosfatos. También se le da un papel como osmolito y se ha sugerido como marcador de astrocitos. Se encuentra aumentado en astrocitomas de bajo grado y disminuido o ausente en tumores no gliales.

— *Glicina*. Origina una señal en 3,56 ppm que se superpone a la señal del mioinositol. Se ha descrito aumentada en glioblastomas multiformes y visible a TE largos

— *Glutamina y glutamato*. Originan una serie de señales en las regiones 2,2-2,4 y 3,6-3,8 que se valoran mejor a tiempo de eco (TE) corto. Son difíciles de separar a un

campo magnético de 1,5 T. Diversos estudios sugieren que se considere a la glutamina-glutamato como marcador glial. No obstante, la presencia de glutamina-glutamato aumentada es un prominente hallazgo de los meningiomas.

— *Lípidos*. Originan dos resonancias principales en 0,9 ppm (lípidos 0,9) y 1,3 ppm (lípidos 1,3) relativamente anchas, que se deben a los grupos metil y metileno, respectivamente, de la cadena de ácidos grasos. Pueden originar otras señales menores entre 2-2,5 y 5-6 ppm. Su identificación en el espectro se ha relacionado con la presencia de necrosis y se proponen como criterio de malignidad, sobre todo si aparecen en espectros registrados con un TE largo. (62)

— *Alanina*. Es un aminoácido no esencial que resuena en 1,45 ppm y que se ha detectado en grandes cantidades en un porcentaje significativo de meningiomas.

— *Taurina, scilloinositol, glucosa*. Estos metabolitos resuenan en el área comprendida entre 3,3 y 3,45 ppm, y su diferenciación es difícil. La taurina es un aminoácido implicado en la neurotransmisión, la osmorregulación y el crecimiento. Se ha detectado en cantidades elevadas en el meduloblastoma. El scilloinositol es un isómero del inositol. Su resonancia presenta menos intensidad que el isómero más común (mioinositol). La glucosa es una de las principales fuentes de energía; hasta el momento, se le ha encontrado escasa utilidad.

Para terminar este apartado se quiere subrayar que la correlación resonancia-metabolito no es exacta. Diferentes protones en un mismo compuesto pueden presentar resonancia en diferentes localizaciones del espectro de igual modo,  $^1\text{H}$  procedentes de diferentes compuestos se pueden superponer en un mismo área del espectro.

## **1.7. ERM <sup>1</sup>H en el estudio de tumores cerebrales**

### **1.7.1. Antecedentes**

Con el desarrollo de técnicas de ERM <sup>1</sup>H apropiadas para su utilización “in vivo”, la información bioquímica que aporta la ERM <sup>1</sup>H se ha ido combinando, cada día con mayor frecuencia, a la información morfológica que aporta la IRM. La accesibilidad actual de paquetes de software de espectroscopia ha incrementado su uso en situaciones clínicas cotidianas. En la actualidad, se pueden obtener estudios ERM <sup>1</sup>H en la mayoría de equipos de resonancia con una duración cada vez más ajustada. Por lo tanto, los estudios de ERM <sup>1</sup>H pueden ser añadidos en los estudios de RM convencional sin grandes inconvenientes. Uno de los terrenos en que la ERM <sup>1</sup>H ha ido ganando más terreno ha sido el del diagnóstico de tumores cerebrales. (63)

### **1.7.2. Interés de la ERM <sup>1</sup>H en el diagnóstico de tumores cerebrales**

Para un manejo óptimo de los pacientes afectados de tumor cerebral, es necesario disponer de un diagnóstico lo más exacto posible. La IRM puede proporcionar un diagnóstico inicial de las masas cerebrales con una exactitud diagnóstica de entre 30 y 90% dependiendo del tipo de tumor (64, 65). La anatomía patológica (AP) sigue siendo considerada el “gold standard” para determinar el diagnóstico definitivo, por lo que la biopsia del tumor sigue siendo necesaria. No obstante, la mortalidad descrita en la realización de biopsias es del 1,7% (66). En un estudio de 550 pacientes a los que se practicó biopsia estereotáctica, Yu y colaboradores (67) encontraron que un 8% presentaban procesos inflamatorios o abscesos, un 2,2% presentaban otro tipo de lesiones, un 3,4% fueron biopsias no diagnósticas, y un 8% padecieron complicaciones. Un método no invasivo, como lo es la ERM <sup>1</sup>H, que permitiera predecir con exactitud el tipo de lesiones, podría evitar biopsias en procesos no tumorales o tumores poco accesibles que serían tributarios de radio-quimioterapia más que de resección quirúrgica.

### 1.7.3. Limitaciones en la correlación entre ERM $^1\text{H}$ y anatomía patológica.

Dado que la AP es la referencia para el diagnóstico de los tumores cerebrales, los resultados de la ERM  $^1\text{H}$  se tendrán en cuenta según su correlación con la AP. Cualquier dificultad en establecer esta correlación correctamente, sea derivada de la AP o de la ERM  $^1\text{H}$ , redundará negativamente en los resultados atribuidos a la ERM  $^1\text{H}$ . Estas limitaciones explicarán también parte de las discrepancias entre estudios, según la técnica utilizada para la ERM  $^1\text{H}$  (posicionamiento del voxel, imágenes de referencia pre o postcontraste, técnica de voxel único o multivoxel) y para la AP (biopsia estereotáctica, resección parcial, resección total). (67) Existen varias limitaciones a considerar:

1. Los tumores pueden ser muy heterogéneos y su espectro puede contener información de múltiples compartimentos de tejido : células tumorales viables, áreas de necrosis, áreas quísticas, tejido normal (infiltrado). Cada compartimento aporta un tipo determinado de información que condiciona la clasificación, por lo que debe tenerse muy en cuenta en base a que componente se ha elaborado cada clasificador antes de aplicarlo.
2. Células de diferente grado tumoral pueden coincidir en un mismo tumor (18). El espectro de un voxel de determinado volumen ( $1\text{ cm}^3 - 8\text{ cm}^3$ ) nos proporcionará el espectro promedio de ese volumen, mientras que el diagnóstico AP considerará el mayor grado detectado en la muestra, aunque represente únicamente una pequeña proporción del voxel.
3. El diagnóstico histopatológico de una pequeña muestra del tumor obtenida por estereotaxia puede no ser representativa de la totalidad del tumor . No se trata de una limitación de la ERM  $^1\text{H}$  sino de la técnica quirúrgica y/o la AP pero condicionará un diagnóstico por ERM  $^1\text{H}$  diferente del anatomopatológico, que será considerado incorrecto.

4. Lo mismo sucede con la muestra obtenida del voxel seleccionado para la realización de ERM  $^1\text{H}$ . El espectro obtenido puede no correlacionarse con el diagnóstico AP por no haber estudiado el área de mayor grado. Se trata de una limitación propia de las técnicas de voxel único que queda minimizada en las técnicas multivoxel, en que la totalidad del tumor queda incluida en el estudio , de ahí que se proponga en esta tesis un protocolo que incluya volumen único más espectroscopia de imagen que puede proporcionar una visión más completa de heterogenicidad del tumor , disponer como referencia tejido contralateral y detectar infiltraciones
  
5. Una última limitación viene derivada también de la AP. Algunos estudios han demostrado discrepancias en el diagnóstico emitido por diferentes anatomopatólogos sobre una misma muestra . Estas discrepancias revertirán en los resultados obtenidos para la ERM  $^1\text{H}$ . A pesar de estas limitaciones, hay patrones de espectroscopia que se han demostrado característicos de determinados tipos tumorales, y diferentes técnicas estadísticas se han mostrado capaces de relacionar determinados patrones de ERM  $^1\text{H}$  con determinados grupos tumorales

#### **1.7.4. Diferenciación parénquima cerebral normal / tumor**

La ERM se ha demostrado útil para distinguir entre parénquima cerebral normal y tumores cerebrales . Las principales características descritas en los tumores cerebrales son: descenso de NAA , descenso de Cr, aumento de Cho, aumento de Gly/ml , presencia de Lact, aumento de Glx y presencia de resonancia de lípidos en diferentes proporciones . El descenso de NACC expresaría la reducción o ausencia de neuronas y axones en la mayoría de tumores, más marcada en tumores extraaxiales. La disminución de Cr es un hallazgo inconstante en tumores, que se ha asociado a un status de baja energía, o al origen celular de tumores metastásicos en células que no contienen Cr. La elevación de Cho es un hallazgo muy prevalente en tumores. Se ha justificado por la proliferación de las membranas celulares. El lactato aparecería a partir de su acumulación en áreas quísticas y necróticas, o a partir de sobreproducción en tumores

con una alta ratio de glicolisis y activación de la vía anaerobia. De su origen se justifica que su distribución en el tumor sea heterogénea. Los lípidos se han asociado a áreas de necrosis. (68)

Un aspecto de mayor dificultad es la distinción entre tumor y proceso patológico no tumoral como procesos inflamatorio-infecciosos, infarto subagudo, Esclerosis Múltiple. De todos modos, el papel de estos metabolitos en el diagnóstico de una lesión como tumoral debe ser valorado con cautela. En un estudio realizado con 241 pacientes con sospecha de neoplasia, 6 de los que mostraron un patrón de ERM  $^1\text{H}$  tumoral resultaron corresponder a astrogliosis reactiva en la AP. En este estudio se sugirió que el aumento de Cho en estos casos podría ser debido a proliferación de elementos celulares del sistema inmune y astrogliá. A pesar de que los cambios espectroscópicos asociados a gliosis son una moderada elevación de Gly/mI y Cho, con moderada reducción de NACC, una gliosis reactiva severa puede llevar a cambios que pueden ser confundidos con un tumor de bajo grado. Más allá de la semana de evolución, algunas lesiones isquémicas se pueden confundir con tumores por ERM  $^1\text{H}$ . Un tercer motivo de falso positivo pueden ser algunas formas pseudotumorales de EM. (69)

### **1.7.5. Tumores gliales. Diferenciación del grado tumoral**

Los hallazgos descritos como típicos de los astrocitomas incluyen una reducción del nivel de NACC, moderada reducción de niveles de Cr y elevación de Cho. Múltiples estudios han analizado la capacidad de la ERM para distinguir entre diferentes grados tumorales en astrocitomas (70) e incluso en el área de infiltración tumoral y han propuesto diferentes marcadores:

#### **1.7.5.1. INCREMENTO DE LOS COMPUESTOS DERIVADOS DE LA COLINA CON EL GRADO TUMORAL**

En múltiples trabajos se ha afirmado correlación directa entre el área de Cho y el grado tumoral en tumores astrocíticos. No obstante, este incremento lineal con el grado no se ha constatado en todos los estudios. Es un hecho prevalente que los niveles de Cho en astrocitoma anaplásico son mayores que en astrocitoma de bajo grado, pero diversos estudios han encontrado niveles de Cho menores en glioblastoma que en astrocitoma anaplásico. Puede ser debido a predominio en el voxel de áreas necróticas sobre áreas

celulares proliferativas. Esto explicaría también la variabilidad presente entre estudios, dependiendo de la estrategia utilizada para posicionar el voxel sobre el tumor, y cierta discordancia entre estudios practicados “in vitro” e “in vivo”, dado que los primeros sólo consideran áreas de tumor viable no necrótico.

#### 1.7.5.2. PAPEL DEL LACTATO EN LA GRADACIÓN DE TUMORES

También se ha señalado la presencia de lactato como indicador de alto grado tumoral. La justificación del aumento de lactato con el grado tumoral sería que el aumento de la actividad metabólica desplazaría el metabolismo celular hacia la vía anaerobia, provocando depósito de lactato. Otros estudios han demostrado gran variabilidad en la cantidad de lactato, que se justifica porque la presencia de este metabolito no depende únicamente de su producción por parte de las células, sino de la capacidad de lavado del mismo. De este modo se acumularía en áreas quísticas o con mala llegada del árbol vascular.

#### 1.7.5.3. PAPEL DE LOS LÍPIDOS EN LA GRADACIÓN DE TUMORES

Los lípidos se han relacionado con áreas de necrosis (71), y por tanto se encontrarían en tumores de alto grado tumoral. Serían pues indicadores de alto grado tumoral y se encontrarían presentes en glioblastomas. Se han descrito en diferentes proporciones en astrocitomas anaplásicos dependiendo de los estudios. Con respecto a los glioblastomas, algunos grupos han distinguido entre glioblastomas con lípidos y glioblastomas sin lípidos de cara a su clasificación, y han intentado correlacionar estos dos patrones con el grado de actividad tumoral.

#### 1.7.5.4. PAPEL DEL MIO-INOSITOL Y LA GLICINA EN LA GRADACIÓN DE TUMORES

Estos compuestos resuenan aproximadamente en la misma posición del espectro (3,55 – 3,56 ppm), de manera que no es posible diferenciarlos únicamente por su posición pero sí por TE (tiempo echo). Se ha descrito un descenso del Myo-inositol con el grado tumoral. Por otro lado, estudios “in vitro” han detectado un aumento de la cantidad de glicina en glioblastoma.

## **1.8 HR-MAS (ESPECTROCOPIA DE RMN DE ALTA RESOLUCIÓN CON GIRO A ANGULO MÁGICO)**

Una de las cuestiones relevantes para la validación de la utilidad biomédica y/o clínica de los perfiles metabólicos ex vivo de biopsias mediante RMN, lo que se conoce y ya se ha definido como HR-MAS (espectroscopía de RMN de alta resolución con giro a ángulo mágico), estriba en poder determinar la correlación entre dichos perfiles metabólicos y el tipo de tejido analizado. Esta correlación es mucho más determinante en los tumores del SNC y en particular en los gliomas, dada su gran heterogeneidad (72).

Una de las potenciales limitaciones de la aplicabilidad clínica de la técnica de HR-MAS, radica en la posibilidad de imprecisiones en la diferenciación entre los diferentes tipos de tumores del SNC, y en particular entre gliomas, relacionadas con el tipo de tejido de biopsia usado para la obtención del perfil metabólico (73). La situación habitual es que los estudios se centren fundamentalmente en la caracterización de tumor SNC, sin entrar a considerar la diversidad de tipos de tejido en el interior de la región tumoral. La heterogeneidad, una característica particular de los tumores del SNC, afecta no sólo al grado del tumor (74) sino también al tipo de tejido dentro del tumor. Existen bastantes situaciones en las que el conocimiento previo del tipo de tejido puede ayudar a una clasificación más precisa del tumor. Por ejemplo, en los tumores gliales de alto grado, además de células tumorales viables pueden existir regiones necróticas y, en el caso de tumores altamente infiltrantes, puede aparecer también contribución por parte de tejido normal cerebral del borde de la región afectada.

Hasta la fecha, el análisis histopatológico es el procedimiento estándar rutinario usado para poner de manifiesto la contribución de necrosis, elevada celularidad y tejido periférico. La manipulación del tejido de biopsia para el examen histológico puede limitar y limita las posibilidades de ser utilizado en otras técnicas adicionales como genómica, proteómica o metabolómica. HR-MAS puede ser una técnica que en gran medida reduzca dichas limitaciones y por consiguiente sea una técnica complementaria, que ya ha sido usada para revelar el estado de micro-heterogeneidad del tumor, observar las alteraciones metabólicas previas a que las morfológicas sean detectables, y correlacionar con las características histopatológicas (75). Específicamente, se ha podido correlacionar de manera lineal la concentración de lípidos móviles y de colina con la necrosis y celularidad, respectivamente. Mientras que elevados niveles de NAA

son característicos de las regiones periféricas del tumor en contraposición a la región activa del tumor. La pequeña cantidad de tejido (aprox 10-30 mg) usada en los estudios de HR-MAS puede implicar un primer nivel de correlación entre perfiles metabólicos y tipo de tejido de la biopsia. Ya que a priori la integridad del tejido es parcialmente conservada durante el estudio mediante HR-MAS, resulta interesante investigar la posibilidad de diferenciación entre los diferentes tipos de tejidos tumorales usando exclusivamente los perfiles metabólicos ex vivo. Esta potencial correlación obtenida ex vivo podría ser trasladada a la imagen de espectroscopía in vivo y así incrementar su utilidad clínica.

### **1.8.1 Diferenciación tumor glial / metástasis**

En la actualidad, la RMI se usa ampliamente en medicina como una técnica no invasiva para detectar y diagnosticar patologías cerebrales. Sin embargo, la capacidad para diferenciar entre tipos de tumores se encuentra prácticamente limitada a la biopsia, que presenta riesgos significativos y está asociada a un mortalidad estimada entre el 0,6% y el 4,2% . En este contexto, la diferenciación entre lesiones solitarias de metástasis y GBM representa un ejemplo importante (76). Ambos se encuentran entre las neoplasias cerebrales más comunes en adultos. La historia clínica, el número de lesiones y la RMI convencional no son siempre capaces de distinguir entre metástasis y GBM. Esta diferenciación es importante ya que ambos tumores requieren estrategias de tratamiento diferentes.

La ERM ha sido usada para encontrar patrones de reconocimiento para la diferenciación entre metástasis y GBM . Esta técnica, como ya se ha comentado en previos apartados de este trabajo de investigación, proporciona información metabólica acerca de la composición bioquímica del tejido normal y patológico. A través de del estudio de las alteraciones de las concentraciones de metabolitos, se pueden potencialmente mejorar el conocimiento de la patofisiología subyacente. Sin embargo, hasta la actualidad, estas aproximaciones de volumen único, incluyendo datos a tiempo de eco (TE) corto y largo, no han proporcionado una diferenciación fiable entre los dos tipos de tumores.

La espectroscopía de resonancia magnética de protón de imagen (ERMI) es capaz de proporcionar el mapa de metabolitos en el cerebro, permitiendo visualizar la

distribución espacial de los metabolitos. Law y colaboradores (78) encontraron un cociente elevado de colina/creatina en la región de realce tumoral y en el área periférica al realce en GBM en comparación con las metástasis usando ERMi. En cambio, no se encontraron diferencias para la relación NAA/creatina entre ambos grupos de tumores. La conclusión de dicho estudio fue que la técnica ERMi puede ser usada para diferenciar entre GBM y metástasis. Además, Chiang y colaboradores (79) también mostraron valores significativos mayores de colina/creatina (Co/Cr) en el área peritumoral al realce en GBM en comparación a metástasis, que permitieron un diagnóstico diferencial entre los dos tipos de tumores. Por el contrario, no se encontraron diferencias estadísticas en la región de realce tumoral para el cociente Co/Cr.

### **1.9 DESARROLLO ERMi (Espectroscopía Resonancia Magnética de Imagen) en el diagnóstico de Gliomas.**

La aplicación clínica de la RMN y de la Resonancia con Espectroscopia In vivo ha permitido abrir el camino para el estudio morfológico y bioquímico de los tumores cerebrales (159-164). RMN y RMN con espectroscopia aportan importante información clínica que permite la discriminación entre lesiones tumorales y no tumorales (165-169), tipo de tumor y grado (170-174), diferenciación entre tumor primario y metástasis(18), la detección de infiltración tumoral con respecto a áreas tisulares normales o edema cerebral (175-176). Además, la RMN con espectroscopia combinada con la RMN es útil en el seguimiento de lesiones tratadas, distinguiendo entre necrosis y progresión tumoral (177-178) aportando información de la extensión tumoral en la planificación quirúrgica y radioterápica (179,180). Aunque, la información morfológica y bioquímica que se puede obtener está limitada a los bajos campos magnéticos utilizados en la clínica práctica (normalmente de 1,5 a 3 Teslas).

La MRM (Microscopía de RM) con una resolución de menos de 100 micras (181) es un método de adquisición de imágenes que se ha convertido en una técnica valiosa para el estudio preclínico de enfermedades neurológicas humanas [182]. El estudio ex vivo de tejidos biológicos y órganos por RMN de alto campo (MRI) permite una mayor resolución espacial y tiempos más largos de estudio sin artefactos de movimiento [183] y, por lo tanto puede proporcionar detalles morfológicos que sería muy difícil o casi imposible de lograr en estudios in vivo. En muestras de tejido humano, el estudio ex vivo de la corteza cerebral [184] y piezas del hipocampo [185] a 9,4 T y la corteza visual [186] a 14 T, ha proporcionado detalles sobre la citoarquitectura en diferentes estructuras con una resolución de 78x78x500, 200x200x200 and 80x80x80  $\mu\text{m}$  respectivamente. Sin embargo, los ejemplos de los estudios ex vivo de imágenes de los tejidos tumorales del cerebro humano mediante microscopía de resonancia magnética son escasos se ha realizado estudios en resecciones de malformaciones cavernosas cerebrales humanas se ha estudiado por microscopía de RMN en 9,4 y 14 T con la resolución isotrópica de 60 micras que permite el estudio de la angioarquitectura de estas lesiones cerca de la resolución histológica [187]. Diversos tipos de meningioma y muestras de gliomas cerebrales se han estudiado por microscopía de MRI en 14T con la resolución de 34x34x500 micras que permite la observación de las características de tejidos finos (188) Todas las muestras histológicas incluidas en estos estudios de RMN ex vivo fueron muestras fijadas con formalina (184-188) y en algunos casos los tejidos fueron tratados con novedosas técnicas de contraste dirigidas por contrastes específicos

Además, los procesos de fijación de tejidos en biopsias y autopsias se ha demostrado que alteran las propiedades histológicas. El uso de sustancias de fijación puede modificar de forma sustancial la concentración de metabolitos, contaminando la muestra y cambiando los tiempos de relajación de los tejidos). La realización espectroscopía de RMN y RMN de alto campo permiten realizan estos estudios bioquímicos en pacientes in vivo

La combinación de RMN Espectroscopia y RMN de alto campo han permitido aplicar estudios de metabolitos cerebrales in vivo de ratas (189-190). El uso de tiempos Echo muy cortos ( 1ms), rendimiento FASTMAP ajuste de campo (191) y supresión de señal de agua (VAPOR) permiten obtener espectros a alto campo con elevada resolución en cerebros de rata y así poder identificar los metabolitos alanina, aspartato, colina, creatina, GABA, glucosa, glutamato, glutamina, mio-Inositol, lactato, N-acetilaspártato, N-acetilaspártoglutamato, fosfocreatina, glicina y taurina.

Las concentraciones de estos metabolitos y otros como fosforiletanolamina y sciloinositol, han sido cuantificados en el cerebro de la rata mostrando una buena correlación con los datos neuroquímicos descritos en la literatura . La selección del tiempo correcto de eco ha permitido correlacionar datos in vivo como la concentración in vivo de glucosa como alternativa a la medicina nuclear (192-195). La cuantificación del metabolismo energético del cerebro de la rata usando (1-<sup>13</sup>C) D-glucosa con medida simultánea de lactato, glucosa y fosfocreatina ha sido posible con el uso de secuencias seleccionadas de <sup>1</sup>H unido a <sup>13</sup>C (190). Otros metabolitos como glutamato, glutamina y GABA se han estudiado por contener <sup>13</sup>C .Los tumores cerebrales estudiados con RMN y RMN espectroscopia son habitualmente gliomas, tumores cerebrales derivados de la glía, que son los tumores cerebrales primarios más frecuentes (196). El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor de alto grado glial más frecuente en el sistema nervioso central en adultos (197). Estudios de RMN en GBM muestran tumores mal delimitados con áreas de necrosis, formaciones quísticas y edema . Microscopicamente los hallazgos más relevantes son la diversidad de formas celulares, la densa celularidad, la presencia de necrosis focal y la proliferación vascular intratumoral y peritumoral . La proliferación microvascular está presente en el 95% de los GBM y permite tipificar el grado de malignidad de los tumores gliales (196-198). La identificación de la zona limítrofe entre la infiltración tumoral y el parénquima normal es uno de los mayores problemas a resolver para la planificación del inicio de la terapia. Estas áreas de infiltración tumoral son difícilmente identificables en las técnicas de RMN convencional siendo el área de recidiva y recurrencia tumoral tras cirugía y radioterapia.

En este estudio, la RMN y la Resonancia Espectroscopia de alto campo se combinan (ERMi) para la obtención de información bioquímica local así como el estudio vascular 3D y citoarquitectura en biopsias de GBM humano. En este estudio, la relación señal/ruido se ha mejorado lo suficiente como para permitir la comparación directa entre las piezas histológicas usadas como referencia y los detalles microanatómicos obtenidos. Además la espectroscopia multivoxel aporta información de la distribución espacial de los metabolitos complementariamente al voxel único, esto se ha visto en estudios de tumores en animales con RMN de alto campo y espectroscopía. Este detalle metabólico e información estructural puede ser de vital importancia en el pronóstico de los GBM. Este estudio se ha realizado usando el contraste convencional y las muestras no se han modificado mediante técnicas de fijación para facilitar el estudio abierto a ser completado en estas muestras con Chips de DNA, proteómica, inmunohistoquímica o espectroscopia de masas. Estas técnicas pueden aportar información bioquímica adicional que mejoren la clasificación tumoral, pronóstico así como un tratamiento específico.



## **2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

El objetivo de esta Tesis se centra en la descripción de los resultados de investigación obtenidos de la colaboración de los Departamentos de Radiología y Neurocirugía del Hospital de la Ribera con el Departamento de Química Física de la Universidad de Valencia, en particular enmarcado dentro del Convenio de Investigación entre ambas instituciones y específicamente en la extensa colaboración durante la propuesta y desarrollo del proyecto europeo eTUMOUR (LSHC-CT-2004-503094 ), para el estudio de los tumores cerebrales primarios y secundarios mediante el uso de espectroscopia in vivo y ex vivo y así como una técnica no descrita en la literatura hasta este trabajo que es la microscopia por resonancia magnética. Los objetivos , recogida de datos y resultados de ha seguido tres fases. Para poder entender como se complementan estas tres técnicas realizamos una breve introducción seguida de los objetivos por apartados, esquema que mantenemos en material y métodos así como en los resultados.

En una primera fase se desarrollo un nuevo protocolo para el diagnóstico diferencial de tumores gliales con las metástasis mediante en el análisis de los metabolitos presentes en estudios de espectroscopía mediante la combinación de tiempos eco largos y cortos en volúmenes voxel únicos. El uso de esta nueva técnica se aplica en el diagnóstico automatizado mediante el programa CADS validando la técnica así como para el diagnóstico diferencial entre gliomas y metástasis.

En una segunda fase de la Tesis se analizaron mediante HR-MAS muestras ex vivo de biopsias de tumores cerebrales y se validan los resultados obtenidos in vivo con los resultados ex vivo y estudio histológico.

En una última fase se realizaron estudios ex vivo de microscopía por resonancia magnética de las muestras obtenidas para obtener imagenes de alta resolución a escala celular e histológica de los tejidos analizados mediante HR-MAS y obtener tanto un perfil metabólico con tiempo eco largo y corto de diferentes áreas tumorales junto a un estudio de imagen a nivel tisular que permita su traslación de ex vivo a in vivo.

## **2.1 ESPECTROSCOPIA DE RMN IN VIVO (ERM)**

### **2.1.1 Desarrollo y verificación de un nuevo protocolo de RMN Espectroscopica in vivo para el diagnóstico diferencial entre los diferentes tumores gliales**

En este apartado se comprobará la aplicabilidad de la ERMN:

1. En la ayuda al diagnóstico diferencial entre diferentes tipos de lesiones cerebrales,
2. Protocolo de adquisición que permita estadiar la agresividad tumoral.
  - a. Obtención previa de datos de ERMN que permitirá la localización más precisa de las áreas de máxima agresividad (elevada celularidad) evitando al máximo las regiones de necrosis
  - b. Posterior localización de los volúmenes únicos en la zona de mayor celularidad.
3. Determinación del grado de infiltración de los vóxeles contiguos a la lesión fuera de la zona de realce de contraste.

### **2.1.2. Desarrollo y evaluación de un Sistema de Apoyo al Diagnóstico Clínico (CADS) de tumores del SNC mediante ERM**

Valoración de la utilidad clínica y rendimiento del programa CADS, con los siguientes objetivos específicos:

1. Cambio en AUC (área bajo la curva) para el global de las curvas ROC (curva característica operativa del observador) a partir de la información de MRS/CADS (espectroscopía RMI/CADS) respecto a la información obtenida exclusivamente mediante RMI.

2. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la clasificación obtenida mediante MRS/CADS respecto al procedimiento estándar local de diagnóstico para el conjunto de tipos de tumores usados en la evaluación.

### **2.1.3 Protocolo RMN Espectroscopia IN VIVO para el diagnóstico diferencial entre lesiones solitarias de GBM y metástasis mediante imágenes nosológicas**

Diferenciación entre GBM y metástasis usando la información de ERMi y RMI adquirida en el protocolo diseñado para esta tesis .

1. Los datos de ERMi turbo de dos dimensiones (2D-TSI), imágenes potenciadas en T1 antes y después de la administración de gadolinio (Gd) e imágenes potenciadas en T2.
2. Los cocientes Co/Cr y NAA/Cr se compararán para GBM y metástasis a partir de las diferencias en la región tumoral, el área peritumoral y en la región de no realce/hipointensa en T2.

## **2.2 RMN EX VIVO (HR-MAS)**

### **2.2.1.- Correlación del perfil metabólico mediante HR-MAS de la muestra de biopsia cerebral y tipo de tejido tumoral**

1. Analizar si por medio de clasificación no supervisada se puede identificar para cada caso , el tipo astrocitoma predominante en el tejido tumoral.
2. Extracción de la características representativas de cada clase de tejido de tumores del SNC
3. Comprobar si las conclusiones obtenidas para el grupo de GBM se pueden generalizar a los otros dos grupos de tumores gliales, con diferente grado de agresividad.

### **2.2.2 Clasificación metabólica ex vivo (HR-MAS) de tumores del SNC**

1. Determinar la capacidad de los perfiles metabólicos ex vivo obtenidos mediante HR-MAS para estadísticamente diferenciar entre los tipos de tumores del SNC más comunes en adultos.

## **2.3 DESARROLLO DE MRM (Microscopía de RM) EN EL DIAGNÓSTICO DE GLIOMAS.**

- 2.3.1 Detección a nivel microscópico de la citoarquitectura de la biopsia de tejido cerebral**
- 2.3.2 Diferenciación metabólica en biopsias de GBM Mediante MRM**
- 2.3.3 Traslación de perfiles metabólicos ex vivo/in vivo en gliomas**

### 3. MATERIAL Y METODOS

Es importante resaltar que la presente tesis es el resultado de años de colaboración entre los Departamentos de Neurocirugía –Radiología del Hospital de La Ribera y el Departamento de Química-Física de la Universidad de Valencia, en los que se han realizado diversos estudios a partir de muestras de biopsia cerebrales que han recibido los consentimientos informados y aprobación del comité de ética del Hospital Ribera tanto en los casos de los estudios metabólico por espectroscopia en RMN in vivo como ex vivo (HR-MAS y MRM). La experiencia del Departamento de Química-Física de la Universidad de Valencia tanto en ERM como en HR-MAS en el estudio de tumores de SNC ha llevado a este Departamento a coordinar un proyecto Europeo de gran envergadura que incluye más de 20 laboratorios y Hospitales de la Unión Europea. El VI Programa Marco Europeo ha aprobado el proyecto de investigación e TUMOUR. Este proyecto está incluido en el área Combating Cancer y es el único aprobado dentro de este campo de conocimiento que coordina un grupo de investigación internacional. En el estudio participaron 14 Hospitales, catorce Universidades y centros de investigación, además de siete empresas de otros países Europeos. El proyecto eTUMOUR pretende mejorar la clasificación del tipo y gradación de los tumores cerebrales a través de datos metabolitos y genético (Chips de ADN) complementando la información histológica tradicional. Se pretende que esta información incida directamente en una mayor precisión en el diagnóstico, pronóstico y selección adecuada de la terapia en los tumores del SNC. Para el correcto análisis de estos metabolitos y hallazgos radiológicos se precisa que las muestras sean anónimas tanto de datos epidemiológicos como histológicos previos.

En conclusión los estudios se ha realizado con materiales en 3 fases : una primera fase de estudio de ERM in vivo con resonancias de pacientes del Hospital La Ribera. Una segunda fase de estudio ex vivo de HR-MAS de muestras de tumores cerebrales del Hospital La Ribera y Clínico de Valencia así como MRM. En una tercera fase dentro del proyecto eTUMOUR se ha realizado análisis de ERM de imágenes radiológicas en las que han participado de forma anónima diferentes instituciones aportando estudios radiológicos.

### **3.1. Uso de nuevo protocolo de RMN Espectroscopica IN VIVO para el diagnóstico diferencial entre los diferentes tumores gliales**

Para la evaluación de la capacidad discriminativa del protocolo diseñado de ERMN, usando la combinación de ERMN de volumen único y ERMI, se compararán, a modo de ejemplo, los perfiles metabólicos de las siguientes lesiones cerebrales 2 abscesos, 1 infarto, 1 infarto hemorrágico, 1 lesión desmielinizante, 1 lesión de Gliomatosis Cerebri 1 control de Astrocitoma anaplásico y un GBM. La obtención de estas muestras y piezas histológicas de lesiones cerebrales se realizó en el Hospital La Ribera en el marco del protocolo de recogida de muestras quirúrgicas del Servicio de Neurocirugía con la aprobación y supervisión del comité de ética.

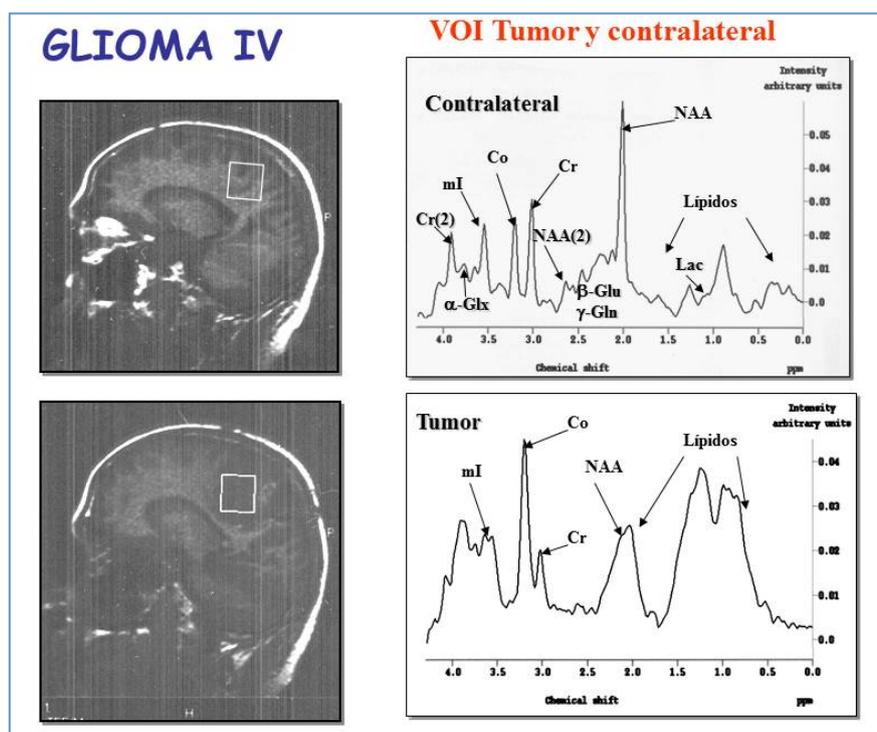
El número total de casos que se han incluido en el desarrollo y verificación del protocolo propuesto para la diferenciación de la agresividad en tumores gliales es 48: 13 Grado II, 10 Grado III y 25 Grado IV.

Todos los estudios de resonancia se realizaron en un imán superconductor de RM de 1,5 T de uso clínico (Gyrosan Intera, Sistemas médicos de Philips, Holanda) (Figura 2) en los Servicios de Radiología de la Clínica Quirón, Valencia y Hospital La Ribera, Alzira. En todos los estudios se utilizó la bobina estándar de cabeza con el software de espectroscopía avanzada. Las secuencias de 1H ERM se adquirieron en la misma sesión que el estudio de RMI. Antes del estudio de espectroscopía, para localizar y situar con la mayor precisión posible las lesiones, se realizaron secuencias turbo espín eco (TSE) transversal potenciadas en densidad protónica y T2 (tiempo de repetición (TR)/tiempo de eco (TE), 2.100/13 y 115 ms), eco planar (EPI) TSE potenciada en difusión (TR/TE, 1.412/145, b= 0 y 800 ms) y eco de gradiente potenciada en T1 (TR/TE/a, 20/4,6/20°). Además, todos los pacientes tenían un estudio potenciado en T1 tras la administración de contraste, realizado el mismo día o en días anteriores al estudio de 1H ERM..

Para la adquisición de los espectros de 1H ERM se utilizó la técnica de volumen único (VOI). El VOI en cada tumor se eligió tan grande como fuera posible para obtener una buena relación señal/ruido y una adecuada representatividad del tejido afectado, sin incluir el parénquima periférico. También se evitó, en la medida de lo posible, la inclusión de regiones quísticas en el volumen de interés. Para la localización del VOI se utilizó la secuencia PRESS [82] con TE= 31 ms y TR= 2.000 ms y se programaron 128 repeticiones. La señal del agua se suprimió mediante inversión selectiva. El análisis de 1H ERM a TE de 31 ms permite la identificación de las señales de mioinositol (mI) y de

lípidos y macromoléculas (MMA a 0,9 ppm y MMB a 1,03 ppm) no detectables en TE superiores, en la mayoría de casos, y que han permitido identificar el grado tumoral [82-86], junto con los metabolitos típicos [88]. Se adquirieron asimismo experimentos a TE de 136 ms con supresión del agua en todos los casos utilizando las referencias respecto a creatina (Cr) de N-acetilaspártato (NAA) y colina (Co) claramente identificables a ese TE, y sólo en algunos casos la presencia de MMA y MMB [88,95].

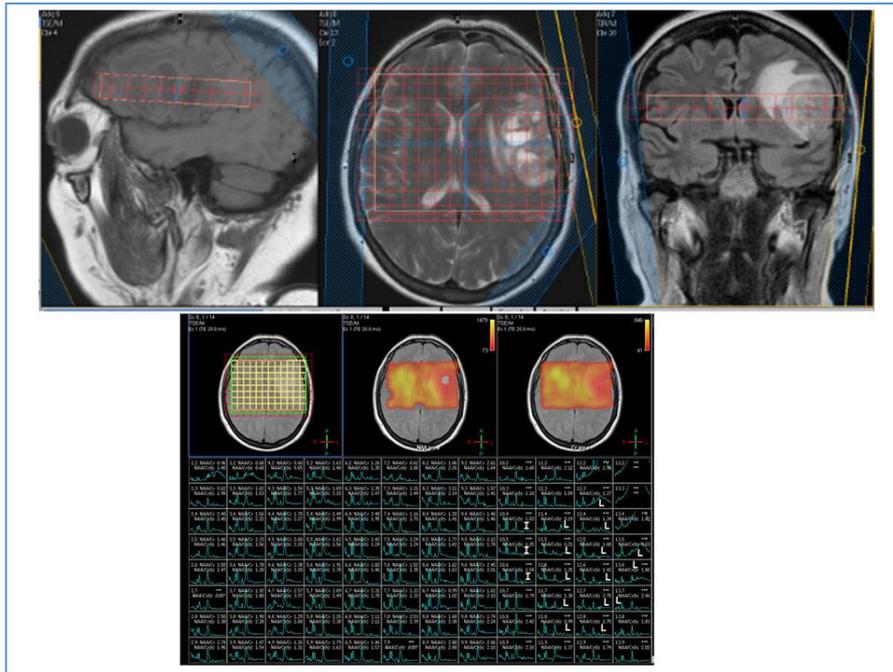
En todos los espectros se identificaron las resonancias más significativas (Figura 2): en los espectros a TE 31 una banda centrada alrededor de 0,9 ppm MMA (macromoléculas tipo A), una banda alrededor de 1,3 ppm MMB (macromoléculas tipo B), a 2,01 ppm NAA, a 3,01 ppm Cr, a 3,21 ppm Co, a 3,56 ppm mI y a TE 136 ms MMA, MMB, NAA, Cr, Co y el doblete del lactato (Lac) invertido a 1,33 ppm. Mediante el programa jMRUI (87) se integró el área bajo las señales de MMA, MMB, NAA, Cr, Co y mI y el área de la señal del agua, automáticamente se adquiere un espectro de referencia sin supresión de agua. Se calcularon los cocientes de MMA, MMB, NAA, Cr, Co y mI respecto al agua y a la Cr en los espectros a TE 31. Para los espectros de TE 136 se calcularon los cocientes de MMA, MMB, NAA y Co respecto a Cr. Asimismo, a ambos TE se calculó el cociente NAA/ Co y para TE corto la relación MMA/MMB con objeto de verificar los cambios en las macromoléculas en los tres grados tumorales estudiados.



**Figura 2.-** Ejemplo de perfil metabólico, incluyendo la asignación de neurometabolitos, en: A) parte superior zona contralateral no afecta; B) parte inferior lesión tumoral glial grado IV

Los espectros de RMN obtenidos in vivo son más sencillos de lo que inicialmente sería previsible, considerando la compleja naturaleza de los organismos vivos. Esta sencillez espectral podría ser interpretada como una desventaja, sin embargo, es una circunstancia favorable ya que si se observaron las resonancias de todas las sustancias que componen la muestra, el análisis de estos espectros sería inabordable debido al masivo solapamiento entre todas las señales.

La explicación al reducido número de señales observable in vivo reside en dos factores. Por una parte, es un problema de sensibilidad de la técnica (no es posible detectar concentraciones inferiores a 0,5 mM con los campos magnéticos clínicos habituales). Por otra, un problema de movilidad molecular (aquellas sustancias con T2 cortos asociado a movilidad reducida ya sea por su tamaño o porque se encuentran unidos en grandes complejos moleculares tienen la posibilidad de relajar la energía con mayor rapidez que aquellas que tienen libertad de movimiento y la relajación es tan rápida que hoy en día, los sistemas de detección, no pueden observar adecuadamente estas señales). Con el objeto de comprobar el área máxima de alteración metabólica por parte del tumor, incluyendo aquellas regiones de potencial infiltración fuera del realce de contraste, se adquirió una ERMI de un corte con una secuencia turbo (2D TSI) (TR/TE= 2700/272 ms, número de puntos= 256, llenado de ceros= 512 antes de la FT, anchura espectral= 1050 Hz) de orientación y FOV idéntica a la imagen anatómica axial potenciada en T1, con anchura de sección de 20 mm, con una región de interés de cada corte de 60x60x20 mm y una matriz de 24x24 elementos (0,13 ml), incluyendo la lesión y regiones contralaterales. Se utilizaron 16 bandas de saturación alrededor del volumen de interés. El tiempo total para la adquisición de la 2D TSI ERMI fue de 10 minutos. Asimismo, y debido a implementaciones en los equipos de RMI también se han adquirido 2D ERMI con TE= 144 ms y resto de parámetros de adquisición similares a los comentados para los 2D TSI ERMI, en la Figura siguiente (3) se incluye un ejemplo de localización y resultado de una imagen de espectroscopía 2D ERMI para una lesión tipo GBM.



**Figura 3.-** Ejemplo de espectros multivoxel EMRI (TE = 144 ms) adquirido previamente a los VOI para una localización más precisa de la región de máxima celularidad en la lesión GBM. A) parte superior: localización en los tres planos incluyendo las bandas de saturación usadas. B) parte inferior: resultado del multivoxel, incluyendo el enrejillado e imagen molecular de NAA y CR, respectivamente y con los espectros de cada voxel y el resultado correspondiente a la lesión (L) e infiltración (I)

### 3.1.1.- Desarrollo y evaluación de un Sistema de Apoyo al Diagnóstico Clínico (CADS) de tumores del SNC mediante ERM

El número total de casos usados para la evaluación de la potencial utilidad clínica del programa CADS (87,146,147,148), en combinación con los datos proporcionados por los perfiles metabólicos mediante ERMN de volumen único (MRS en el proceso de evaluación), fue de 79 tumores. El análisis radiológico de la imágenes se realizó en el marco del proyecto eTUMOUR, estudio que implica la ausencia de datos demográficos o clínicos de las muestras para poder validar el estudio. El diagnóstico clínico local mostraba la siguiente distribución estadística de los para los tumores con mayor proporción: i) 24 (30.4%) glioblastoma multiforme; ii) 14 (17,7%) glioma grado II; iii) 11 (13.9%) metástasis, iv) 11 (13.9%) meningiomas; v) 5 (6,3%) oligodendrogliomas grado II; y vi) 3 (3,8%) Gliomas grado III. El resto de tumores: como ependimomas II y III, oligodendroglioma III, neurocitoma, quiste aracnoideo, hematoma, lesión inflamatoria, lesión talámica, glioma I sólo contribuyeron con un caso. Por lo que el

análisis a nivel estadístico se centró mayoritariamente en los casos de tumores en mayor proporción. No obstante, sí que se ha considerado, como en oligodendrogliomas y ependimomas, la agresividad como una potencial información relevante, adicional al tipo específico de tumor, en el análisis de los resultados proporcionados por la aplicación directa del CADS (Diagnóstico por Espectroscopía Asistido por Computadora).

Aquí parece significativo que resaltar que tanto la clasificación del tipo como de la agresividad del tumor obtenida mediante el CADS única y exclusivamente tiene en cuenta los datos de ERMN in vivo. Los resultados proporcionados por la aplicación del programa CADS son totalmente ciegos tanto a los datos clínicos como radiológicos.

Desde el punto de vista estadístico, el objetivo fundamental ha sido determinar y comparar la diferencia en AUC a partir de las curvas ROC construidas sólo: 1) partir de la clasificación derivada de RMI respecto de la clasificación final del diagnóstico clínico; y 2) de la curva ROC construida a partir de la clasificación obtenida mediante MRS/CADS respecto al diagnóstico clínico final.

Para construir las curvas ROC global, se determinaron la sensibilidad y especificidad para la clasificación clínica de los tumores de acuerdo con las siguientes definiciones habituales:

- a) Sensibilidad =  $TP/(TP + FN)$  ; donde TP (verdadero positivo) y FN (falso negativo)
- b) Especificidad =  $TN/(FP + TN)$ ; donde TN (verdadero negativo) y FP (falso positivo)

Cada clasificación identificará un punto en la curva global ROC: las coordenadas sensibilidad/especificidad se ponderarán en función del número de casos disponible para cada punto (a priori utilizando la inversa del 95% del nivel de confianza estimado). De manera específica el objetivo incluye, en relación con la precisión en el diagnóstico:

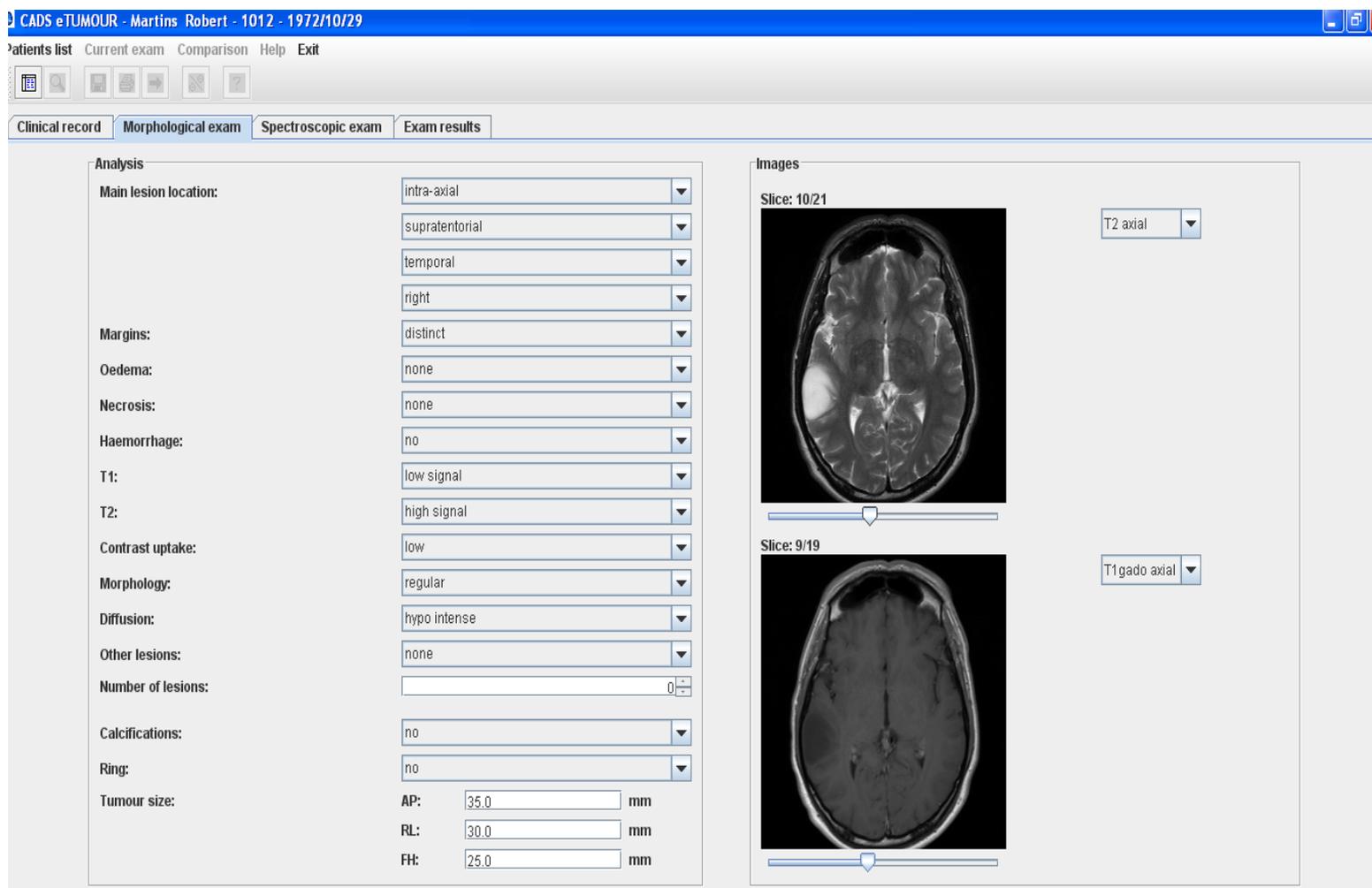
- El valor absoluto de sensibilidad y especificidad de la clasificación de MRS/CADS cuando se aplica a un determinado tipo de tumores respecto al diagnóstico clínico.
- El valor absoluto de la sensibilidad y especificidad del procedimiento diseñado en eTUMOUR (87) para cada tipo de tumor usado, con independencia de su grado. Las definiciones de TP, TN, FP y FN anteriores se aplicarán a cada tipo de tumor con al menos un 10% de la muestra .

Para el análisis estadístico se ha usado el programa SAS versión 9.1.3. Las figuras se han generado usando el procesador de datos en SAS e importado a Microsoft Vision 2003 y Excel 2003 para su visualización.

- Principales características de CADS

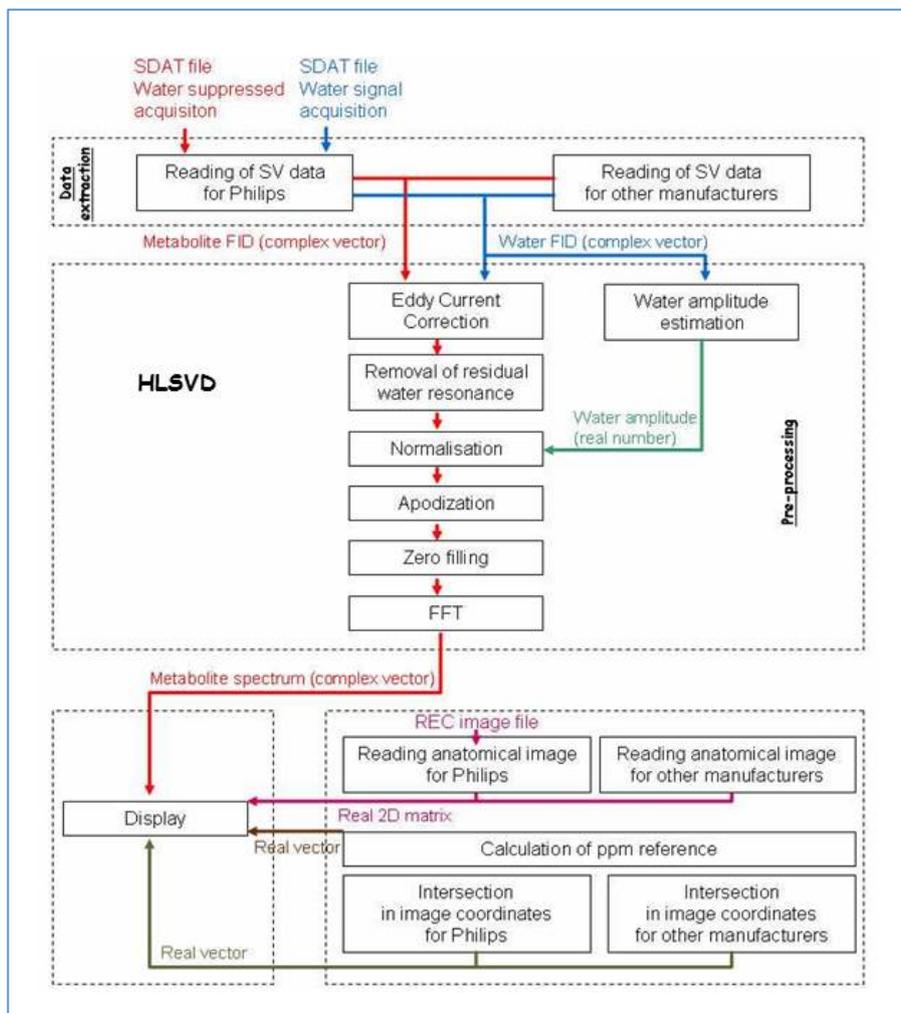
Resulta conveniente, ya que se ha participado activamente en el diseño de las características interactivas mas señaladas del programa CADS, incluir un resumen de su potencial uso clínico como herramienta automática de transformación y visualización de espectros así como de clasificación de tumores cerebrales.

Desde el punto de vista clínico, una de las primeras utilidades que se consideraron y se incluyeron es la capacidad de constituir un sistema adicional de organización y almacenamiento de los datos clínicos y de imagen de cada paciente. Así en la Figura siguiente se incluye un ejemplo de una de las ventanas con diferentes tipos de datos e imágenes que pueden ser almacenados en CADS para cada paciente

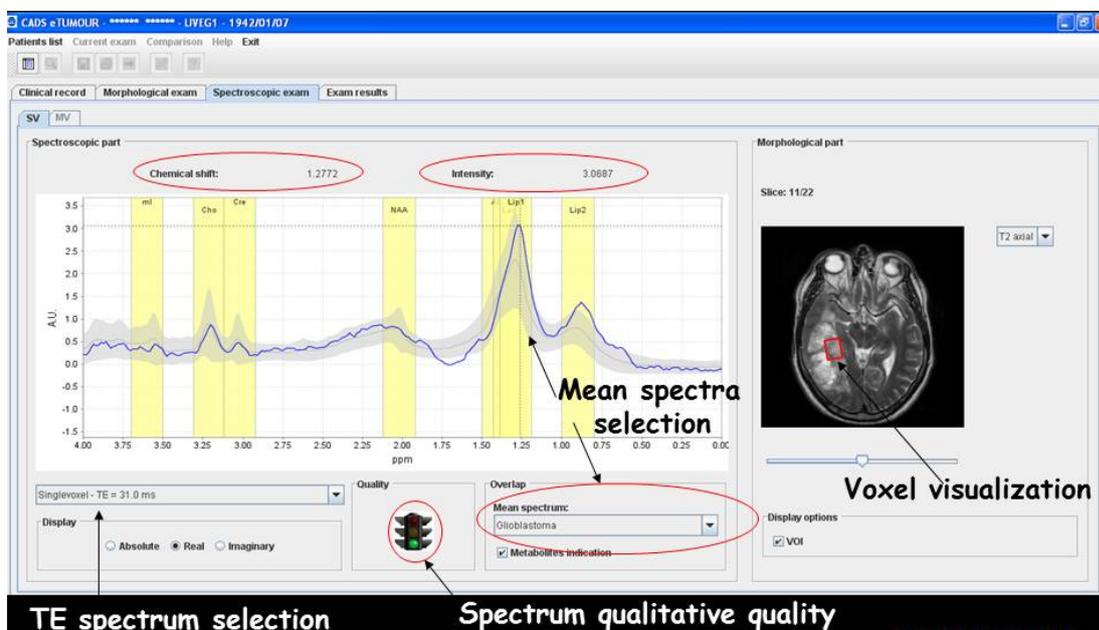


**Figura 4.-** Ejemplo del sistema de almacenamiento y visualización de datos clínicos e imágenes incluidos en el CADS

Una de las contribuciones mas singulares del programa CADS es el procesado automático de los datos en función tiempo de ERMN in vivo de voxel único, incluyendo, además de la localización del voxel, un control cualitativo (usando como referencia la información proporcionada por señales tipo semáforos) de la calidad de los espectros. En las figuras siguientes se incluye el esquema del proceso matemático para la aplicación de las transformadas de Fourier para la obtención automática de los espectros, así como un ejemplo de ventana que recoge los espectros transformados, las imágenes y localización del voxel así como el control cualitativo de la calidad de los espectros.

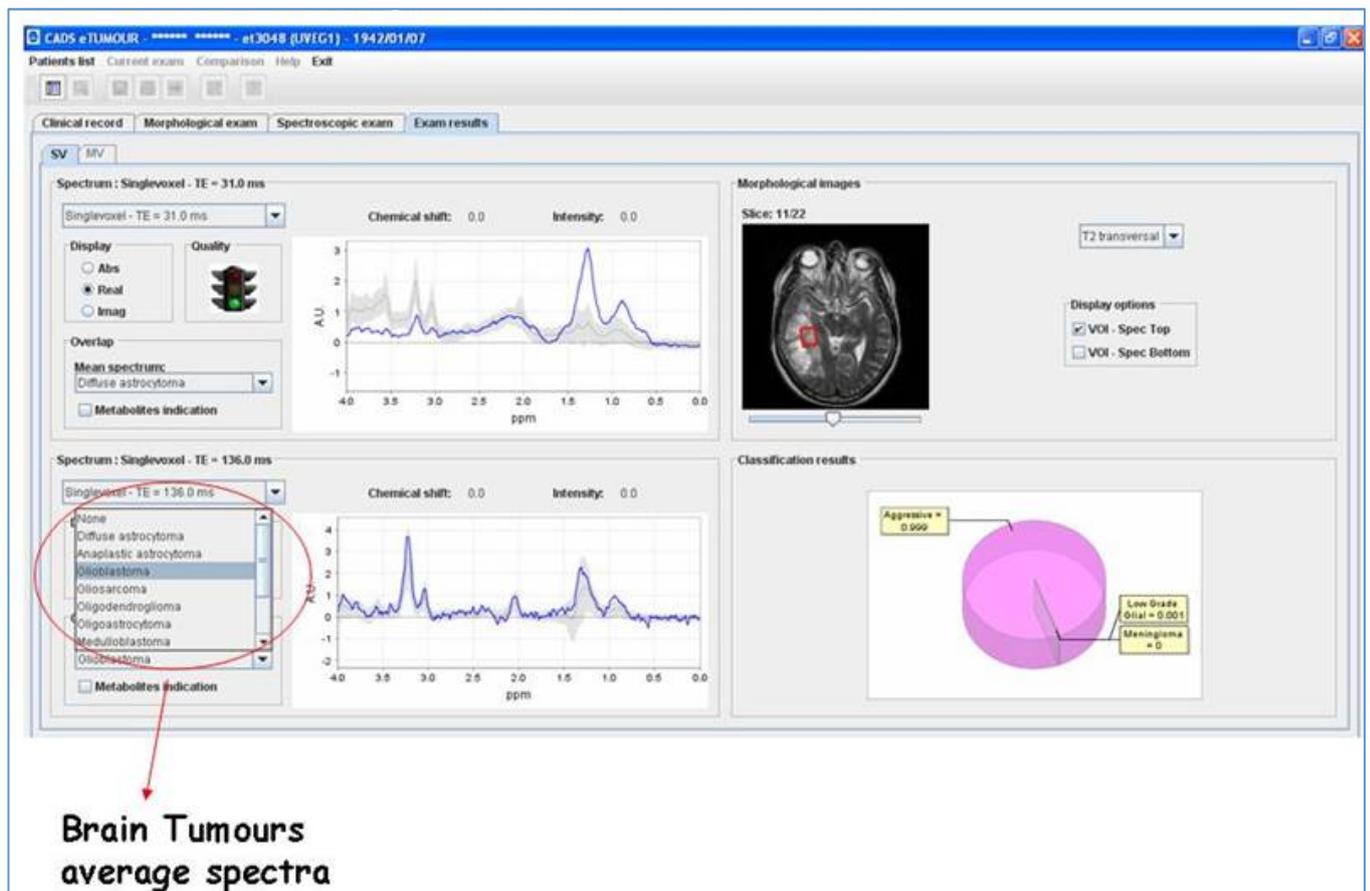


**Figura 5.-** Esquema del proceso automático para aplicación de las transformadas de Fourier para la obtención de los espectros ERMN in vivo de volumen único.



**Figura 6.-** Ejemplo de resultado de transformación automática de un espectro de volumen único (TE 31 ms), localizado en la imagen T2 en la parte derecha. Además, se incluye la distinción de la calidad del espectro, en este caso adecuada con luz verde. Asimismo, además del espectro se incluye, a modo comparativo, el valor promedio de los espectros de GBM. También se identifican las regiones de resonancia de los metabolitos mas frecuentes.

Obviamente, la principal aplicación, además de las ya comentadas, del programa CADs es la capacidad de clasificación de los tumores cerebrales como apoyo al diagnóstico de los mismos. En el proyecto eTUMOUR (96,97) se desarrolló un algoritmo que permite comparar los perfiles metabólicos respecto al diagnóstico clínico de los tumores del SNC y cuya información de salida es la clasificación de los mismos. La clasificación así obtenida puede ser usada como apoyo al diagnóstico final para dichos tumores. En la figura siguiente se incluye un ejemplo de clasificación obtenida mediante el CADs, concretamente de un GBM. Como se comprueba de dicha figura, la clasificación obtenida mediante la aplicación del CADs es 0.999 agresivo lo que concuerda con el diagnóstico clínico de GBM (98,99)



**Figura 7.** Ejemplo de visualización de clasificación de tumores del SNC mediante el programa CADs. Parte izquierda superior: calidad de los espectros, en este caso adecuada; Parte izquierda inferior: ventana de selección de promedio de espectros según tipo de tumor del SNC, en este caso se ha elegido Glioblastoma. Parte central: espectros ERMN voxel único: superior TE corto (31 ms) e inferior TE largo (TE 136 ms). Parte derecha superior imagen T2 con la localización del voxel. Parte derecha inferior resultado de la clasificación tanto en forma gráfica como detallada.

### 3.1.2.- Imágenes nosológicas en el diagnóstico diferencial entre lesiones solitarias de GBM y metástasis

#### - Pacientes

En este estudio se han considerado los datos de 15 pacientes con tumor cerebral, antes de tratamiento (9 varones, 6 mujeres; edad de los pacientes 46-72; edad promedio 60,1 años) (Tabla 1). Nueve de los pacientes fueron diagnosticados como GBM y seis como lesión solitaria de metástasis (las localizaciones del tumor primario fueron: colon, pulmones, mama y desconocido), todos fueron confirmados por histopatología de los especímenes de resección tumoral o biopsia dentro del protocolo de la rutina clínica preoperativa de RMI y de ERM. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado, de acuerdo con las normas del comité ético de la Universitat de Valencia, siendo las muestras obtenidas tras cirugía resectiva tumoral en el Hospital La Ribera. Los 15 casos incluidos en el estudio corresponden a aquellos con la suficiente calidad en los datos de ERMI como para generar imágenes nosológicas con elevada resolución.

**Tabla 1.-** Patología (localización del tumor primario), edad y sexo para los 15 pacientes

CASO	PATOLOGIA (localización tumor primario)	EDAD	SEXO
1	Glioblastoma (.)	71	Mujer
2	Glioblastoma (.)	64	Varón
3	Glioblastoma (.)	64	Varón
4	Glioblastoma (.)	58	Varón
5	Glioblastoma (.)	62	Varón
6	Glioblastoma (.)	67	Varón
7	Glioblastoma (.)	60	Mujer
8	Glioblastoma (.)	72	Varón
9	Glioblastoma (.)	71	Mujer
10	Metastasis (desconocido)	50	Varón
11	Metástasis (colon)	46	Hombre
12	Metástasis (pulmón)	51	Hombre
13	Metástasis (mama)	54	Mujer
14	Metastasis (desconocido)	56	Mujer
15	Metástasis (pulmón)	52	Mujer

## Método adquisición de los datos RMI/2D-TSI

Los datos de RMI y 2D-TSI se obtuvieron en un equipo 1.5 T Philips Achieva (Philips Medical Systems, Holanda). El protocolo de RMI y 2D-TSI ya ha sido descrito en el apartado 3.1.1.

Los espectros de ERM se transformaron evitando las dificultades de fase de los mismos y de la integración de los picos y se usaron para estimar las concentraciones de Colina (entre 3,1-3,3 ppm), Creatina (entre 2,9-3,1 ppm) y N-acetilaspártato (entre 1,9-2,1 ppm) utilizando el programa Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, USA).

Los cocientes Co/Cr y Co/Naa se han calculado dividiendo las integrales de las señales de los metabolitos en el mismo espectro ERM. Además, para cada paciente se han promediado los cocientes Co/Cr y Co/Naa pertenecientes a los vóxeles en la región de realce tumoral, en el área peritumoral (es decir, imágenes hiperintensas potenciadas en T2, pero no con realce en imágenes potenciadas en T1 post-Gd) y las regiones con no-realce/no hiperintensas en T2. Dichas áreas fueron definidas manualmente por neuroradiólogos experimentados del Servicio de Radiología del Hospital La Ribera-Alzira usando todas las imágenes RMI que estaban incluidas en el grupo de vóxeles de 2D-TSI. Posteriormente, se compararon los valores de los cocientes para así diferenciar los tipos de tumor investigados. Se llevó a cabo un análisis estadístico basado en el test de Kruskal-Wallis y el procedimiento de comparación múltiple de Tukey (111,112).

### - Método umbral

El propósito del método umbral consistió en estratificar los vóxeles de las imágenes de espectroscopía 2D-TSI en dos categorías: afectada y no afectada. Se ha aplicado el método automático de Otsu para el mapa colina/N-acetil aspártato (Co/NAA) para cada paciente para así calcular un umbral óptimo, de tal manera que los vóxeles con cocientes no normales se pudieran separar de aquellos con valores normales (95). Esta aproximación requiere vóxeles tanto los afectados, así como los no afectados en el interior del volumen rectangular. El objetivo del método es encontrar el umbral que minimice la varianza dentro de las clases, lo que ha demostrado ser equivalente a maximizar la varianza entre clases. Usando  $2 T$  para la varianza total y  $2 B$  para la varianza entre las clases, se maximiza la siguiente función

$$t^* = \arg \max_t \frac{\sigma_B^2}{\sigma_T^2},$$

donde  $t^*$  es el umbral óptimo. Una vez fijado  $t^*$ , el valor final de salida del método umbral es un mapa binario, que indica los vóxeles con cocientes de Co/Naa normales y no normales. La selección del umbral mediante el método Otsu es una técnica eficiente debido a su naturaleza recursiva. El mapa binario se ha usado para visualizar la infiltración en las imágenes nosológicas.

#### - Imágenes Nosológicas

En una imagen nosológica se resume la presencia de diferentes tipos de tejidos y lesiones en una imagen mediante un código de color que se asigna a cada voxel de acuerdo con el tipo de tejido (115,116).

En la referencia (117) se propuso una técnica de imagen nosológica combinando métodos de procesado de imagen así como de reconocimiento de patrones para segmentar y clasificar tumores cerebrales en función de los datos de RMI y ERMI. En primer lugar, se usa un atlas digital del cerebro en combinación con la información previa de tejido no normal, a partir de datos de ERMI, para segmentar de los datos de RMI. Después, el tejido no normal detectado se clasifica en base reconocimiento de patrones supervisado de los datos de espectroscopía. En esta parte del trabajo de investigación de esta tesis, también se generan imágenes nosológicas, pero sólo se utilizan los datos de salida del primer paso (es decir segmentación de RMI) del método de imagen nosológica. El procedimiento real de segmentación consiste en dos etapas: detección del tejido no normal y reclasificación con restricciones espaciales y geométricas.

El tejido no normal se ha detectado mediante un procedimiento iterativo. Los píxeles en las regiones de elevada seguridad de diagnóstico se muestrearon usando probabilidades posteriores, o el atlas de probabilidades en el primer proceso iterativo. Posteriormente, se usó el estimador determinante de la covarianza mínima para eliminar las muestras respecto al tejido normal que excedieran la distancia al umbral (141), después se utilizó un modelo paramétrico con el fin de estimar las funciones de densidad de probabilidad a partir de las muestras obtenidas. El atlas de datos específicos previos se actualizó con las densidades estimadas para así determinar las probabilidades posteriores. Finalmente, se realizó una corrección predeterminada del campo, estimada a partir de las probabilidades de materia blanca y gris, para así compensar las in-homogeneidades en

la imagen. La segunda etapa en el proceso de segmentación también fue iterativa y focalizada en la reclasificación con restricciones espaciales geométricas promedio de la región de competición tipo serpiente .

En este estudio se aplicó la etapa de segmentación a las imágenes potenciadas en T2, de tal manera que las regiones no normales segmentadas correspondieran con el área hipointensa de T2. Después, el mapa binario, obtenido mediante la aplicación del umbral de Otsu, ya mencionado, al cociente  $C_0/N_{aa}$  estimado a partir de los datos de 2D\_TSI, se superpuso a la región no normal segmentada. Los vóxeles no normales del mapa binario localizados fuera de la lesión obtenida mediante la etapa de segmentación se correlacionaron con infiltración (109).

## **3.2 RMN EX VIVO (HR-MAS)**

### **3.2.1 Correlación del perfil metabólico mediante HR-MAS de la muestra de biopsia cerebral y tipo de tejido tumoral**

#### **Adquisición de datos**

Se obtuvieron 52 biopsias de tumores del SNC con tres tipos diferentes de tumores gliales: 27 GBM, 7 con grado III (GIII) y 18 con grado II G(II). Las muestras de tejido se congelaron en nitrógeno líquido y posteriormente se guardaron a -80 C hasta el tiempo del estudio de espectroscopía. Todas muestras siguieron el protocolo de recogida de material descrito anteriormente. Se adquirieron datos 1D PRESAT (secuencia de pulso y adquisición) HR-MAS, siguiendo los protocolos del proyecto europeo eTUMOUR (<http://www.etumour.net/>) a 11,7 y 14 T (500 MHz y 600 MHz para <sup>1</sup>H) a 0-4 C de temperatura y con una velocidad de giro de 4000 Hz usando espectrómetros BRUKER Analytik GmbH.

#### **Análisis histológico**

Las muestras de tumor post estudio HR-MAS fueron congeladas y enviadas, junto a la fracción no utilizada de las muestras congeladas cuando eran disponibles, a neuropatólogos para un examen cuantitativo histopatológico. 37 de las 52 biopsias (22 GBM, 6 GIII y 9 GII) pudieron ser examinadas mediante protocolos estándar histológicos en muestras de tejido tomadas de las usadas en el estudio de HR-MAS. En función de los resultados de histología las muestras fueron consideradas con contenidos variables de tumor, periferia y/o necrosis. Para cada muestra se calculó el porcentaje de tejido predominante midiendo el área total de las secciones de la biopsia y después delineando las regiones de interés de necrosis, alta celularidad o periferia.

## **Procesado de datos**

Los espectros de HR-MAS se procesaron de la manera siguiente. Las señales se truncaron desde 8120 puntos a 2048 puntos para así disminuir la carga computacional en los pasos de pre-procesado. Los componentes de la señal del agua se eliminaron mediante la técnica HLSV-PRO (4). Se filtraron las contribuciones fuera del intervalo de frecuencias (0,25 a 4,2 ppm) para así sólo analizar la contribución de los metabolitos de interés. Una vez filtradas las señales 1D PRESAT fueron normalizadas (dividiendo por la norma L2 de la señal en dominio frecuencia entre 0,25 y 4,2 ppm), alineadas respecto al doblete de la Alanina (Ala) a 1,47 ppm (149) y la línea base se corrigió mediante el uso de una función de apodización. De esta manera se obtuvieron las señales preprocesadas. Se usó la metodología de integración de las resonancias para así extraer la concentración de los siguientes metabolitos considerados en este estudio: total del grupo de lípidos (Lips): Lip1 a 0.9ppm, Lip2 a 1.3ppm y Lip3 a 2.82ppm; N-acetilaspártato a 2.02ppm (Naa); Creatina a 3.03ppm (Cr); total grupo de Colina (tCho): Cho a 3.19ppm, PCho a 3.20ppm y GPCho a 3.23ppm. Estos metabolitos fueron seleccionados como los biomarcadores más relevantes para este estudio, en base a su potencial para informar del contenido histológico del tejido.

## **Análisis estadístico**

Como datos de entrada para el análisis estadístico se consideraron como vectores características tanto las concentraciones de los siguientes metabolitos de interés: Lip1, Lip2, Lip3, Naa, Cho, PCho, GPCho; o los cocientes de los Lips, Naa y tCho con respecto a Cr.

Con el fin de obtener información acerca de la localización y dispersión de los datos se estudió la varianza dentro de cada grupo de tumores mediante el cálculo de la mediana y el intervalo intercuartil (IQR) (150,151). Esta representación resultó útil para detectar posible sesgo en la distribución de los datos y la existencia de resultados fuera de la distribución normal.

El análisis de grupos se utilizó para la creación de agrupaciones de objetos, de tal manera que los perfiles de los objetos (vectores de características) en el mismo grupo fueran muy similares y los perfiles de los objetos en grupos diferentes fueran muy distintos. Se ha utilizado el algoritmo de agrupamiento k-promedio (152,153).

Un parámetro crítico en el agrupamiento es el número de grupos. Para minimizar la subjetividad se eligió el mejor número de grupos para los datos que manejamos, y fue estimado mediante diferentes índices estadísticos, que determinan la calidad de los grupos en base a la definición de si los objetos dentro de un grupo son similares entre sí, mientras que objetos en diferentes grupos son distintos entre sí.

Como medida final de la significación estadística de los datos analizados se evaluó la fiabilidad del grupo, o la probabilidad que el grupo no se hubiera formado por casualidad. Con este fin se calculó el valor-p (154) para cada grupo realizando el test de Kruskal-Wallis (155). Como límite superior se admitió que las clases de grupos eran significativamente diferentes con un valor-p < 0,05.

El agrupamiento de resultados en el grupo de GBM se comparó con los hallazgos histológicos (referencia estándar en la que se basa el diagnóstico en la actualidad). Los modelos de referencia de los tejidos fueron posteriormente propuestos para cada clase de tejido tumoral mediante la determinación de la media de los vectores de las características pertenecientes a la misma clase después de centrar y normalizar la secuencia de valores dentro de cada vector respecto a la media cero y una unidad de desviación estándar. Sólo se utilizaron en este paso aquellos casos para los que se obtuvo un acuerdo entre el agrupamiento y el resultado histopatológico.

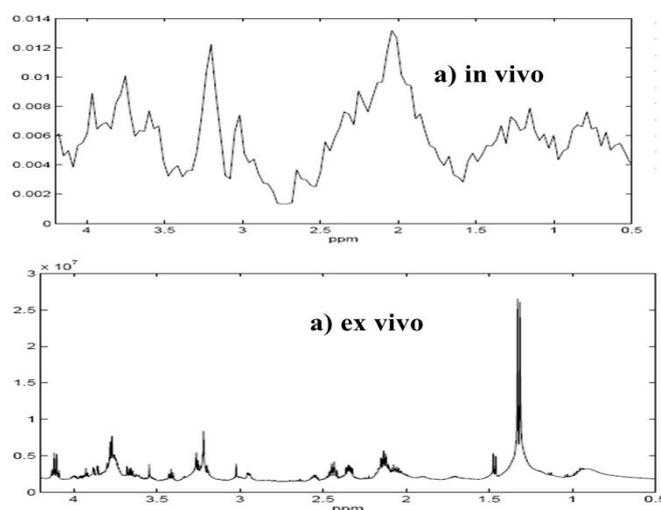
### **Generalización a gliomas de bajo grado**

Uno de los objetivos de este estudio es analizar hasta qué punto la composición molecular depende de manera importante con las características del tejido considerado o con el tipo de tumor y grado. Se ha investigado si se observa el mismo comportamiento de los metabolitos para todos los casos considerados en este estudio. Con este propósito, a cada caso dentro de los grupos GII y GIII se le asigna una clase de tejido con la mejor correlación, mediante el cálculo del coeficiente de correlación entre el vector característico extraído de los espectros HR-MAS y los modelos de referencia de los tejidos previamente obtenidos en el grupo GBM. Posteriormente se asignan los tipos de tejido tumoral con el mayor coeficiente de correlación a cada uno de los casos y se comparan los resultados con el análisis histopatológico.

### 3.2.2.- Clasificación metabólica ex vivo (HR-MAS) de tumores del SNC

Se obtuvieron biopsias de tumores del SNC de 59 pacientes que fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las biopsias se clasificaron en 4 grupos de tumores del SNC: 22 glioblastomas (GBM), 21 gliomas grado II y III (GLI), 7 metástasis (MET) y 9 meningiomas (MEN). Se adquirieron espectros 1D PRESAT HR-MAS (espectros de protón ( $^1\text{H}$ ) de una dimensión con presaturación de agua), descritos en el apartado de metodología general a un campo magnético de 11.7 T (500 MHz para  $^1\text{H}$ ) usando un espectrómetro de RMN Bruker Analytik GmbH.

La comparación entre los espectros in vivo y ex vivo (Figura I, a) in vivo y b) ex vivo) permite observar discrepancias suficientes, en cuanto a relación señal/ruido (S/N) y resolución (anchura de las resonancias) que justifican la necesidad de un tratamiento de los datos originales, función tiempo, diferente para ambas secuencias, en otras palabras, una metodología de pre-procesado distinta para ex vivo. La cuantificación de los espectros de HR-MAS es particularmente exigente debido a la complejidad inherente de dichos espectros, con bastantes solapamientos de picos. Sin embargo, los espectros HR-MAS presentan una relación S/N mucho mayor que los espectros in vivo y a su vez la distorsión por la presencia de macromoléculas no se extiende a lo largo de todo el espectro, en especial en las regiones de interés. No obstante, en su lugar, aparecen algunos ensanchamientos originados por los ácidos grasos en algunas regiones de frecuencias concretas (especialmente alrededor de 1,3 ppm y 2,05 ppm). Además, los espectros de HR-MAS no se ven afectados por los efectos de las corrientes de Eddy (residuos de gradientes de campo utilizados en MRI que no desaparecen totalmente).



**Figura 8.-** Espectros in vivo (a) y ex vivo (b) de la región de interés en unidades de magnitud arbitrarias. El espectro es del mismo paciente con meningioma.

La señal del agua, 10.000 veces más intensa que la de los metabolitos, se eliminó mediante la técnica HLSVD-PRO (156). Las señales de los espectros presat 1D filtrados: i) se normalizaron, es decir se dividieron por el valor normal de la señal en el dominio frecuencia en la región entre 0,25 y 4,2 ppm, en donde se encuentran las resonancias de interés; ii) se alinearon y iii) y se corrigió la línea base para así obtener las señales pre-procesadas ya útiles para ser analizadas por métodos estadísticos apropiados.

La adecuada extracción de las características diferenciales entre los diversos perfiles metabólicos resulta un objetivo fundamental, pero a su vez es complejo. Para tal fin, y para lograr la diferenciación óptima entre los perfiles metabólicos de los distintos tipos de tumores del SNC aquí considerados, se aplicaron diversos métodos de procesado o de selección de características: i) el espectro completo de la región de interés (entre 0,25 y 4,2 ppm); ii) integración de las resonancias (cálculo del área); y iii) un método automático de cuantificación diseñado para espectros obtenidos a tiempo de eco corto ( $TE < 40$  ms) AQSES (6)

i) Análisis del espectro global en la región de interés

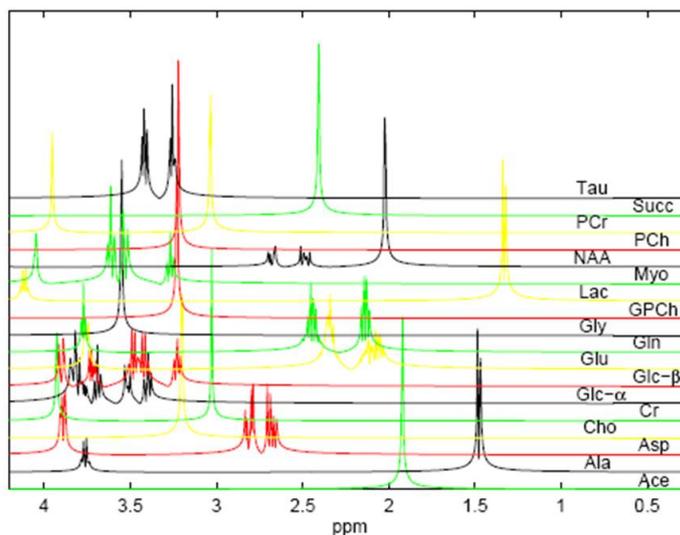
Se considera como característica de análisis cada punto en la región de interés (entre 0,25 y 4,2 ppm) de los espectros de magnitud

ii) Integración de picos

Los valores de la integración de 18 picos se han extraído para cada espectro de magnitud en los siguientes intervalos de ppm: [1.45 1.47], 81 [1.88 1.94], [1.99 2.03], [2.1 2.14], [2.22 2.32], [2.39 2.49], 82 [3.01 3.05], [3.19 3.21], [3.21 3.23], [3.23 3.25], [3.255 3.275], [3.4 3.44], [3.52 3.56], [3.58 3.64], [3.75 3.79], [3.91 3.95], [4.03 4.07], [4.095 4.155]. Este método se usa habitualmente en in vivo ERM y es menos sensible al ruido y a los problemas de ajuste de alineación que el anterior.

iii) AQSES

AQSES es un método de cuantificación en la función tiempo diseñado para espectros in vivo ERM de TE corto. La dificultad de la cuantificación se formula matemáticamente separadamente como un problema de ajuste mediante mínimos cuadrados no lineales, que se soluciona usando un procedimiento modificado de proyección de variable. Las cantidades de interés, es decir, las áreas de las señales de los metabolitos, son los coeficientes de ponderados de una combinación lineal de 18 perfiles de metabolitos simulados que constituyen el conjunto de base (ver Figura II): Acetato (Ace), Alanina (Ala), Aspartato (Asp), Colina (Cho), Creatina (Cr), Glucosa-b (Glc-b), Glucosa-a (Glc-a), Glutamato (Glu), Glutamina (Gln), Glicina (Gly), Glicerofosfolina (GPCh), Lactato (Lac), Mio-Inositol (Myo), N-Acetylaspartato (NAA), Fosfocreatina (PCr), Fosforilcolina (PCh), Succinato (Succ) y Taurina (Tau). Las resonancias para este juego base de metabolitos se simuló mediante cálculos mecánico cuánticos usando el método descrito en (7). Las fases de los espectros simulados de los metabolitos son iguales, mientras que las correcciones por amortiguación y por desplazamiento de frecuencia se han dejado libres. La principal ventaja de este método respecto a los previos considerados es que permite desenredar el solapamiento de las señales de los metabolitos (ver Figura I (b)). En bastantes de las regiones, para la integración de los picos se calculará el área considerando la contribución de diversos metabolitos juntos, perdiendo, por lo tanto, información acerca de los metabolitos individuales.



**Figura 9.-** Conjunto de base de perfiles de metabolitos usado para AQSES (espectros magnitud)

Para la clasificación de los perfiles metabólicos se usaron dos métodos supervisados de aprendizaje: i) análisis clásico lineal discriminante (LDA) y ii) la maquinaria vectorial de soporte de mínimos cuadrados (LS-SVM), este método permite el manejo como entrada de vectores de alta dimensionalidad. Para cada par de clases de tumores del SNC considerados, la extracción de características metabólicas y los métodos de clasificación se comparan usando muestreo aleatorio estratificado. Los datos obtenidos después del procesamiento de las señales se separan aleatoriamente 100 veces en una forma estratificada en un conjunto de entrenamiento y validación (por ejemplo 2/3 de los datos), y uno de control (por ejemplo 1/3 de los datos). Asimismo, para cada par de clases y para cada procedimiento de análisis estadístico se obtiene la precisión en la clasificación.

### **3.3 DESARROLLO DE LA MICROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA (EMRI) COMO SOPORTE AL DIAGNÓSTICO DE GLIOMAS CEREBRALES**

Este estudio (157) fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de la Ribera. Las biopsias usadas en este estudio proceden de pacientes que fueron sometidos a resección quirúrgica de un tumor cerebral. Una parte de la biopsia de tejido se almacenó a -80°C hasta que se realizó el estudio de microscopía de RMN. Otra porción se sometió a análisis histológico de rutina para el diagnóstico clínico. Los tumores fueron identificados como GBM (5 muestras de 9.8 a 49 mgr de peso).

Las muestras fueron estudiadas por MRS (Resonancia Magnética Espectroscopía) y MRI (Resonancia Magnética microscopía) en una bobina de 14 T (Avance DRX 600 espectrómetro, Bruker, Rheinstetten, Alemania) que opera a 600,13 MHz para <sup>1</sup>H y conectado a una consola de microimagen con un sistema de gradiente de 300 G / cm a 60 A de corriente (Bruker Biospin). El instrumento estaba equipado con un orificio estándar Micro 5 probehead de formación de imágenes con inserciones de RF de 5 mm (para muestras 1-3 ) y 10 mm (para las muestras 4 y 5). Una unidad externa de refrigeración Bruker Unidad controla la temperatura durante la adquisición.

#### **Manejo de la biopsia cerebral y Preparación de las muestras**

Cada muestra se estudió en fresco, sin ningún otro tratamiento que la ultracongelación después del proceso quirúrgico. No se usaron fijadores ni contrastes. Las muestras se introdujeron en tubos de RMN de 5 o 10 mm, según el tamaño de la muestra de tejido. Dentro de los tubos, las muestras se sumergieron en PBS fresco para evitar el daño salino del tejido así como para obtener alta cantidad de señal de protones para preparar y realizar el estudio MRI y MRS. La sonda se preenfria antes de introducir las muestras para reducir al mínimo los efectos de la degradación del tejido. La adquisición se llevó a cabo a una temperatura teórica de 3°C. Este valor corresponde a la temperatura medida del termopar, pero la medición interna utilizando una muestra de metanol 100% proporcionó un valor interno corregido de 4°C.

## **Técnica RMN**

La secuencia Ortogonal FLASH (Fast low-angle shot) fue usada para la obtención de las imágenes y para la ubicación inicial de la muestra dentro del tubo así como la inspección de la posición de la muestra dentro de la sonda (campo de visión de 10x10 mm, tamaño de la matriz de 128x128 elementos, grosor de corte de 1 mm, TR / TE 100 / 5 ms, 4 medias, 51 segundos).

La secuencia Multicorte RARE (adquisición rápida con la mejora de relajación) se usó para la adquisición de las imágenes en los tres planos en un tiempo de adquisición corto (13 minutos) para lograr un mejor detalle antes de planificar las imágenes de alta resolución (campo de visión 4,5x4,5 - 6.5x6.5 mm, matriz de 256x256, TR / TEF 4200/36 ms, factor poco comunes 8, 8 promedios, 13 minutos). Estas imágenes RARE tenían 500 micras de espesor y la resolución espacial en el plano fue de 16x16 m.

Las Secuencias RARE multicorte también fue utilizadas para la obtención de las imágenes de mayor resolución con un grosor de corte de 50 micras (campo de visión 4,5x4,5 - 6.5x6.5 mm, matriz de 256x256, TR / TEF 4630/36 ms, factor RARE 8, 128 medias ). La resolución espacial de resonancia magnética alcanzado fue de 16x16x50 m

## **Técnica RMN Espectroscopia**

La técnica de voxel único y multivoxel fueron realizadas para todas las muestras tumorales con secuencia de espectroscopia PRESS (Point RESolved Spectroscopy).

Un corte multivoxel se localizó en la muestra, en paralelo se obtuvo imágenes de alta resolución RARE, incluyendo el tejido y la solución que la contiene. El grosor del corte fue de 500  $\mu\text{m}$ , la resolución fue de 250x250x500  $\mu\text{m}$  (0.031  $\mu\text{L}$  de volumen) . El procedimiento FASTMAP (158) ( aplicando un primer y Segundo algoritmo ) se uso para una homogenización de campo adecuada.

La suppression de agua se consiguió con una secuencia de pulso de VAPOR (159). TE fue 12 ms y TR 2100 ms con puntos 2K en el tiempo.

Las SV ( tamaño que va de 1x1x1 mm, 1  $\mu\text{L}$  a 2x2x2 mm, 8 $\mu\text{L}$  TR7TE 2100/12 ms) fueron localizados el los tejidos de cada muestra. Con el propósito de optimizar los ajustes de campo magnético locales (“shims”), se realizó un ajuste “shim” en un

volumen seleccionado para SV antes de la adquisición. Se usó la secuencia VAPOR para la supresión de la señal del agua. El ancho spectral fue 10 ppm/6000 Hz y el número de puntos fue de 4k.

### **Estudio Histológico**

Las muestras se sometieron a histología convencional después del estudio de microscopía de resonancia. Sumergiéndose en 10% de formalina en el interior de los tubos de RMN. Una vez fijado el tejido , se incluyeron en parafina, y las piezas de tejido se seccionaron en series de cortes de 5 micras y tenidas con hematosilina eosina .

## 4 RESULTADO Y DISCUSIÓN

Con el fin de facilitar la lectura de esta Tesis así como la interpretación de los datos obtenidos se redactan los resultados y la discusión por cada uno de los apartados estudiados.

### 4.1. ESPECTROSCOPIA de RMN IN VIVO (ERMN)

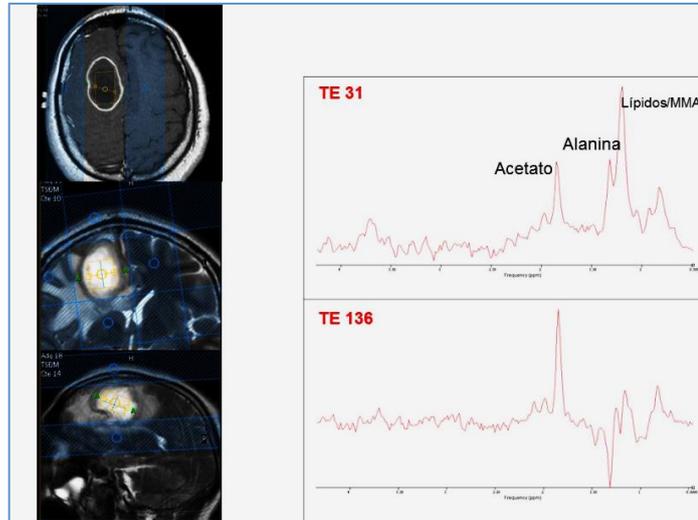
#### 4.1.1 Diseño y aplicación de un nuevo protocolo de ERM el diagnóstico diferencial entre los diferentes tumores gliales

En primer lugar, y con el fin de verificar la posibilidad de apoyo al diagnóstico por parte de la ERMN y ERMI se analizarán los perfiles metabólicos de diversos tipos de lesiones del SNC. Específicamente, y entre las más comunes: abscesos, infartos, lesión desmielinizante y tumores gliales. Posteriormente, la metodología propuesta en esta tesis para una localización más apropiada de la región de máxima celularidad, será aplicada con el fin de obtener una diferenciación mas precisa de la agresividad de los tumores gliales mediante el perfil metabólico del volumen único.

#### Diferenciación entre lesiones gliales y no gliales

Un paso más , previo a la generalización de la ayuda de los perfiles metabólicos in vivo mediante ERMN al diagnóstico de tumores cerebrales, es la verificación de la diferenciación mediante ERMN entre las lesiones no gliales y las gliales. En este apartado se mostrará, a modo de ejemplo, de manera directa y resumida la diferencia neurometabólica entre diferentes tipos de lesiones no gliales, abscesos, infartos, lesión desmielinizante, gliomatosis cerebri y tumores gliales.

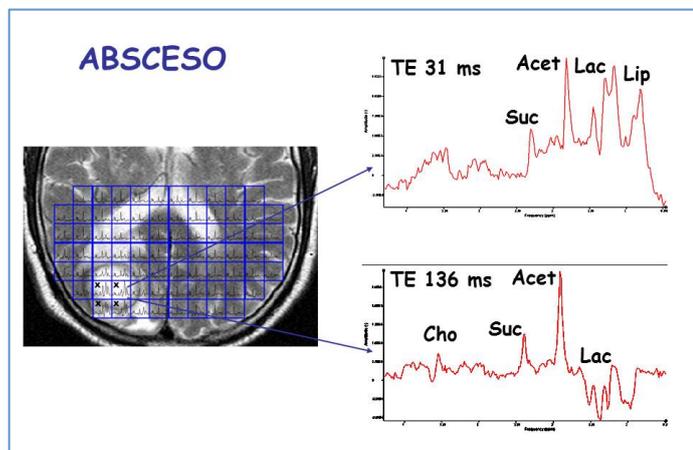
Como primer ejemplo de lesión no glial se considerarán dos tipos de absceso anaeróbico y aeróbico. En algunas ocasiones estas lesiones pueden no ser claramente diferenciables mediante imágenes T1 y T2. No obstante, y como se puede comprobar en la siguiente figura (Figura 10) el espectro de volumen único es completamente diferente al observado en tumores gliales. Basta comparar de manera cualitativa el perfil metabólico de las figuras 7 y 8 con la correspondiente al absceso figura 10.



**Figura 10.-** Ejemplo de perfil metabólico de un absceso anaeróbico. Parte izquierda: Imágenes RMI axial, coronal y sagital, incluyendo la localización del voxel de volumen único, cuadrado amarillo. Parte derecha: espectros con TE de 31 y 136 ms. Se incluyen las etiquetas de los metabolitos más representativos: Lípidos/MMA, Alanina y Acetato.

Como se puede claramente observar en los espectros del absceso anaeróbico de la figura anterior, no son detectables las resonancias de los neurometabolitos típicos del tejido cerebral incluso de lesiones gliales. Específicamente, no se observan las señales de NAA (2,02 ppm), Cr (3,01 ppm), Co (3,20 ppm) y mI (3,57 ppm). En cambio si se pueden asignar a la resonancia de Alanina (Ala) a 1,47 ppm, que aparece como un doblete invertido a TE 136 ms, y Acetato a 1,98 ppm. Este perfil es típico de abscesos anaeróbicos (9-11).

En la figura 11 se muestra otro ejemplo diferencial de perfil metabólico entre absceso, en este caso aeróbico y tumores gliales, figuras comentadas en el párrafo anterior. Así, se puede comprobar que tampoco se observan las resonancias de NAA, Cr, Co y mI y en cambio aparecen otras diferentes

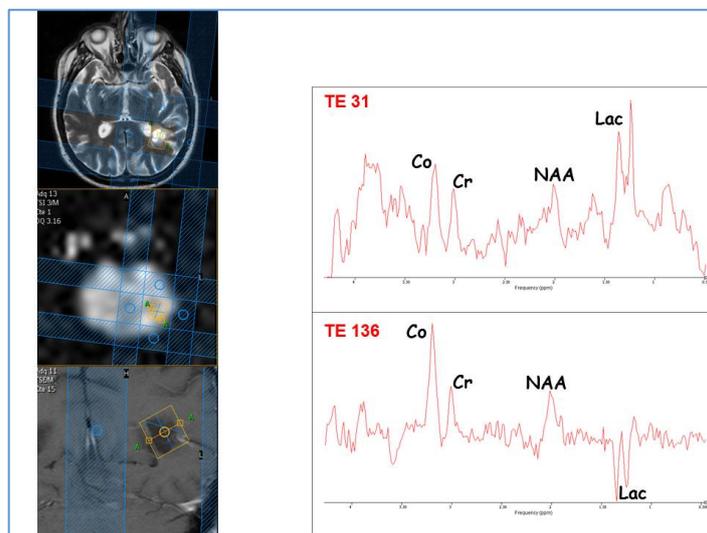


**Figura 11.-** Ejemplo de perfil metabólico de un absceso aeróbico. Parte izquierda: Imagen T2 RMI axial superpuesta con enrejillado de vóxeles de la ERMI. Parte derecha: espectros con TE de 31 y 136 ms del voxel indicado por las flechas y representativo de la parte central de la lesión. Se incluyen las etiquetas de

los metabolitos más representativos: Lípidos (Lip), Lactato (Lac), doblete a TE 136 ms, Acetato (Acet) y Succinato (Suc).

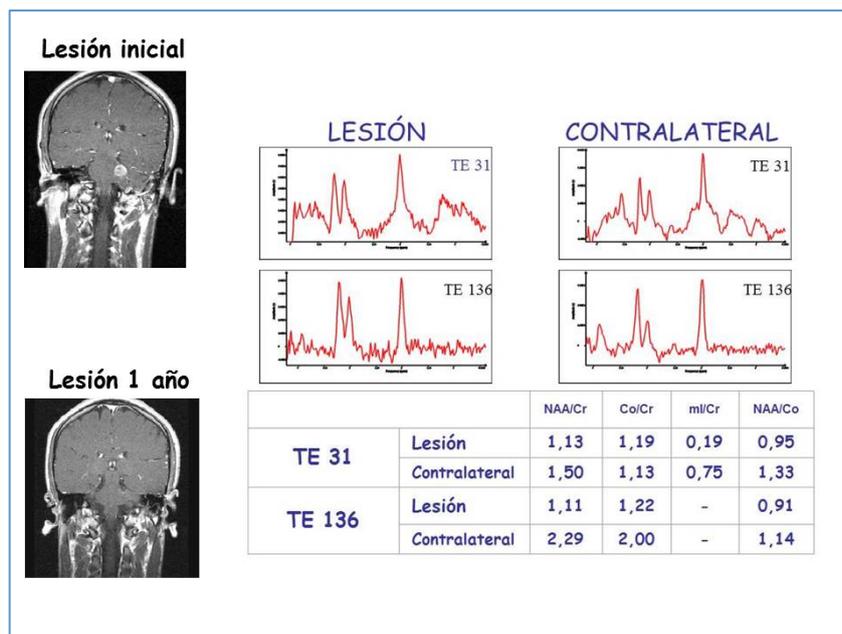
Además de la potencial diferenciación entre abscesos y tumores gliales, las figuras 10 y 11 muestran la capacidad de la ERMN, tanto volumen único como ERMI, para diferenciar entre abscesos anaeróbicos y aeróbicos. En este último, además de la práctica ausencia de las resonancias de NAA, Cr, Co y mI, se puede observar dos metabolitos distintos a los hallados en el absceso anaeróbico, como son Lac y Succinato, moléculas diferenciales en los abscesos anaeróbicos (9-11).

Los infartos constituyen otras de las lesiones cerebrales que en numerosas ocasiones no son fácilmente diferenciables de tumores gliales de bajo grado mediante las técnicas estándar de imagen T1 y T2. En la figura siguiente (Fig 6.1.1.6) se muestra un ejemplo del perfil metabólico asociado a un infarto. Como se puede comprobar existe una disminución importante de la cantidad NAA, un muy ligero incremento de Co y un aumento muy pronunciado de la concentración de Lactato (Lac), fácilmente identificable por el doblete centrado en 1,30 ppm e invertido a TE 136 ms (12). Otra diferenciación entre infarto y glial de bajo grado es la cantidad de mio-inositol presente en tumores gliales de bajo grado.



**Figura 12.-** Ejemplo de perfil metabólico de un infarto. Parte izquierda: Imagen T2 RMI axial, localización mediante ERMI y visualización del voxel en imagen T1. Parte derecha: espectros con TE de 31 y 136 ms del voxel indicado por las flechas y representativo de la lesión. Se incluyen las etiquetas de los metabolitos más representativos: Lactato (Lac), doblete invertido a TE 136 ms, NAA, Cr y Co.

Las lesiones desmielinizantes pueden constituir en algunos casos otro reto para un diagnóstico diferencial respecto a tumores gliales de bajo grado mediante imágenes estándar T1 y T2. En la figura 13 se presenta un ejemplo de lesión desmielinizante para su diagnóstico diferencial respecto a encefalomiелitis diseminada o tumor glial de bajo grado.

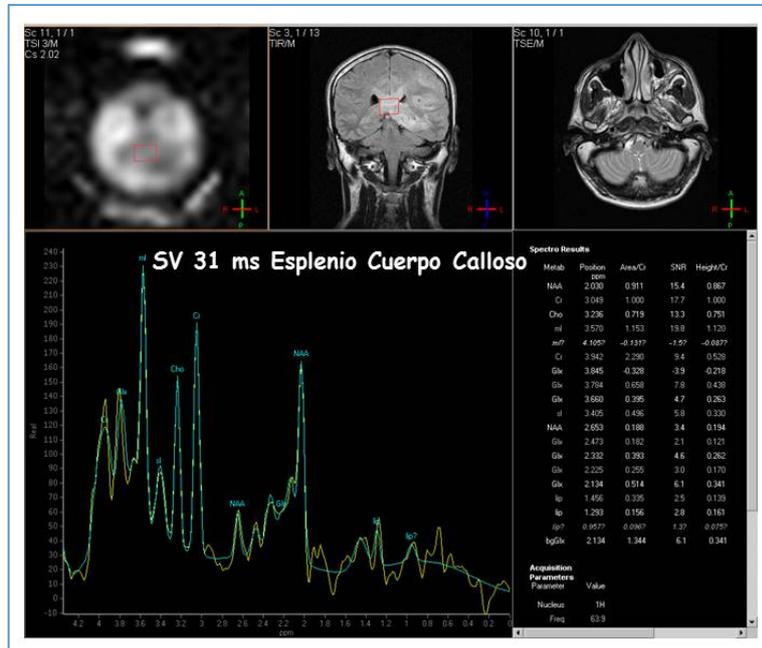


**Figura 13.-** Ejemplo de perfil metabólico de lesión desmielinizante. Parte izquierda: Imagen coronal de la lesión, parte superior inicial, parte inferior al año y después de tratamiento con corticoides. Parte derecha superior: espectros a TE 31 y 136 ms de la lesión y de la región contralateral. Parte derecha inferior: tabla con las relaciones de los metabolitos NAA, Co y ml respecto a Cr así como el cociente NAA/Co.

Este caso constituye otro ejemplo de la capacidad de ayuda de los perfiles metabólicos mediante ERM al diagnóstico diferencial entre lesiones cerebrales. En este caso clínico, los perfiles metabólicos, en particular los valores cuantitativos de relaciones respecto a Cr de NAA, Co y ml, dirigían el diagnóstico hacia una lesión desmielinizante (13). La evolución del paciente a partir del tratamiento durante 6 semanas con corticoides y la total desaparición de la lesión justificaban el diagnóstico de lesión desmielinizante propuesto a partir de los perfiles metabólicos obtenidos en la lesión. Asimismo, pone de relieve otra característica de la aplicabilidad de la técnica ERM tanto de volumen único como multivoxel, el apoyo al diagnóstico en aquellas localizaciones, como en este caso pedúnculo, en donde la realización de la biopsia resulta muy comprometida.

Finalmente, la gliomatosis cerebri es otro tipo de lesión en la que los perfiles metabólicos mediante ERMN pueden aportar una ayuda relevante para el diagnóstico

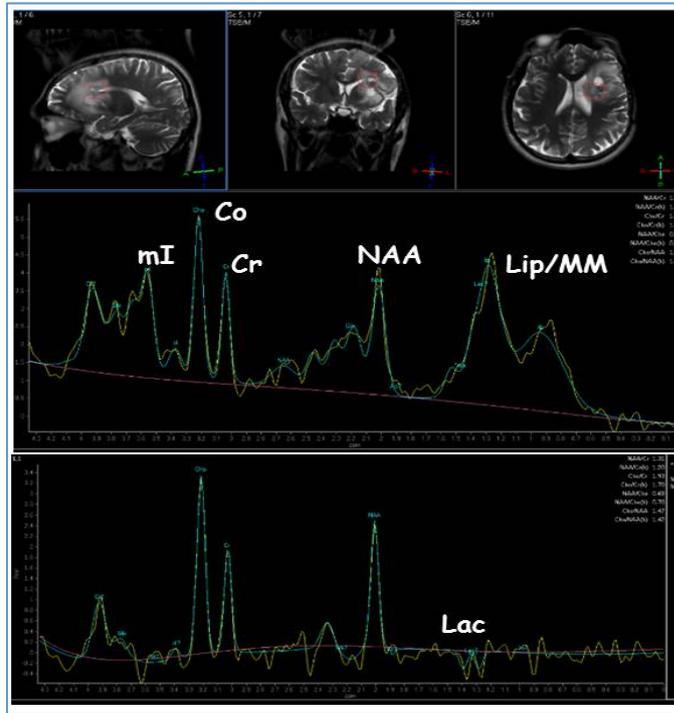
diferencial respecto a tumores gliales. En la figura 14 se incluye un ejemplo de perfil neurometabólico de una lesión tipo gliomatosis cerebri.



**Figura 14.-** Ejemplo de perfil metabólico de lesión gliomatosis cerebri. Parte superior de izquierda a derecha: imagen de ERMI, imagen T1 coronal incluyendo la localización del voxel de volumen único (cuadrado en rojo) e imagen axial T2. Parte inferior: espectro a TE 31 del volumen único localizado en la imagen central de la parte superior. Las resonancias mas intensas corresponden a NAA, Cr, Co y mI.

Como se puede observar en la figura anterior el perfil metabólico de las lesiones gliomatosis cerebri resulta bastante diferente a los observados en las lesiones previamente consideradas, abscesos, infartos y desmielinizantes así como a los tumores gliales, ver a modo de ejemplo la figuras 1 y 2. Como hechos metabólicos mas significativos podríamos destacar la destrucción neuronal, disminución de NAA, ausencia destacada de procesos de celularidad , sin incremento aparente de la concentración de Co y un aumento significativo de la osmolaridad, cantidad relevante de mI (14).

Como ejemplo comparativo, en la figura siguiente (Figura 15) se incluye el perfil metabólico de un tumor glial de grado bajo.



**Figura 15.-** Ejemplo de perfil metabólico de lesión glial grado bajo (II). Parte superior imágenes T2 sagital, coronal y transversal de la lesión. Parte media: espectro a TE 31 del volumen único localizado en la lesión; parte inferior: espectro a TE 136ms. Las resonancias mas intensas corresponden a Lip/MM, NAA, Cr, Co y mI, así como el doblete invertido a Lac en TE 136 ms.

La diferencia cualitativa y/o cuantitativa entre los perfiles metabólicos de las diferentes lesiones consideradas en este apartado, abscesos, infartos, desmielinizantes, gliosis cerebri y tumor glial es significativa, lo que ha permitido, en particular mediante el análisis cuantitativo de las señales de los distintos metabolitos (Lip/MM, NAA, Cr, Co, mI, Lac, Suc, Ace, ...), una diferenciación bastante precisa entre los mismos y un apoyo al diagnóstico radiológico.

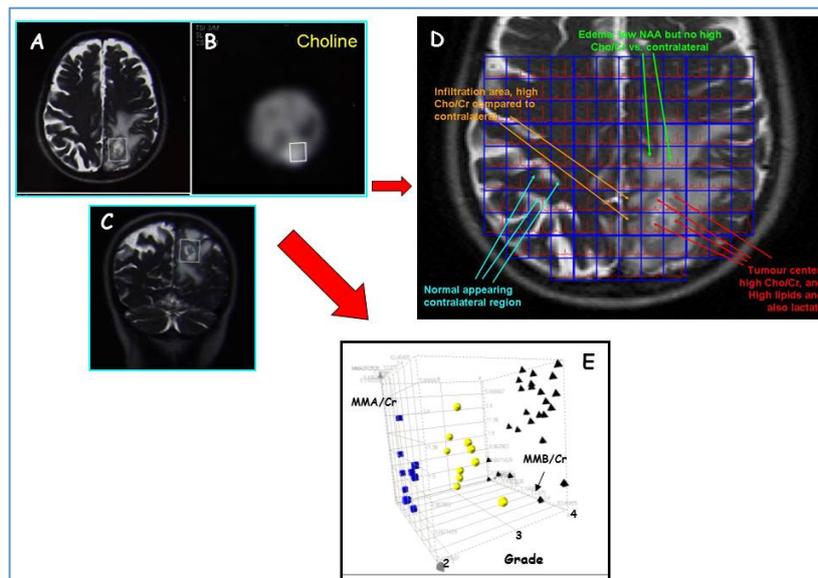
### Generalización a gliomas de bajo grado

Una vez comprobada y utilizada en la clínica la capacidad de la ERM en el apoyo directo al diagnóstico diferencial entre diferentes tipos de lesiones del SNC y gliomas el paso siguiente fue verificar la utilidad clínica real del protocolo diseñado en este trabajo de investigación, y ya en parte presentado en los ejemplos del apartado anterior, para la diferenciación de la agresividad de los gliomas. Como es bien conocido, y ya se ha comentado en esta tesis, el manejo clínico del paciente depende directamente de la agresividad del tumor glial. Asimismo, el pronóstico y supervivencia se encuentran muy mediatizados por el grado de la lesión glial. Obviamente, un primer paso consiste en la

diferenciación entre tumores gliales de bajo, grado I y II, y alto grado, III y IV. Asimismo, puede resultar interesante desde el punto de vista clínico distinguir entre grado III y IV.

Como ya se ha comentado en la introducción, una de las limitaciones para la aplicación clínica de la ERMN de volumen único es la localización en la zona de la lesión de mayor crecimiento celular, indicativa de la agresividad del tumor. Para lograr ese objetivo se planteó, diseñó y comprobó un protocolo nuevo:

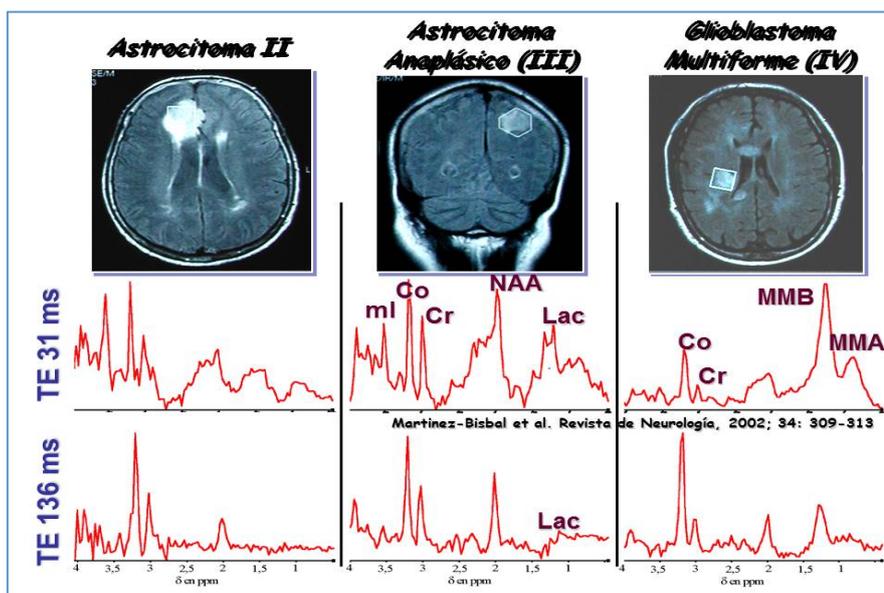
- i) adquisición inicial de un espectro ERMI, según el protocolo descrito en el apartado de metodología, recogiendo la lesión y la zona contralateral. Dicha obtención es posterior a la de las imágenes T1 y T2 con y sin contraste, que además permiten definir la orientación anatómica adecuada para dicha adquisición.
- ii) a partir de los datos previos de espectroscopía de ERMI, búsqueda de la zona con la máxima señal de Colina (Co). La Co es el metabolito directamente relacionado con el desarrollo celular acelerado (1) y por consiguiente con la agresividad del tumor. De esta manera, se procede al posicionamiento del voxel en la zona de máxima celularidad, posibilitando así una mayor precisión en la gradación de la lesión glial.



**Figura 16.** Ejemplo del protocolo original diseñado para la adquisición de los perfiles metabólicos mediante ERMN, combinando espectroscopía multivoxel y volumen único, correspondiente a un astrocitoma grado II. A) y C) Imágenes axial y coronal T2 con localización del voxel único, B) Imagen de espectroscopía correspondiente a la distribución espacial del neurometabolito Colina, sobre el que se ha localizado el voxel de volumen único, como se comprueba en A) y C). D) ejemplo del posicionamiento del enrejillado del multivoxel ERMI, así como descripción de la distribución de tipos de tejido a partir de los perfiles metabólicos; de izquierda a derecha: - contralateral con tejido no afecto; - región peritumoral con infiltración; - zona de edema; - región con elevada concentración de Colina. E) ejemplo de resultado diferenciador estadístico entre tumores gliales de grado II (cuadrados azules), III (puntos amarillos) y IV (triángulos negros).

En la figura anterior se muestra claramente la posibilidad de aplicación del protocolo propuesto. En B) se comprueba la distribución espacial del metabolito Colina y como se distingue una región específica donde la concentración de Co es mas elevada. Precisamente sobre esta región se posicionó el volumen único. En E) se puede observar un primer avance de la capacidad estadística para diferenciar metabólicamente entre los tres grados (II, III y IV) para los tumores gliales. Concretamente, el análisis estadístico dirigido de los cocientes de los diferentes metabolitos respecto a Cr y/o H<sub>2</sub>O permiten una diferenciación entre los grados II, III y IV en tumores gliales. Así en la Figura 16 se muestra el ejemplo de separación entre dichos grados respecto a los cocientes MMA/Cr y MMB/Cr en una representación tridimensional. MMA y MMB corresponden a las resonancias anchas de Lípidos/macromoléculas, compuestos con T2 corto, con señales centradas alrededor de 0,9 y 1,3 ppm, respectivamente (1).

Como ejemplo resumen de los resultados obtenidos mediante este protocolo se incluye en la figura 17 los perfiles metabólicos para los tumores gliales grado II, III y IV.



**Figura 17.-** Ejemplo de perfiles metabólicos obtenidos con el protocolo propuesto para para astrocitomas de grado II, III y IV, de izquierda a derecha, respectivamente.

Como se puede comprobar de la Figura anterior, la localización del voxel de volumen único en la imagen de espectroscopía de la distribución espacial de Co, previamente adquirida, permite la obtención de perfiles metabólicos ajustados a la zona de celularidad, mayor concentración de colina, minimizando al mismo tiempo la contribución de la zona de necrosis, mayor cantidad de lípidos/macromoléculas (MMA, MMB). Este resultado se puede comprobar tanto a TE 31 como 136 ms, aunque es mucho mas visible a T 136 ms. De esta manera se mejora la gradación de los tumores gliales, así como se localiza la zona de máxima agresividad de la lesión.

La inclusión de la zona contralateral en el voxel completo de la imagen de espectroscopía (D) en la figura 16) posibilita además:

- un análisis comparativo interno del perfil metabólico entre la lesión y tejido no afecto;
- región peritumoral para verificar posible infiltración;
- diferentes regiones de la lesión, como edema y/o necrosis;
- zona de máxima celularidad, elevada concentración de Co.

## Discusión

Lógicamente, una cuestión inicial relativa a la potencial aplicación clínica de los perfiles metabólicos in vivo mediante ERMN es su capacidad para diferenciar entre distintos tipos de lesiones del SNC, y en particular respecto a tumores gliales que son las más frecuentes, especialmente GBM.

A partir de las Figuras 1-3 y 10-17 se puede comprobar la utilidad de la ERMN in vivo como herramienta de apoyo al diagnóstico y pronóstico de lesiones del SNC, en particular los tumores gliales y su agresividad.

Tanto la composición metabólica como la proporción entre los diferentes neurometabolitos pueden posibilitar la diferencia entre diferentes tipos de lesiones cerebrales así como la gradación de tumores gliales. Concretamente, los abscesos representan un caso singular. En los abscesos no se detectan los neurometabolitos habituales del tejido del SNC (Figuras 1, 2, 9, 10 y 11), como NAA, Glx, Cr, Co y mI. Así por ejemplo, en abscesos tipo anaeróbico, Figura 10, el Acetato puede ser considerado como un metabolito singular diferenciador respecto a otras lesiones del SNC. Por otro lado, también se puede encontrar otro metabolito único en lesiones cerebrales, el Succinato (Suc) como diferenciador de abscesos con otras lesiones del SNC, así como respecto a abscesos anaeróbicos. En resumen, los perfiles metabólicos mediante ERMN in vivo en los que no se observen cantidades significativas de NAA, Glx, Cr, Co y mI pero si Succinato y/o Acetato son claramente indicativos de abscesos de tipo aeróbico o anaeróbico, respectivamente.

Desafortunadamente, para el resto de lesiones del SNC no ha sido posible aún detectar un metabolito singular que permita una diferenciación única entre las mismas. No obstante, las alteraciones genéticas/fenotípicas asociadas a los diferentes tipos de lesiones cerebrales, también se pueden reflejar en distintas rutas metabólicas y por consiguiente alterando las cantidades de uno o varios de los metabolitos presentes en el tejido nervioso central (1). Para poder detectar las variaciones en las cantidades de los neurometabolitos, habitualmente observables con los equipos de RMI clínicos, se requiere la evaluación cuantitativa de la concentración de los mismos a través del análisis, lo más preciso posible, del área de las señales de dichos metabolitos. Para este fin se ha utilizado, como se ha indicado en apartados anteriores, el programa de análisis de espectros jMRUI (6). Así en la Figura 13 se muestra un ejemplo de tabla de cocientes de intensidades de NAA, Co y mI respecto a Cr. La relación respecto a Cr

(Creatina+Fosfocreatina), uno de los neurometabolitos de concentración prácticamente constante, es una de las más frecuentes utilizadas para los análisis comparativos. También se puede usar la concentración de agua como referencia interna, aunque su concentración, como en el caso de Cr, tampoco es totalmente constante.

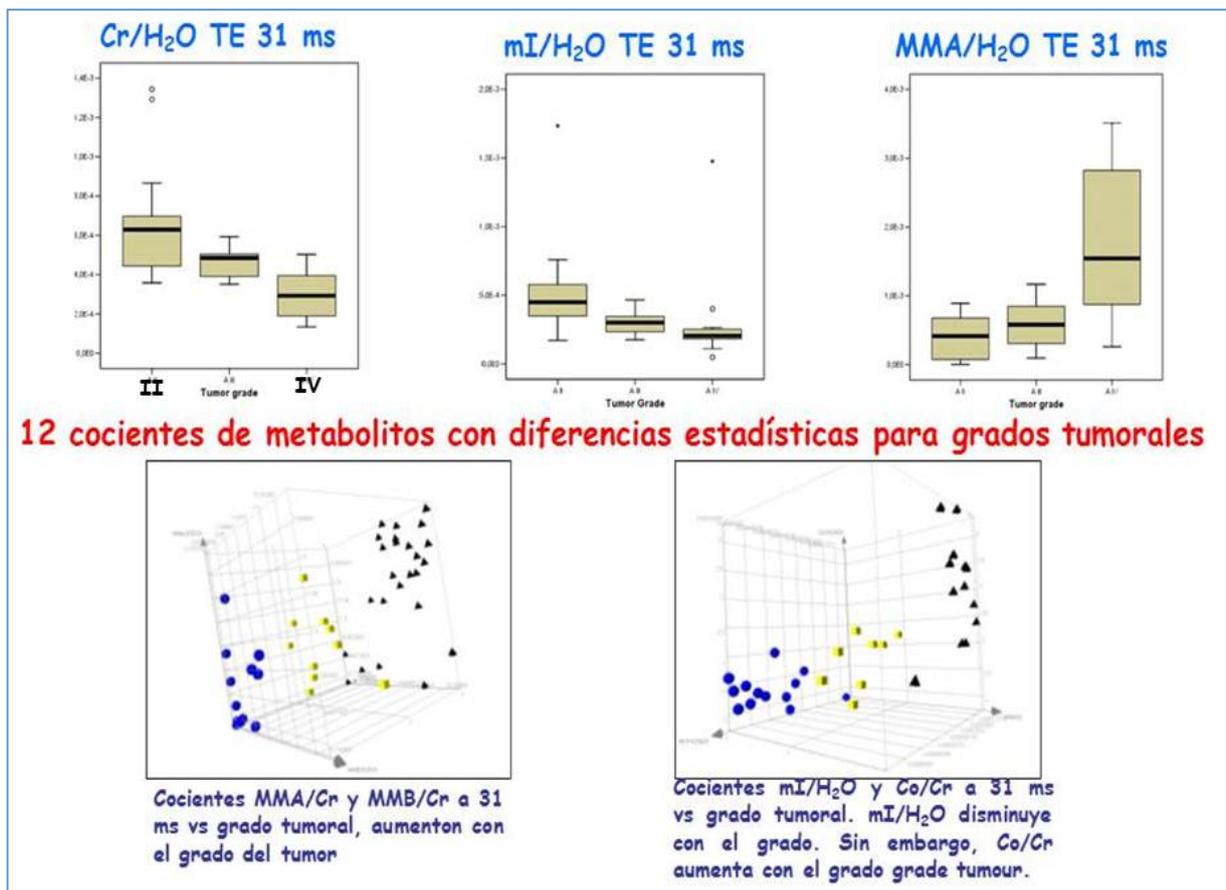
En la Figura 12 se presenta un ejemplo claro del perfil metabólico típico de una lesión tipo infarto. La lesión presenta alteraciones respecto al tejido normal contralateral, tal y como se constata en la imagen de espectroscopía (figura no mostrada), con descenso de NAA indicativo de daño axonal. Ni en la imagen de espectroscopía ni en el volumen único se observa aumento de la celularidad, ya que no se observa en ninguna región aumento de Colina. La presencia de una notable cantidad de Lactato es indicativa de fenómenos hipóxicos. La existencia de daño neuronal, junto con la ausencia de celularidad e indicios de hipoxia se pueden relacionar con un infarto. Confirmado por anatomía patológica.

La diferenciación mediante RMN estándar entre placas desmielinizantes y tumores gliales de bajo grado puede resultar complicada en bastantes ocasiones. En la Figura 13 se presenta un ejemplo de una lesión en el pedúnculo cerebeloso izquierdo que inicialmente, mediante RMN, se consideró a diferenciar entre: lesión desmielinizante como la esclerosis múltiple o una encefalomiелitis diseminada aguda. Menos probable neoplasia (fue remitida como tal). La localización de la lesión hacía prácticamente imposible o con mucho riesgo la biopsia de la lesión. Se consideró la ayuda la biopsia metabólica no cruenta para sopesar las opciones de lesiones no neoplásicas. Como se puede deducir de los resultados cualitativos, así como los cuantitativos detallados en la tabla (Figura 13), las diferencias relativas al perfil metabólico de la región contralateral así como al correspondiente a astrocitoma de grado II (Figuras 15 y 17) son más próximos a lesión demielinizante. Esa fue la conclusión propuesta por ERMN in vivo y comprobada en el control a las 6 semanas ya que con tratamiento corticoideo la lesión se había reducido. Finalmente, y como se observa en la figura, al cabo de un año la lesión había desaparecido, confirmando clínicamente el diagnóstico molecular mediante ERMN.

La gliomatosis cerebri es otro tipo de lesión del SNC agresiva y que muestra también dificultad a la hora de su diagnóstico mediante datos de RMI estándar. En este caso, de nuevo, el perfil metabólico mediante ERMN in vivo y siguiendo el protocolo propuesto (Figura 14) es bastante diferente a los típicos de tumores gliales mostrados en la Figura 17. De forma específica, en general el perfil metabólico de gliomatosis cerebri respecto a tumores gliales presentan las siguientes diferencias: i) la cantidad de lípidos/macromoléculas, resonancias centradas a 0,9 y 1,3 ppm, es reducida; ii) también existe una disminución neuronal, observada a partir de una disminución de la intensidad de la señal de NAA; iii) no se observa un incremento importante en la concentración de Colina, en otras palabras no es aparente un elevado incremento de la celularidad como en lesiones gliales; iv) la cantidad de mI es superior.

Los tumores gliales, en particular los GBM, son las lesiones mas frecuentes en el SNC. Aunque la diferenciación respecto a otros tipos de lesiones, como las mencionadas anteriormente, es relevante, mucho mas lo es la posibilidad de diagnosticar su agresividad a través de la determinación de los grados de las mismas. Con el fin de poder mejorar la capacidad de la ERMN en al apoyo al diagnóstico diferencial de los tumores gliales se diseñó el protocolo descrito previamente. En la Figura 16 se ha mostrado un esquema gráfico de dicho protocolo, incluyendo un resultado previo de la diferenciación estadística entre los tres grados a partir de los valores distintos en los cocientes MMA/Cr y MMB/Cr para astrocitoma II, III y IV. Esta diferenciación estadística se extiende a un número mayor de cocientes de diversos metabolitos tanto con Cr como con H<sub>2</sub>O.

En la Figura 18 se recogen las diferencias estadísticas obtenidas para el conjunto global de los neurometabolitos observables mediante ERMN in vivo.



**Figura 18.-** Ejemplo del conjunto de cocientes respecto a Cr y H<sub>2</sub>O de diversos metabolitos que permiten la diferenciación estadística entre los grados II, III y IV de los tumores gliales. Parte superior: cocientes respecto a H<sub>2</sub>O de Cr, mI y MMA. Parte inferior: diagramas tridimensionales MMA/Cr, MMB/Cr y mI/H<sub>2</sub>O, CO/Cr; cuadrados azules (II); círculos amarillos (III) y triángulos negros (IV).

En conjunto se han observado 12 cocientes de metabolitos, ya con Cr o H<sub>2</sub>O, con diferencias estadísticamente significativas para la diferenciación entre astrocitoma II, III y IV. Como se comprueba tanto el Cr/H<sub>2</sub>O como mI/H<sub>2</sub>O disminuyen con el grado del tumor glial. Mientras que, por otro lado, el MMA/H<sub>2</sub>O aumenta, incremento de necrosis, con el grado desde II a IV. Esta diferenciación se puede visualizar mejor a través de diagramas tridimensionales como MMA/Cr, MMB/Cr y grado tumoral, ya comentado en la Figura 16. De forma similar mI/H<sub>2</sub>O y Co/Cr varían con el grado tumoral. mI/H<sub>2</sub>O aumenta mientras que Co/Cr disminuye con la agresividad de los tumores gliales.

En resumen, los resultados hasta aquí presentados usando el protocolo propuesto y descrito demuestran la capacidad del mismo en la ayuda al diagnóstico diferencial tanto entre diversos tipos de lesiones del SNC como para la distinción entre los grados II, III y IV en tumores gliales.

#### 4.1.2.- Desarrollo y evaluación de un Sistema de Apoyo al Diagnóstico Clínico (CADS) de tumores del SNC mediante ERM

El cálculo de la sensibilidad y especificidad, así como la obtención de las curvas ROC y del AUC se ha realizado agrupando los tumores clasificados según la WHO (Organización Mundial de la Salud) siguiendo la diferenciación obtenida mediante CADS: meningiomas; tumor glial de bajo grado y tumores gliales agresivos. De manera específica, y prácticamente habitual, los tumores gliales I y II se han agrupado en bajo grado y los gliales III y IV en tumores agresivos.

Se ha utilizado idéntico agrupamiento al usado para CADS para los tumores clasificados a partir de los datos de RMI. Los tumores no incluidos en la clasificación del programa CADS se han clasificado como otros tumores y no se han considerado para el cálculo de la sensibilidad y especificidad.

En la tabla siguiente se incluye la clasificación usada para esta evaluación comparativa entre clasificación por diagnóstico clínico y MRS/CADS

**Tabla 2.-** Clasificación del diagnóstico clínico (WHO) adecuada a la de MRS/CADS

<b>clasificación WHO</b>	<b>clasificación CADS</b>
<b>Tumores de las Meninges</b>	
Meningioma (WHO grado I)	Meningioma
Atypical meningioma (WHO grado II)	Meningioma
Anaplastic (maligno) meningioma (WHO grado III)	Meningioma
<b>tumores astrocíticos [tumores gliales]</b>	
Astrocitoma (WHO grado II)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Anaplásico (maligno) astrocitoma (WHO grado III)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Glioblastoma multiforme (WHO grado IV)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Astrocitoma Pilocítico [no-invasivo, WHO grado	Bajo grado o glial agresivo (depende

I]	del grado)
Astrocitoma células gigantes [non-invasivo, WHO grado I]	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Xanthoastrocitoma pleomórfico [non-invasive, WHO grade I]	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
<b>Tumores Oligodendrogiales</b>	
Oligodendroglioma (WHO grado II)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Anaplásico (maligno) oligodendroglioma (WHO grado III)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
<b>Células tumorales Ependimoma</b>	
Ependimoma (WHO grado II)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Ependimoma Anaplásico (WHO grado III)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Ependimoma Mixopapilar (WHO grado I)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Subependimoma (WHO grado I)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
<b>Gliomas Mezclados</b>	
Oligoastrocitoma Mezcla (WHO grado II)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Anaplásico (maligno) oligoastrocitoma (WHO grado III)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Otros (e.g. ependimo-astrocitomas)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
<b>Tumores Neuroepiteliales de origen incierto</b>	
Espongioblastoma Polar (WHO grado IV)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Astroblastoma (WHO grado IV)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Gliomatosis cerebri (WHO grado IV)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)

<b>Tumores Neuronales y mezcla neuronal-glial</b>	
Ganglioglioma (WHO grado I-II)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Ganglioglioma anaplásico (maligno) (WHO grado III)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Ganglioglioma desmoplástico infantil (WHO grado I)	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)

Asimismo en la tabla siguiente se incluye la clasificación usada para la evaluación comparativa entre clasificación por RMI y MRS/CADS

**Tabla 3.-** Clasificación de RMI adecuada a la de MRS/CADS

<b>Clasificación derivada RMI</b>	<b>Clasificación CADS</b>
Glioma	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Glioma de bajo grado	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Astrocitoma	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Oligodendroglioma	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Oligoastrocitoma	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Astrocitoma Policítico	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Glioma alto grado	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Astrocitoma/oligodendroglioma/OA grado III	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Glioblastoma grado IV	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Astrocitoma de células gigantes Subependmal	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)

	del grado)
Gliomatosis cerebri	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Sub-ependimoma	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Ependimoma	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Ganglioglioma	Bajo grado o glial agresivo (depende del grado)
Meningioma	Meningioma

Ya de forma específica, en la tabla que se incluye a continuación se recoge el diagnóstico obtenido mediante RMI para los tumores incluidos en este análisis estadístico comparativo. El tumor más frecuente es GBM (grado IV) diagnosticado en el 32,9% de los casos. Otro tipo de tumores con un porcentaje > 10% son astrocitomas anaplásico grado III, gliomas bajo grado, meningiomas y metástasis.

**Tabla 4.** -Listado y porcentajes del diagnóstico obtenido mediante RMI de los casos considerados

<b>Tipo tumor mediante RMI</b>	<b>(N=79)</b>
Astrocitoma	9 (11.4%)
Ependimoma	2 (2.5%)
Glioblastoma grado IV	26 (32.9%)
Glioma	1 (1.3%)
Glioma alto grado	2 (2.5%)
Glioma bajo grado	10 (12.7%)
Linfoma	1 (1.3%)

<b>Tipo tumor mediante RMI</b>	<b>(N=79)</b>
Meningioma	9 (11.4%)
Metástasis	8 (10.1%)
Neurocitoma	1 (1.3%)
Oligodendroglioma	4 (5.1%)
Oligoastrocitoma	3 (3.8%)
Other	3 (3.8%)

De forma similar en la tabla siguiente se incluye el diagnóstico obtenido mediante la aplicación del CADS a los casos estudiados. El grupo de tumor mas representativo es tipo agresivo (48,1%) seguido por gliales de bajo grado (36,7%) y meningiomas (15,2%).

**Tabla 5.**-Listado y porcentajes del diagnóstico obtenido mediante CADS de los casos considerados

<b>Tipo tumor mediante HMR-CADS</b>	<b>(N=79)</b>
Glial Agresivo	38 (48.1%)
Glial Bajo Grado	29 (36.7%)
Meningioma	12 (15.2%)

**- Meningioma (CADS vs. Diagnóstico clínico)**

Los valores de sensibilidad, especificidad, predictivo positivo y negativo en la predicción de la clasificación de los meningiomas mediante CADS respecto al diagnóstico clínico se recogen en la tabla siguiente.

**Tabla 6.** -Sensibilidad y especificidad en la clasificación de meningiomas (CADS vs diagnóstico clínico). Análisis de población para comprobación de la precisión en el diagnóstico.

<b>Medida del diagnóstico</b>	<b>Proporción (no. de éxito / total)</b>	<b>Precisión del diagnóstico (Prevalencia=13,9%)</b>
Sensibilidad	6 / 11	0,55 (95% C.I.: 0,23; 0,83)
Especificidad	62 / 68	0,91 (95% C.I.: 0,82; 0,97)
PPV	6 / 12	0,50 (95% C.I.: 0,21; 0,79)
NPV	62 / 67	0,93 (95% C.I.: 0,83; 0,98)

La sensibilidad obtenida mediante CADS para detectar los meningiomas cuando realmente está presentes es 0,55 (95% C.I.: 0.23; 0.83) mientras que la especificidad es 0,91 (95% C.I.: 0,82; 0,97). Los valores predictivos positivo (PPV) y negativo NPV son respectivamente 0,5 (95% C.I.: 0,21; 0,79) and 0,93 (95% C.I.: 0,83; 0,98).

Para poder evaluar de manera correcta el predominio del meningioma se ha calculado el análisis de población, con un valor del 13,9%.

**- Tumores de bajo grado (CADS vs. Diagnóstico clínico)**

De manera similar se han determinado la sensibilidad, especificidad, valores predictivo positivo y negativo para los tumores gliales de bajo grado mediante CADS respecto al diagnóstico clínico, se han evaluado en función del análisis de población para contrastar la precisión del diagnóstico.

**Tabla 7.-** Sensibilidad y especificidad en la clasificación de los tumores gliales de bajo grado (CADS vs diagnóstico clínico). Análisis de población para comprobación de la precisión en el diagnóstico.

<b>Medida del diagnóstico</b>	<b>Proporción (no. de éxitos / total)</b>	<b>Precisión del diagnóstico (Prevalencia=15,2%)</b>
Sensibilidad	12 / 12	1,00 (95% C.I.: 0,74; 1,00)
Especificidad	50 / 67	0,75 (95% C.I.: 0,63; 0,84)
PPV	12 / 29	0,41 (95% C.I.: 0,24; 0,61)
NPV	50 / 50	1,00 (95% C.I.: 0,93; 1,00)

La sensibilidad del programa CADS para detectar los tumores gliales de bajo grado cuando realmente están presentes es 1,00 (95% C.I.: 0,74; 1,00) mientras que la especificidad es 0,75 (95% C.I.: 0,63; 0,84). Los valores predictivos positivo y negativo son, respectivamente, 0,41 (95% C.I.: 0,24; 0,61) y 1,00 (95% C.I.: 0,93; 1,00).

Para poder evaluar de manera correcta el predominio de los tumores gliales de bajo grado se ha calculado el análisis de población, con un valor del 15,2%.

**- Tumores gliales agresivos (CADS vs Diagnóstico clínico)**

Asimismo, se han determinado la sensibilidad, especificidad, valores predictivo positivo y negativo para los tumores gliales de agresivos mediante CADS respecto al diagnóstico clínico, se han evaluado en función del análisis de población para contrastar la precisión del diagnóstico. En la tabla que se muestra a continuación los datos obtenidos para el análisis comparativo de la clasificación de los tumores gliales agresivos mediante CADS vs diagnóstico clínico.

**Tabla 8.-** Sensibilidad y especificidad en la clasificación de los tumores gliales agresivos (CADS vs diagnóstico clínico). Análisis de población para comprobación de la precisión en el diagnóstico.

<b>Medida del diagnóstico</b>	<b>Proporción (no. de éxitos / total)</b>	<b>Precisión diagnóstico (Prevalencia=36.7%)</b>
Sensibilidad	22 / 29	0,76 (95% C.I.: 0,56; 0,90)
Especificidad	34 / 50	0,68 (95% C.I.: 0,53; 0,80)
PPV	22 / 38	0,58 (95% C.I.: 0,41; 0,74)
NPV	34 / 41	0,83 (95% C.I.: 0,68; 0,93)

La sensibilidad del programa CADS para detectar los tumores gliales agresivos cuando realmente están presentes es 0,76 (95% C.I.: 0,56; 0,90) mientras que la especificidad es 0,68 (95% C.I.: 0,53; 0,80). Los valores predictivos positivo y negativo son, respectivamente, 0,58 (95% C.I.: 0,41; 0,74) y 0,83 (95% C.I.: 0,68; 0,93).

Para poder evaluar de manera correcta el predominio de los tumores gliales de bajo grado se ha calculado el análisis de población, con un valor del 36,7%.

**- Tumores Meningiomas (RMI vs. Diagnóstico clínico)**

Dentro de la evaluación planteada del CADS, programa automático de procesado de espectros y clasificación de tumores, también se ha incluido el análisis comparativo entre los resultados obtenidos mediante RMI vs. el diagnóstico clínico. Así, en la tabla siguiente se muestran los valores de la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos positivo y negativo para la clasificación de meningiomas a partir de los resultados del diagnóstico mediante RMI vs. al diagnóstico clínico calculado en base al análisis de población para la precisión del diagnóstico.

**Tabla 9.-** Sensibilidad y especificidad en la clasificación de meningiomas (RMI vs diagnóstico clínico). Análisis de población para comprobación de la precisión en el diagnóstico.

<b>Medida del diagnóstico</b>	<b>Proporción (no. de éxitos/ total)</b>	<b>Precisión diagnóstico (Prevalencia=13.9%)</b>
Sensibilidad	8 / 11	0,73 (95% C.I.: 0,39; 0,94)
Especificidad	67 / 68	0,99 (95% C.I.: 0,92; 1,00)
PPV	8 / 9	0,89 (95% C.I.: 0,52; 1,00)
NPV	67 / 70	0,96 (95% C.I.: 0,88; 0,99)

En este análisis, la sensibilidad de RMI para detectar los meningiomas cuando realmente están presentes es 0,73 (95% C.I.: 0,39; 0,94) mientras que la especificidad es 0,99 (95% C.I.: 0,92; 1,00). Los valores predictivos positivo y negativo son, respectivamente, 0,89 (95% C.I.: 0,52; 1,00) y 0,96 (95% C.I.: 0,88; 0,99).

Para poder evaluar de manera correcta el predominio del meningioma se ha calculado el análisis de población, con un valor del 13,9%.

**- Tumores gliales bajo grado (RMI vs. Diagnóstico clínico)**

Como en los apartados anteriores, se recoge en la tabla siguiente los resultados de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo para la clasificación de los tumores de bajo grado mediante el diagnóstico de RMI vs. diagnóstico clínico calculados en función del análisis de población para la precisión del diagnóstico.

**Tabla 10.-**Sensibilidad y especificidad en la clasificación de los tumores gliales de bajo grado (RMI vs diagnóstico clínico). Análisis de población para comprobación de la precisión en el diagnóstico.

<b>Medida del diagnóstico</b>	<b>Proporciónn (no. de éxitos / total)</b>	<b>Precisión diagnóstico (Prevalencia=27.8%)</b>
Sensibilidad	19 / 22	0,86 (95% C.I.: 0,65; 0,97)
Specificity	53 / 57	0,93 (95% C.I.: 0,83; 0,98)
PPV	19 / 23	0,83 (95% C.I.: 0,61; 0,95)
NPV	53 / 56	0,95 (95% C.I.: 0,85; 0,99)

La sensibilidad de RMI para detectar los tumores gliales de bajo grado cuando realmente están presentes es 0,86 (95% C.I.: 0,65; 0,97) mientras que la especificidad es 0,93 (95% C.I.: 0,83; 0,98). Los valores predictivos positivo y negativo son, respectivamente, 0,83 (95% C.I.: 0,61; 0,95) y 0,95 (95% C.I.: 0,85; 0,99).

Para poder evaluar de manera correcta el predominio de los tumores gliales de bajo grado se ha calculado el análisis de población, con un valor del 27,8%.

- **Tumores gliales agresivos (MRI vs. Diagnóstico clínico)**

Finalmente también se han determinado la sensibilidad, especificidad, valores predictivo positivo y negativo para los tumores gliales de agresivos mediante RMI respecto al diagnóstico clínico, se han evaluado en función del análisis de población para contrastar la precisión del diagnóstico. En la tabla que se muestra a continuación los datos obtenidos para el análisis comparativo de la clasificación de los tumores gliales agresivos mediante RMI vs diagnóstico clínico.

**Tabla 11.-** Sensibilidad y especificidad en la clasificación de los tumores gliales agresivos (CADS vs diagnóstico clínico). Análisis de población para comprobación de la precisión en el diagnóstico.

<b>Media del diagnóstico</b>	<b>Proporción (no. de éxitos / total)</b>	<b>Precisión diagnóstico (Prevalencia=39.2%)</b>
Sensibilidad	28 / 31	0.90 (95% C.I.: 0.74; 0.98)
Especificidad	42 / 48	0.88 (95% C.I.: 0.75; 0.95)
PPV	28 / 34	0.82 (95% C.I.: 0.65; 0.93)
NPV	42 / 45	0.93 (95% C.I.: 0.82; 0.99)

Por último, la sensibilidad en el diagnóstico mediante RMI para detectar los tumores gliales agresivos cuando realmente están presentes es 0,90 (95% C.I.: 0,74; 0,98) mientras que la especificidad es 0,88 (95% C.I.: 0,75; 0,95). Los valores predictivos positivo y negativo son, respectivamente, 0,82 (95% C.I.: 0,65; 0,93) y 0,93 (95% C.I.: 0,82; 0,99). (78)

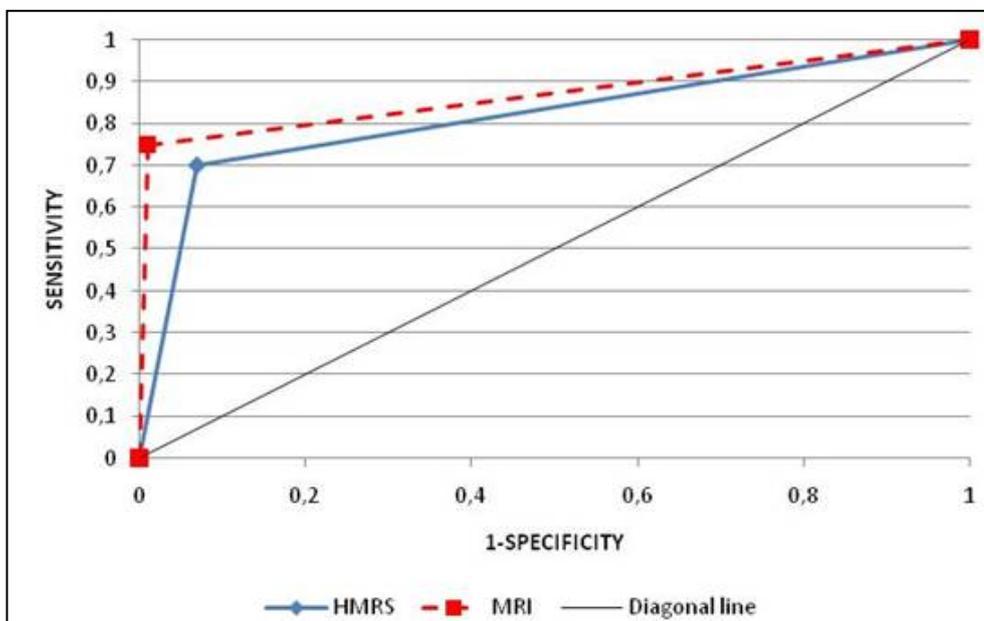
Para poder evaluar de manera correcta el predominio de los tumores gliales de bajo grado se ha calculado el análisis de población, con un valor del 36,7%.

## **- Discusión**

El conjunto de resultados descritos ha permitido evaluar el AUC a partir de las curvas ROC para dos comparaciones interesantes: i) resultados clasificación de tumores mediante CADS vs. diagnóstico clínico; y ii) resultados clasificación de tumores mediante RMI vs. diagnóstico clínico. (79)

- Gráfico ROC para la clasificación de meningiomas (resultados CADS y obtenidos de RMI)

El área bajo la curva (AUC) formada para la sensibilidad y especificidad calculada para meningiomas se muestra en la figura 19 (es decir, la capacidad de las dos herramientas de diagnóstico para discriminar entre muestras negativas y positivas) tanto para el diagnóstico obtenido mediante CADS como por RMI. La línea diagonal indica el límite mas bajo aceptable para el test de aceptación.

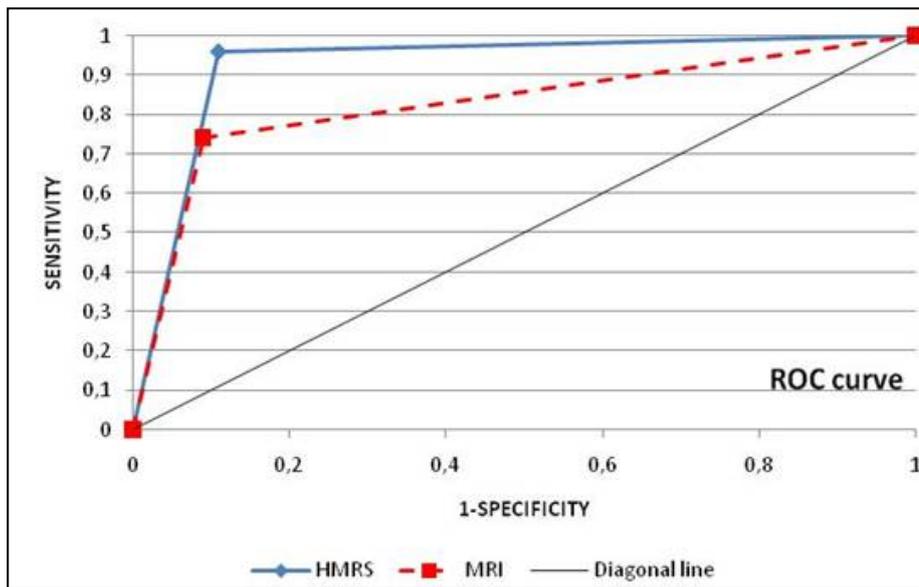


**Figura 19.** Gráfico de la curva ROC para la clasificación de meningiomas (mediante CADS vs diagnóstico clínico) y (mediante RMI vs diagnóstico clínico)

Los valores obtenidos para meningiomas mediante RMI son: la sensibilidad =  $8/10 = 0,80$  ( $0,76 - 0,84$ ); especificidad =  $0/1 = 0$ ; Valor Predictivo Positivo =  $8/9 = 0,89$  ( $0,84 - 0,94$ ); Valor Predictivo Negativo =  $0/2 = 0$ . Los valores obtenidos para meningiomas mediante CADS son: la sensibilidad =  $7/10 = 0,70$  ( $0,67 - 0,73$ ); especificidad =  $2/6 = 0,33$  ( $0,32 - 0,34$ ); Valor Predictivo Positivo =  $7/11 = 0,64$  ( $0,61 - 0,67$ ); Valor Predictivo Negativo =  $2/5 = 0,4$  ( $0,38 - 0,44$ ).

- Gráfico ROC para la clasificación de tumores gliales de bajo grado (resultados CADS y obtenidos de RMI)

En la Figura 20 se muestra el área bajo la curva (AUC) formada mediante la sensibilidad y especificidad calculada para tumores gliales de bajo grado (es decir la capacidad de dos herramientas de diagnóstico para discriminar entre muestras negativas y positivas) tanto para el diagnóstico mediante CADS y el obtenido mediante RMI. La línea diagonal indica el límite mas bajo aceptable para el test de aceptación.



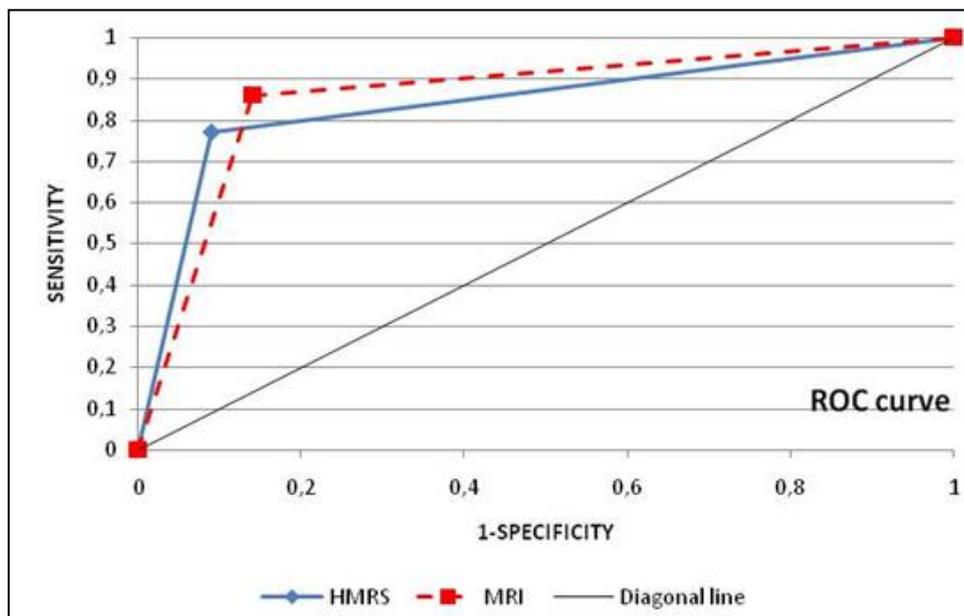
**Figura 20.-** Gráfico de la curva ROC para la clasificación de tumores gliales de bajo grado (mediante CADS vs diagnóstico clínico) y (mediante RMI vs diagnóstico clínico)

Los valores obtenidos para tumores gliales de bajo grado mediante RMI son: la sensibilidad =  $16/21 = 0,76$  ( $0,72 - 0,80$ ); especificidad =  $7/11 = 0,64$  ( $0,61 - 0,67$ ); Valor Predictivo Positivo =  $16/20 = 0,80$  ( $0,76 - 0,84$ ); Valor Predictivo Negativo =  $7/12 = 0,58$  ( $0,55 - 0,61$ ). Los valores obtenidos para meningiomas mediante CADS son: la sensibilidad =  $24/25 = 0,96$  ( $0,91 - 0,99$ ); especificidad =  $1/6 = 0,17$  ( $0,15 - 0,19$ ); Valor Predictivo Positivo =  $24/29 = 0,83$  ( $0,79 - 0,87$ ); Valor Predictivo Negativo =  $1/2 = 0,5$  ( $0,48 - 0,55$ ).(80)

- **Gráfico ROC para la clasificación de tumores gliales agresivos (resultados CADS y obtenidos de RMI)**

En la Figura 21 se muestra el área bajo la curva a partir de sensibilidad y especificidad calculada para tumores gliales agresivos (es decir la capacidad de dos herramientas de diagnóstico para discriminar entre muestras negativas y positivas) tanto para el diagnóstico mediante CADS y el obtenido mediante RMI. La línea diagonal indica el límite mas bajo aceptable para el test de aceptación.

Los valores obtenidos para tumores gliales de bajo grado mediante RMI son: la sensibilidad =  $31/40 = 0,78$  (0,74 – 0,82); especificidad =  $0/2 = 0$ ; Valor Predictivo Positivo =  $31/33 = 0,94$  (0,89 – 0,99); Valor Predictivo Negativo =  $0/9 = 0$ . Los valores obtenidos para meningiomas mediante CADS son: la sensibilidad =  $34/43 = 0,79$  (0,75 – 0,83); especificidad =  $1/4 = 0,25$  (0,23 – 0,27); Valor Predictivo Positivo =  $34/37 = 0,92$  (0,87 – 0,97); Valor Predictivo Negativo =  $1/10 = 0,10$  (0,85 – 0,15).



**Figura 21.** - Gráfico de la curva ROC para la clasificación de tumores gliales agresivos (mediante CADS vs diagnóstico clínico) y (mediante RMI vs diagnóstico clínico)

De manera resumida, a partir de los resultados obtenidos de sensibilidad/especificidad de RMI y CADS para el correcto diagnóstico con referencia al diagnóstico clínico final basado en en todas las herramientas de diagnóstico disponible incluyendo biopsia, parecen indicar una resolución ligeramente superior para CADS en tumores gliales de bajo grado y agresivos, lo contrario se observa en meningiomas.

La precisión de la clasificación mediante CADs parece ser inferior a la de RMI sólo por para meningiomas, en cambio superior para tumores de bajo grado y tumores gliales agresivos, como se puede observar a partir de las curvas ROC.(81)

#### ***4.1.3.- Imágenes nosológicas en el diagnóstico diferencial entre lesiones solitarias de GBM y metástasis***

Los estudios de RMI y 2D-TSI se realizaron a 15 pacientes, 9 diagnosticados como GBM y 6 metástasis. Los resultados se van a presentar en tres apartados. En primer lugar se demostrará las diferencias en los cocientes de metabolitos entre GBM y metástasis que posibilitaron su diferenciación. Después, se detectará la naturaleza infiltrante de los tumores GBM y, finalmente, será visualizada en una imagen nosológica.

##### **- Cocientes de metabolitos**

Para cada paciente se dividieron los vóxeles (correspondiendo a un total de 1114 espectros) en tres grupos vóxeles asignados/correspondientes a: i) áreas de realce tumoral, ii) peri-realce (es decir, imágenes potenciadas en T2 hiperintensas, sin realce post-Gd en imágenes potenciadas en T1) y iii) regiones sin realce/no-hiperintensas en T2. Dentro de cada grupo se promediaron por paciente los cocientes Co/Cr y Co/Naa, y posteriormente, sobre el conjunto de pacientes con el mismo tipo de tumor (Tabla 2)

**Tabla 12.-** promedio y desviación estándar para los cocientes Co/Cr y Co/Naa en las regiones de realce tumoral, área peri-realce y región sin realce/no hiperintensa en T2 para GBM y metástasis (MET). Estos

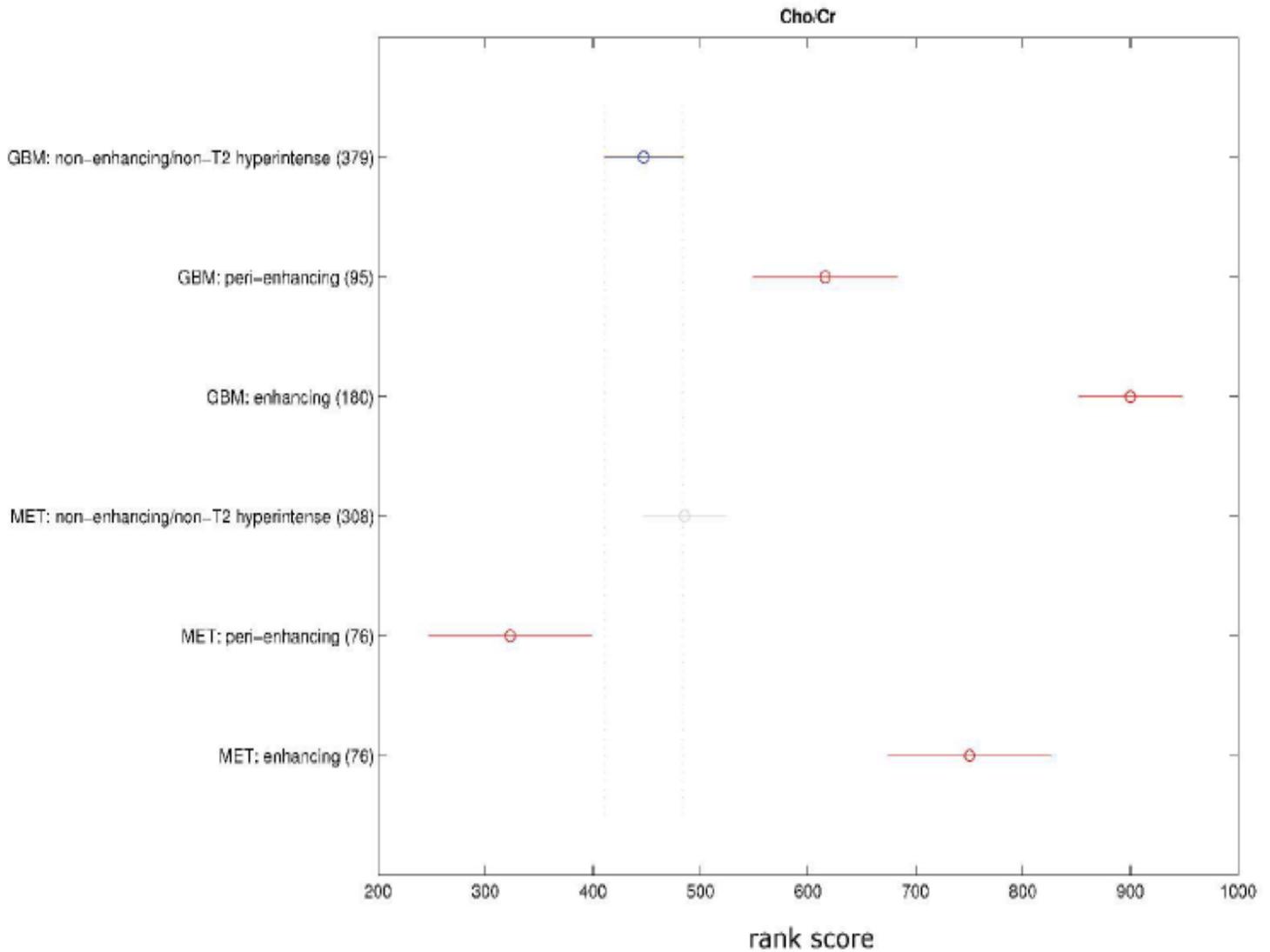
cocientes, resultado del análisis de 1114 espectros ERMI, son superiores en las regiones de realce tumoral y peri-realce en GBM respecto a MET.

		No captación C No hiperintenso T2	Realce <u>Peritumoral</u>	Realce Tumoral
Cho/Cr	GBM	1.29+/-0.22	1.68+/-0.61	2.76+/-0.99
	MET	1.26+/-0.17	1.14+/-0.15	1.80+/-0.22
Cho/Cr	GBM	0.43+/-0.08	0.83+/-0.65	1.81+/-1.62
	MET	0.42+/-0.08	0.51+/-0.11	0.93+/-0.15

El valor promedio ( $\pm$  la desviación estándar) del cociente Co/Cr en la región sin realce/no hiperintensa en T2 para los GBM es  $1,29\pm 0,22$  respecto a  $1,26\pm 0,17$  en MET. En la región peri-realce el cociente es  $1,68\pm 0,61$  3 GBM y  $1,14\pm 0,15$  en metástasis, mientras que para la región de realce tumoral son  $2,76\pm 0,99$  and  $1,80\pm 0,22$  para GBM y MET, respectivamente.

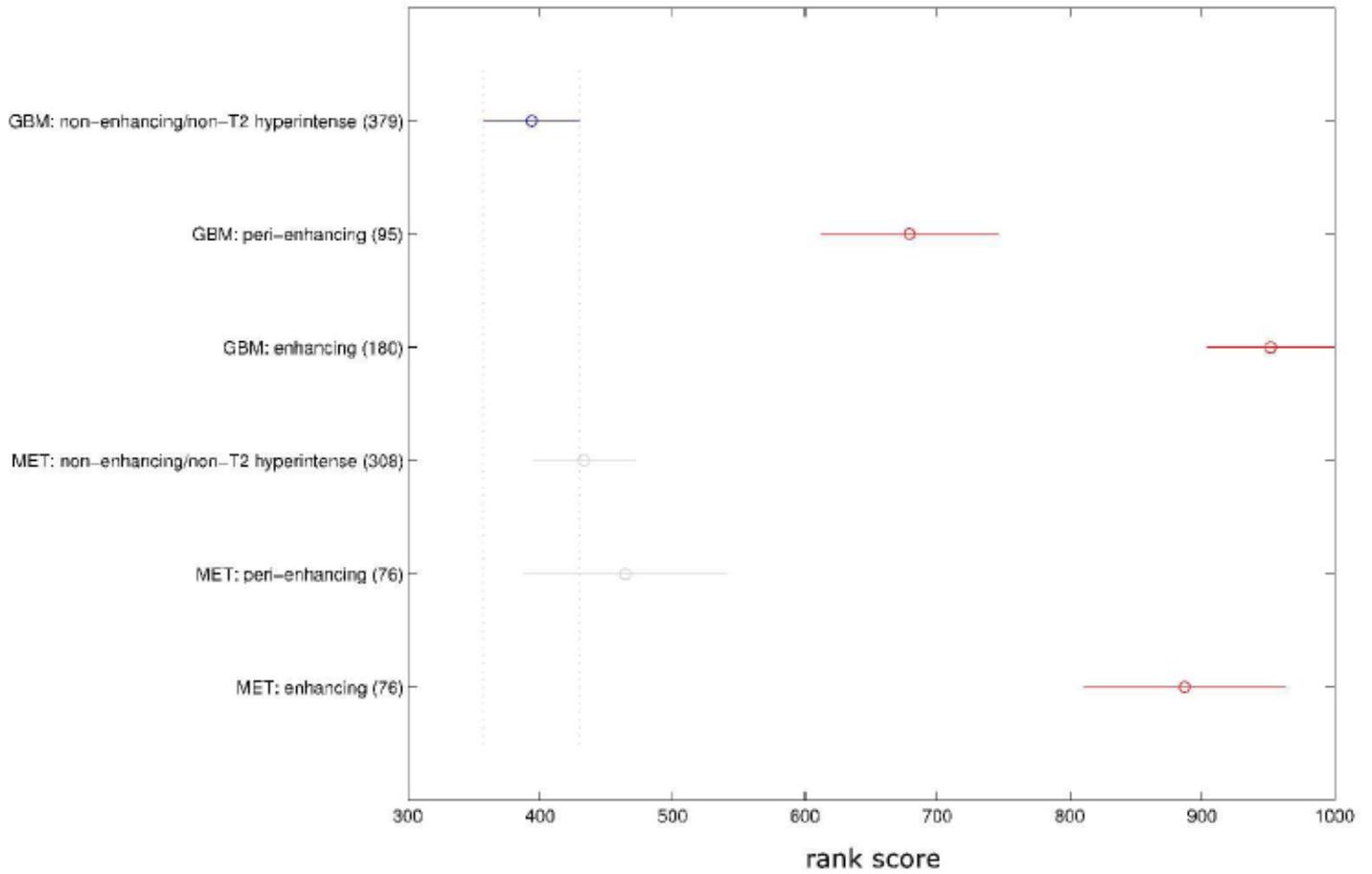
El valor promedio ( $\pm$  la desviación estándar) del cociente Co/Naa es  $0,43\pm 0,22$  en la región sin realce/no hiperintensa en T2 para los GBM respecto a  $0,42\pm 0,08$  en MET. El valor del cociente es  $0,83\pm 0,65$  en la región peri-realce para GBM y  $0,51\pm 0,11$  en metástasis. Para la región de realce tumoral en GBM el valor del cociente es  $1,81\pm 1,62$  mientras que  $0,93\pm 0,15$  para MET.

Se ha encontrado una clara diferencia entre GBM y MET en los valores de Co/Cr y Co/Naa en las regiones peri-realce y de realce tumoral. Basado en el análisis estadístico considerando todos los 1114 espectros de ERMI, el cociente Co/Cr es significativamente diferente entre GBM y MET en las regiones de realce tumoral y peri-realce. En MET el cociente disminuye de manera estadística significativamente entre la región peri-realce respecto a la de sin realce/no hiperintensa T2, mientras que aumenta de manera significativa en GBM. EL cociente Co/Naa es estadísticamente diferente entre GBM y MET en la región peri-realce (periférica a la zona de realce post-Gd) (Figuras 22 y 23). Además, se ha calculado para cada paciente la diferencia entre los valores promedio de la región de realce tumoral y del área sin realce/no hiperintensa T2 y se obtiene una nítida separación entre GBM y MET (Figura 24)

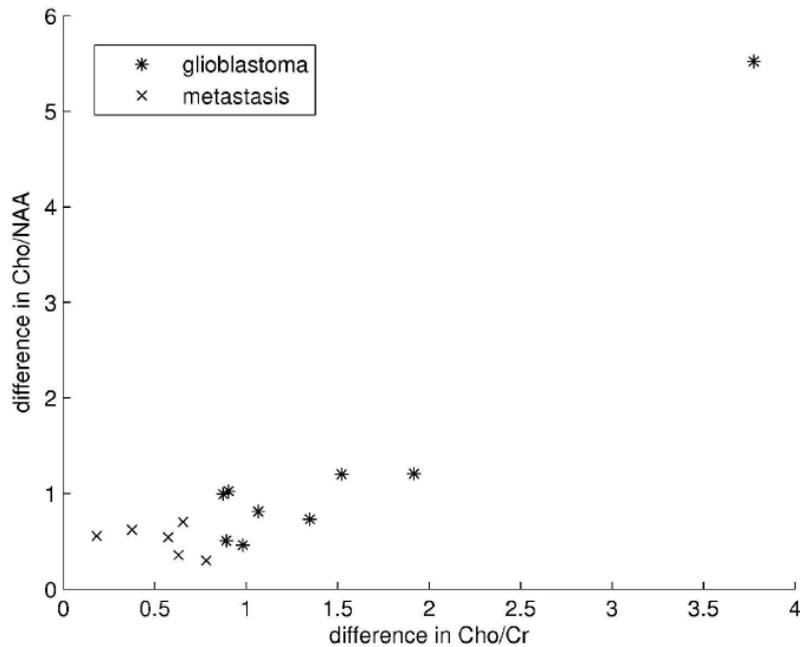


**Figura 22.-** Diagrama de comparación por pares, resultante del test de Kruskal-Wallis y del procedimiento de comparación múltiple de Tukey para Co/Cr. Los números entre paréntesis en el eje vertical indican el número de espectros ERMI utilizados para el análisis estadístico de cada región cerebral. Un total de 1114 espectros han sido analizados. El eje horizontal indica el resultado de los rangos, a partir del test de Kuskal-Wallis. Se asocia un rango superior con un elevado valor de Co/Cr. Existe una diferencia estadística significativa (es decir, valor  $p < 0,005$ ) si los intervalos se encuentran separados. Los intervalos en gris y rojo se solapan y separan respecto al intervalo azul, respectivamente. El cociente Co/Cr es estadísticamente diferente en las regiones de realce tumoral y peri-realce entre GBM y MET. El cociente disminuye estadísticamente de manera significativa en la región de peri-realce respecto a la de sin realce/no hiperintensa T2 en MET, mientras que aumenta de manera estadística en GBM.

Cho/NAA



**Figura 23.-** Diagrama de comparación por pares, resultante del test de Kruskal-Wallis y del procedimiento de comparación múltiple de Tukey para Co/Naa. Los números entre paréntesis en el eje vertical indican el número de espectros ERMI utilizados para el análisis estadístico de cada región cerebral. Un total de 1114 espectros han sido analizados. El eje horizontal indica el resultado de los rangos, a partir del test de Kuskal-Wallis. Se asocia un rango superior con un elevado valor de Co/Naa. Co/Naa muestra una diferencia estadística significativa (es decir, valor  $p < 0,005$ ) si los intervalos se encuentran separados. Los intervalos en gris y rojo se solapan y separan respecto al intervalo azul, respectivamente. El cociente Co/NAA es estadísticamente diferente en la región peri-enlace entre GBM y MET.



**Figura 24.-** Gráfico de dispersión de la diferencia entre el promedio Co/Cr y Co/Naa para el área de realce tumoral y sin realce/no hiperintensa T2 para cada paciente. Se puede observar una clara separación entre GBM y MET. El valor promedio de Co/Cr es 1,48 para GBM y 0,53 para MET. Para Co/Naa el valor promedio es 1,38 para GBM y 0,51 para MET.

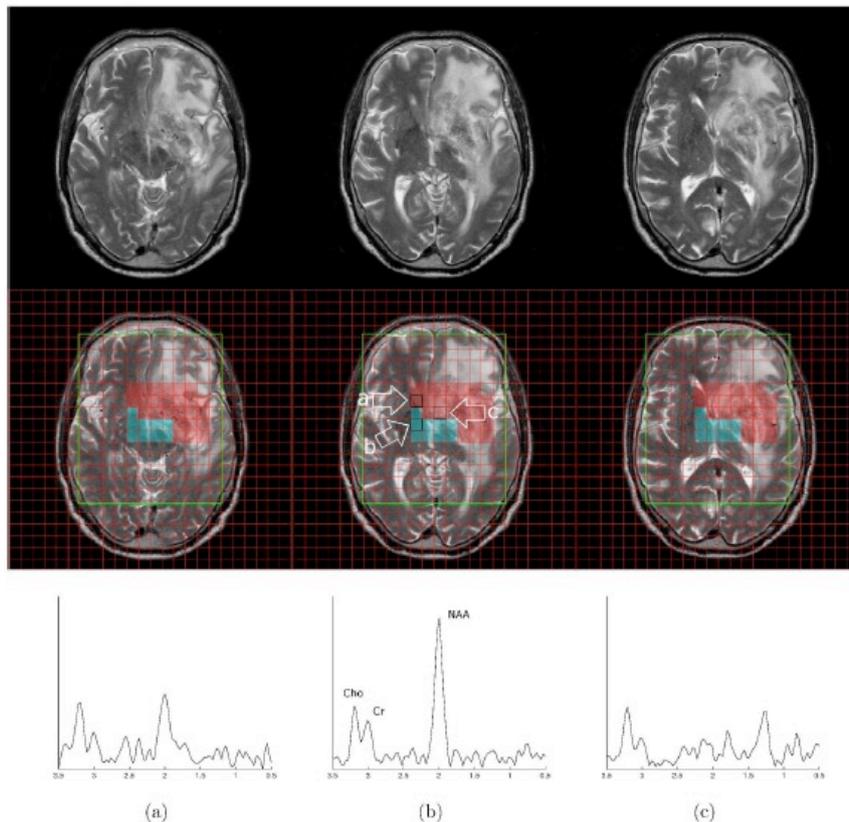
### - Infiltración

En RMI se ha indicado la región infiltrante de GBM en tejido aparentemente normal. Se ha aplicado un valor seleccionado del umbral de Otsu para los valores de los cocientes Co/Naa de un paciente para generar el mapa binario, indicando los vóxeles con cocientes normales y no normales.

El valor de salida umbral seleccionado se ha superpuesto a las imágenes potenciadas en T2, incluidas en el corte 2D-TSI, para dos pacientes con GBM (Figuras 25– 26) y para dos pacientes con metástasis (Figuras 27 – 28). Los vóxeles con valores no normales de la relación Cho/Naa se indican en rojo, mientras que aquellos con valores normales en azul.

El caso 3 representa a un paciente con GBM, confirmado mediante histopatología, teniendo a su vez una lesión satélite (Figura 25). Los vóxeles con valores no normales de Cho/Naa se encuentran en la región hiperintensa T2, así como el tejido adyacente en el hemisferio contralateral. El espectro RM (a) claramente muestra incremento de

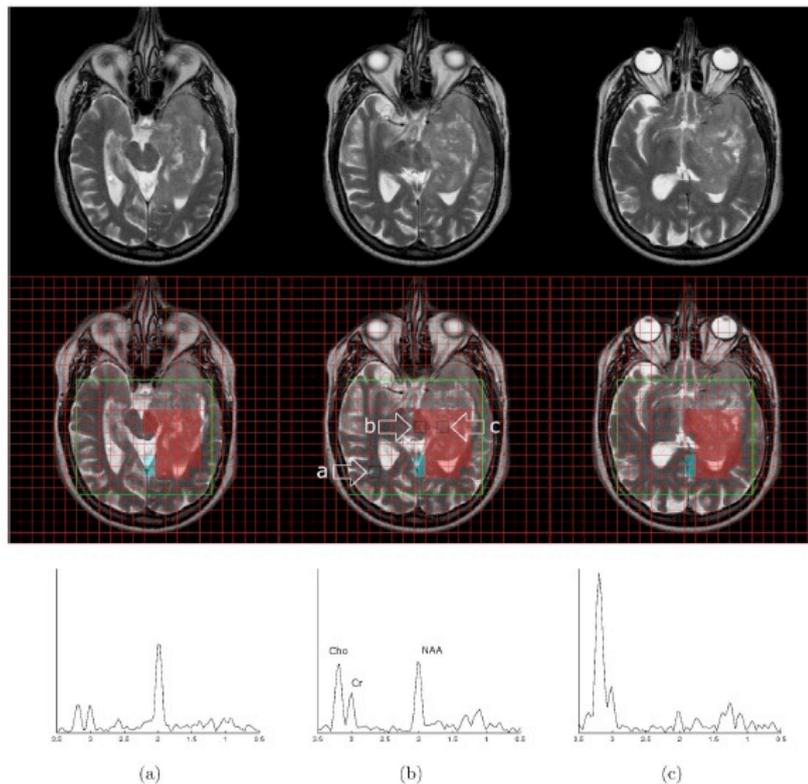
cantidad de Cho respecto a Naa y Cr. El voxel se encuentra situado fuera de la región hiperintensa, sugiriendo que corresponde a infiltración tumoral. También se incluyen los espectros RM de tejido normal (espectro (b)) y de la región de realce del área tumoral (espectro (c)). El caso 4 representa a otro paciente con GBM (Figura 26). El espectro RM del voxel (b) muestra que la concentración de Cho está aumentada en comparación a Naa y Cr. También se incluye el espectro MR en (a), originado de un voxel localizado la parte normal.



**Figura 25.-** Caso 3, paciente con GBM. Parte superior: Imágenes potenciadas en T2 de los cortes contiguos contenidos en la paralelepípedo 2D-TSI. Parte intermedia: Imágenes potenciadas en T2 con los resultados umbral del cociente Cho/Naa superpuestos. Los colores rojo y azul se refieren a niveles no normales y normales de Cho/Naa, respectivamente. Parte inferior: espectros RM de los vóxeles indicados en el enrejillado del corte del intermedio de RMI. Espectro RM (a) corresponde al voxel que está situado en el tejido adyacente en el hemisferio contralateral. La concentración de Cho es superior a la de Na y Cr sugiriendo infiltración tumoral. También se incluyen espectros RM de tejido normal (espectro (b)) y de tumor (espectro (c)).

El caso 10 es un paciente con metástasis, mostrando que no hay infiltración en el parénquima cerebral adyacente en base a los datos de 2D-TSI y ERMI (Figura 27). Los vóxeles con valores no normales de Cho/Naa corresponden totalmente al área hiperintensa de las imágenes potenciadas en T2. También se muestran los espectros MR de diferentes localizaciones que muestran niveles equivalentes de Cho y Cr así

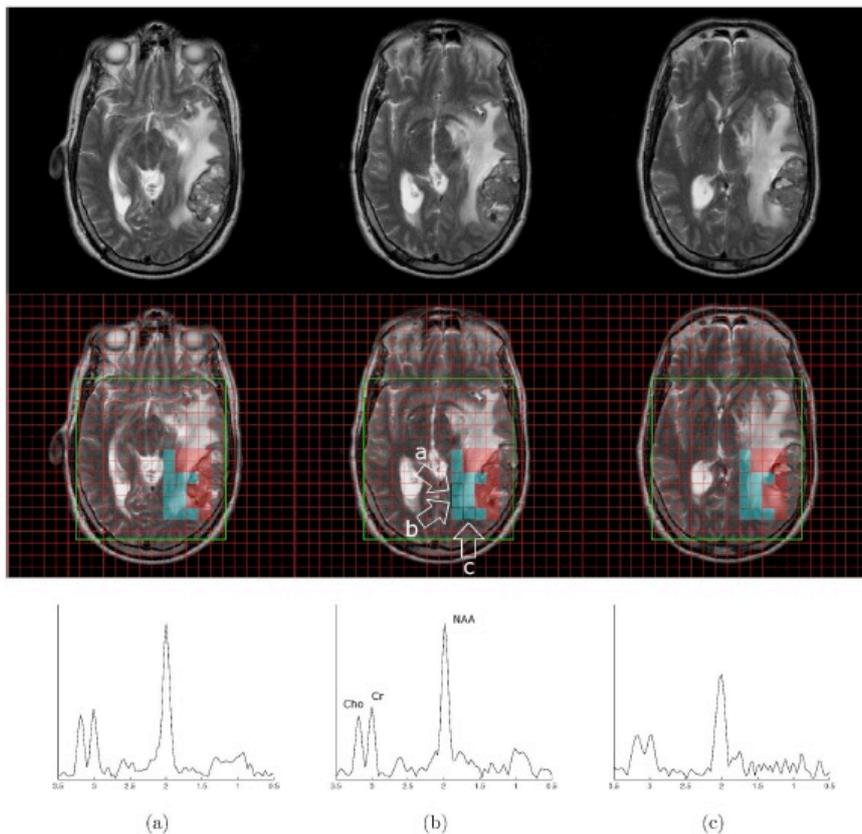
como un aumento de Naa. Estos vóxeles están localizados fuera de la lesión tumoral, en el parénquima del edema con peri-realce o tejido cerebral normal. Para el caso 14, también metástasis, todos los vóxeles con valores no normales de Cho/Naa estaban incluidos en el área hiperintensa de las imágenes potenciadas T2 (Figura 28). Los espectros RM muestran niveles similares de Cho y Cr, con cantidades elevadas de Naa.



**Figura 26.-** Caso 4, paciente con GBM. Parte superior: Imágenes potenciadas en T2 de los cortes contiguos contenidos en la paralelepípedo 2D-TSI. Parte intermedia: Imágenes potenciadas en T2 con los resultados umbral del cociente Cho/Naa superpuestos. Los colores rojo y azul se refieren a niveles no normales y normales de Cho/Naa, respectivamente. Parte inferior: espectros RM de los vóxeles indicados en el enrejillado del corte del intermedio de RMI. Espectro RM (a) corresponde al voxel que está situado en el tejido adyacente en el hemisferio contralateral. La concentración de Cho es superior a la de Na y Cr sugiriendo infiltración tumoral. También se incluyen espectros RM de tejido normal (espectro (b)) y de tumor (espectro (c)).

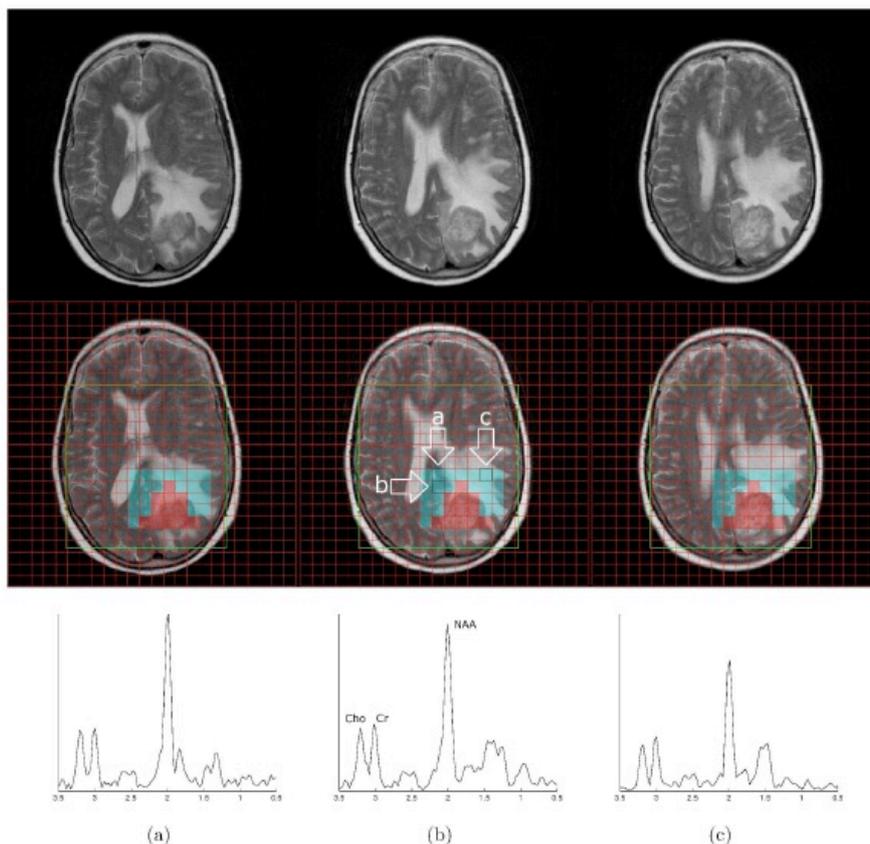
## - Imágenes nosológicas

La imagen nosológica del caso 1 ilustra al naturaleza infiltrante de un GBM, con una extensión peripendimaria (Figura 29). El área de tejido no normal, obtenida a partir de las imágenes RMI potenciadas en T2, se ha etiquetado en rojo en la imagen nosológica, mientras que los vóxeles con niveles no normales del cociente Cho/Naa que se encuentran fuera de esta área se muestran en blanco. En la Figura 29 se muestran los espectros RM (a) y (b), pertenecientes a estos vóxeles blancos en la región de no-realce/no hiperintensa en T2 en la parte superior. La concentración de Cho está aumentada respecto a Naa y Cr, sugiriendo infiltración tumoral. El caso 2 representa a un paciente con GBM, con lesiones satélites (Figura 39). El área en blanco significativamente amplia, en comparación con la región roja, en la imagen nosológica sugiere infiltración tumoral. El verde refleja líquido cerebrospinal, el azul claro materia



**Figura 27.-** Caso 10, paciente con tumor metastásico. Parte superior: Imágenes potenciadas en T2 de los cortes contiguos contenidos en la paralelepípedo 2D-TSI. Parte intermedia: Imágenes potenciadas en T2 con los resultados umbral del cociente Cho/Naa superpuestos. Los vóxeles rojos caen se encuentran localizados totalmente dentro del área hiperintensa en las imágenes potenciadas en T2. Parte inferior: diversos espectros RM, localizados fuera de la lesión tumoral, en el edema peri-realce o en parénquima cerebral normal. Los niveles de Cho y Cr son similares, mientras que el contenido en Naa está aumentando, indicando que no hay infiltración.

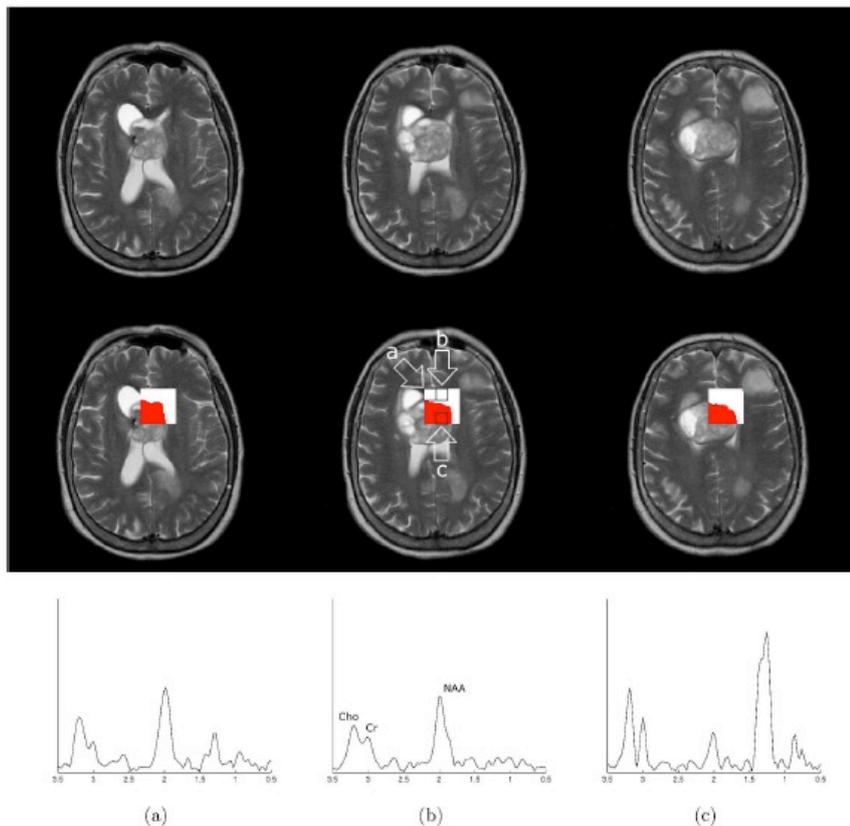
blanca y el azul oscuro materia gris. En la Figura 30 se visualiza el espectro RM (b), situado en el área de infiltración, junto a los espectros de (realce) tumor (espectro (a)) y tejido normal (espectro (c)). El caso 13 es un paciente con lesión metastásica (Figura 31). La región roja, obtenida a partir de la segmentación de la imagen RMI potenciada en T2, presenta un buen acuerdo con los vóxeles que presentan valores no normales de la relación Cho/Naa. Los espectros de diferentes localizaciones en el borde del tumor muestran picos similares en altura para Cho y Cr, mientras que la cantidad de Naa se ve muy incrementada. Finalmente, la región segmentada no normal, obtenida a partir de imágenes RMI potenciadas en T2, concuerda con los vóxeles que muestran valores no normales de Cho/Naa para el caso 12, una metástasis (Figura 32). Los espectros RM, localizados en el borde tumoral, corresponden a parénquima cerebral normal, sugiriendo la no existencia de infiltración tumoral. Las áreas restantes en blanco corresponden a vóxeles que parcialmente contienen tejido no normal.



**Figura 28.-** Caso 14, paciente con tumor metastásico. Parte superior: Imágenes potenciadas en T2 de los cortes contiguos contenidos en la paralelepípedo 2D-TSI. Parte intermedia: Imágenes potenciadas en T2 con los resultados umbral del cociente Cho/Naa superpuestos. Los vóxeles rojos se encuentran localizados totalmente dentro del área hiperintensa en las imágenes potenciadas en T2. Parte inferior: diversos espectros RM mostrando que el contenido en Naa está aumentando y los niveles de Cho y Cr son similares; no se detecta infiltración.

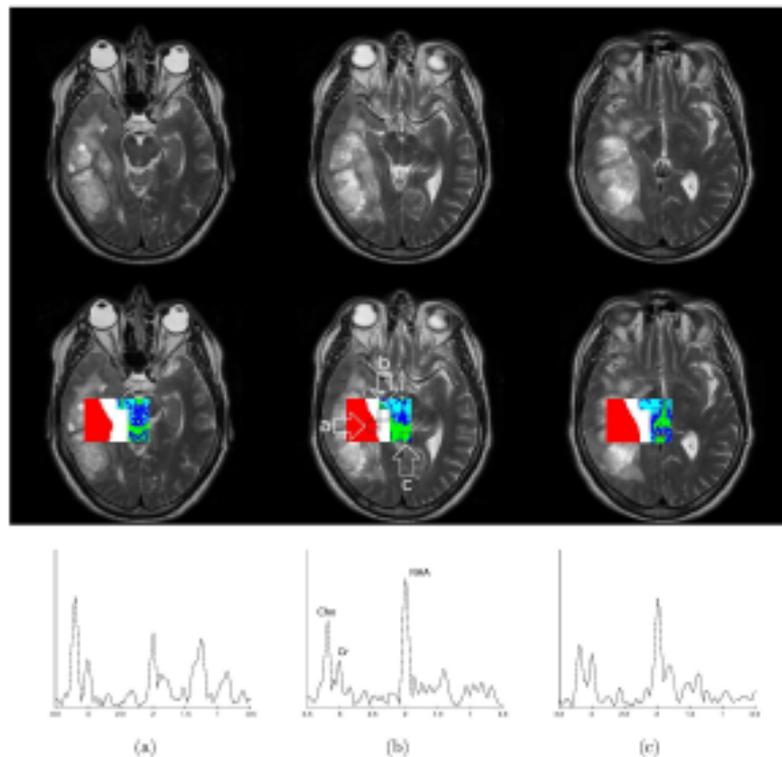
## Discusión

GBM y metástasis son los tumores mas comunes en adultos. A pesar de los grandes avances en el tratamiento, su pronóstico permanece pobre (19,20). GBM es el más agresivo de los tumores gliales. Se inicia a partir de los astrocitos, subtipo de células de la macroglia del sistema nervioso central. GBM se asocian con un pronóstico pésimo debido a su capacidad de infiltración difusa en el parénquima normal cerebral, así como al complejo carácter del tumor por si mismo (21). El promedio de supervivencia es inferior a un año desde su diagnóstico. Entre las complicaciones mas temidas del cáncer



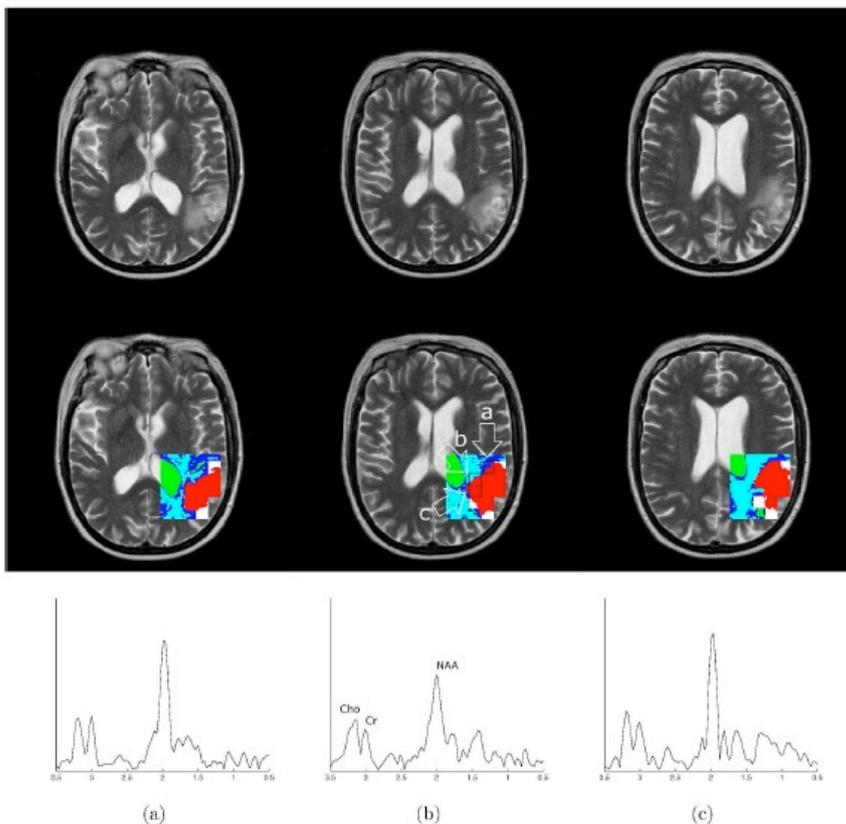
**Figura 29.-** Caso 1, paciente con GBM. Parte superior: Imágenes potenciadas en T2 de los cortes contiguos contenidos en la paralelepípedo 2D-TSI. Parte intermedia: Imágenes potenciadas en T2 con la imagen nosológica superpuesta. El tejido no normal a partir de RMI se indica en rojo. Los vóxeles que contienen niveles no normales de Cho/Naa y caen fuera del área no normal de T2, están coloreados en blanco. Parte inferior: espectros RM de vóxeles que están indicados en la imagen nosológica en el corte central de RMI. Los vóxeles (a) y (b) se encuentran localizados en área blanca, sugiriendo infiltración. Los espectros RM presentan un incremento en el contenido de Cho con respecto a Naa y Cr. El voxel (c) está situado dentro del tumor.

se encuentra la metástasis y sucede en un 10-40% de los pacientes. En adultos, las localizaciones primarias mas comunes de la metástasis cerebral son los neoplasmas de pulmón, cáncer de mama y melanoma maligno (20, 22). La selección del tratamiento apropiado se basa en diferentes factores incluyendo al edad del paciente, número de metástasis, tipo de tumor primario, estatus funcional y extensión de extra craneal de la enfermedad (22). Estos factores también determinan el pronóstico. La media de supervivencia se encuentra entre los 2 y 16 meses (20, 22). Las aproximaciones terapéuticas para los tumores cerebrales incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia (20-24). Muchos de los pacientes son tratados con una terapia combinada, de acuerdo con los factores pronóstico, el tipo de tumor e histología.



**Figura 30.-** Caso 2, paciente con GBM. Parte superior: Imágenes potenciadas en T2 de los cortes contiguos contenidos en la paralelepípedo 2D-TSI. Parte intermedia: Imágenes potenciadas en T2 con la imagen nosológica superpuesta. El tejido no normal a partir de RMI se indica en rojo el líquido cerebroespinal en verde, la materia blanca en azul claro y en azul oscuro la materia gris. Los vóxeles que contienen niveles no normales de Cho/Naa y caen fuera del área no normal de T2, están coloreados en blanco. Parte inferior: espectros RM de vóxeles que están indicados en la imagen nosológica en el corte central de RMI. El espectro MR (a) proviene de tejido tumoral mientras que el espectro (b) se origina a partir de un voxel de infiltración, mostrando un aumento de Cho respecto a Cr y mayor cociente Cho/Naa. El espectro MR (c) representa a tejido normal.

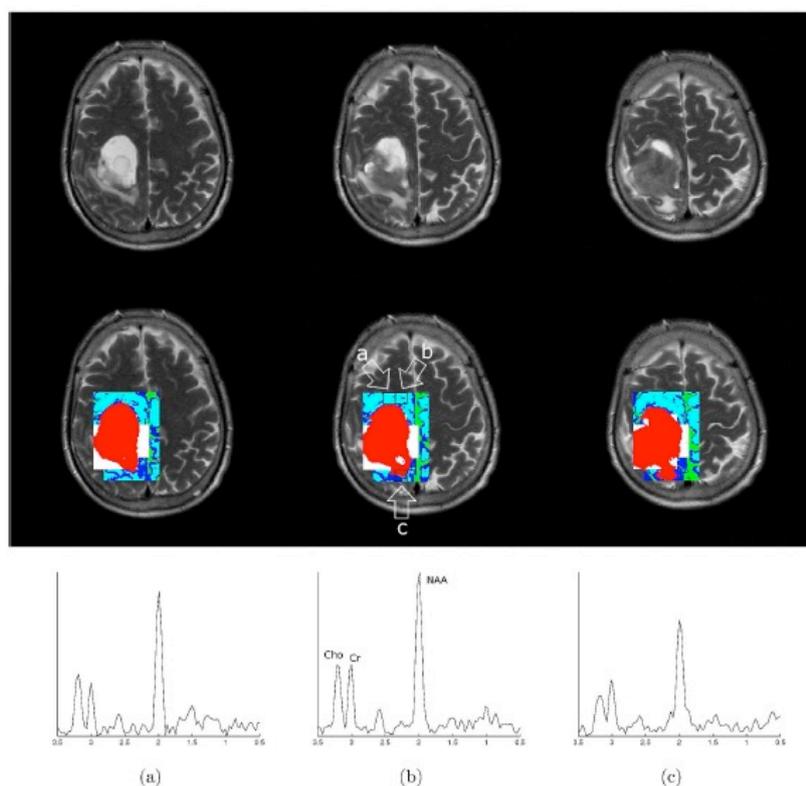
La RMI es el método seleccionado para el diagnóstico, evaluación y seguimiento de tumores cerebrales (25). Los GBM y metástasis cerebrales son habitualmente lesiones con una forma irregular con zonas tipo anillo de realce de contraste rodeando a un área central necrótica hipointensa en imágenes potenciadas T1 con realce de Gd (20, 26). La diferenciación entre los tipos de tumores o entre recurrencia tumoral vs cambios relacionados con la terapia hoy en día aún es un reto. Técnicas avanzadas de MRI como espectroscopía, difusión y perfusión proporcionan nuevos métodos de evaluación de diferentes patologías del cerebro (27-30).



**Figura 31.-** Caso 13, paciente tumor metastásico. Parte superior: Imágenes potenciadas en T2 de los cortes contiguos contenidos en la paralelepípedo 2D-TSI. Parte intermedia: Imágenes potenciadas en T2 con la imagen nosológica superpuesta. Parte inferior: espectros RM, localizados en el borde tumoral, se indican en la imagen nosológica del corte intermedio de la imagen RMI. No se detecta infiltración. Los restantes píxeles blancos son debidos a efectos de volumen parcial.

La utilización exclusiva de la RMI convencional no permite de forma sencilla diferenciar entre lesiones solitarias de metástasis y GBM. Por consiguiente, esta parte de la investigación de esta Tesis Doctoral explora el uso de la información adicional que proporciona la espectroscopía de imagen RM (ERMI) en combinación con imágenes nosológicas. En tumores cerebrales, la concentración de Naa (resonancia alrededor de

2,0 ppm) habitualmente está disminuida ya se conoce como un marcador de densidad y viabilidad neuronal y axonal. Una disminución de la cantidad de Naa se asocia a una pérdida de neuronas o lesión axonal. Por otro lado, la Cho a menudo muestra una concentración elevada en tumores cerebrales. La resonancia a 3,2 ppm se asigna a los grupos trimetilamonio de la Cho y sus derivados. La mayor aportación a dicha resonancia la proporcionan la fosfatidilcolina (PCho) y glicerofosfatidilcolina (GPCho), mientras que la Cho libre es un componente menor (31-33). En caso de patología, la contribución de la Cho aumenta significativamente, reflejando formación y destrucción de membrana, mielina y lípidos (31-33). La Cr es esencial para el ciclo energético celular y principalmente proviene del conjunto de metabolitos intracelulares Creatina (Cr) y Fosfocreatina (PhCr). El pico de Cr a 3,0 ppm incluye a Cr y PhCr con un desplazamiento químico similar del grupo CH<sub>3</sub>. La intensidad de la señal a 3,0 ppm puede estar disminuida en algunos tumores, debido a un aporte inadecuado de energía (32, 34).



**Figura 32.-** Caso 12, paciente tumor metastásico. Parte superior: Imágenes potenciadas en T2 de los cortes contiguos contenidos en la paralelepípedo 2D-TSI. Parte intermedia: Imágenes potenciadas en T2 con la imagen nosológica superpuesta. Parte inferior: espectros RM de los vóxeles indicados en la imagen nosológica del corte intermedio de RMI. No se detecta infiltración. Los restantes píxeles blancos son debidos a efectos de volumen parcial.

Estudios previos, diferenciando GBM de metástasis, han aplicado espectroscopía RM de volumen único, que proporciona información metabólica de una localización única en un periodo corto de tiempo (5,6). En la investigación que aquí se presenta, se han adquirido datos 2D-TSI que son capaces de generar mapas de metabolitos del cerebro. El tiempo necesario habitual para adquirir los cortes 2D-TSI con una matriz de resolución 24x24 es de aproximadamente 6 minutos, mientras que para matrices de resolución parecida usando secuencias estándar de adquisición el tiempo requerido es mucho mayor. La ventaja de este protocolo de multivoxel es que se puede visualizar y estudiar en el cerebro y de manera rápida el tumor entero, la región de periférica de realce y el área de no no-realce/no hiper-intensa en T2 con una relativa resolución espacial elevada. De esta manera, la porción metabólica más activa del tumor puede ser identificada con mayor probabilidad en comparación con la espectroscopía RM de volumen único, donde la posición del voxel es esencial y a menudo subjetiva, como ya se ha mostrado y comentado a lo largo del apartado 6.1.1.

Preul y col. (35) realizaron el promedio de datos de espectroscopía multivoxel a 1,5 T a TE largo (272 ms) dentro de la región tumoral y encontraron un nivel elevado de Cho en GBM (24 casos) en comparación con metástasis (16 casos). Law y col (9) compararon el valor máximo de la relación Cho/Cr para gliomas de alto grado (11 casos) y metástasis (6 casos) en las regiones tumoral, peri-tumoral (hiper-intensa en imagen RMI potenciada en T2, pero no en la imagen RMI potenciada en T1 post-Gd) y parénquima cerebral normal contralateral usando ERM a TE largo (135 ms) y a 1,5 T. La relación Cho/Cr fue  $0.96\pm 0.19$  y  $0.86\pm 0.19$  en el parénquima cerebral normal contralateral,  $2.28\pm 1.24$  y  $0.76\pm 0.23$  en el área peritumoral, y  $3.92\pm 3.31$  y  $1.84\pm 1.22$  la zona de realce tumoral para GBM y metástasis, respectivamente. Law y col. refirieron diferencias significativas para valores de Cho/Cr en el área de realce tumoral y peri-realce. Fan y col usando ERM de volumen único a TE corto (45 ms) (2,0 T) para comparar los máximos de Cho/Cr en regiones similares de gliomas de alto grado (14 casos 6 de los cuales GBM) y metástasis (8 casos). La relación Cho/Cr fue  $0.91\pm 0.17$  y  $0.87\pm 0.24$  en el parénquima cerebral normal contralateral,  $2.65\pm 0.32$  y  $1.22\pm 0.38$  en el área peri-tumoral, y  $4.98\pm 1.46$  y  $1.37\pm 0.92$  en la región de realce del tumor para GBM and metástasis, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas para el cociente Cho/Cr en las regiones de realce tumoral y de peri-realce. Finalmente, Chiang y col llevaron a cabo la comparación de los máximos valores de Cho/Cr usando 3T y ERM TE largo (270 ms) en GBM (14 casos) y metástasis (12 casos) y sólo hallaron

diferencias significativas en el área peritumoral;  $0.29 \pm 0.51$  en metástasis y  $1.30 \pm 0.45$  en GBM (10). La relación Cho/Cr en la región tumoral fue  $1.55 \pm 0.74$  y  $1.82 \pm 0.66$  para metástasis y GBM, respectivamente. Un resumen general se incluye en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Metabolitos y RMN. Resumen bibliográfico. GBM se refiere a glioblastoma multiforme, glioma de grado más alto, y MET a metástasis. El número de casos se indica entre paréntesis. TE y FS indican tiempo de eco e intensidad del campo magnético de los equipos de RM, respectivamente.

Estudio	TE(ms)	FS(T)	Metabolito	Patología	Control	Peritumoral	Captación Contraste
Preul et al.	272	1.5	Cho	GBM (24) MET (16)			Aumentada Disminuida
Law et al.	135	1.5	Cho/Cr	HCG (11) MET (6)	0.96 $\pm$ 0.19 0.86 $\pm$ 0.19	2.28 $\pm$ 1.24 0.76 $\pm$ 0.23	3.92 $\pm$ 3.31 1.84 $\pm$ 1.22
Fran et al.	45	2.0	Cho/Cr	HCG(14) MET (8)	0.91 $\pm$ 0.17 0.87 $\pm$ 0.24	2.65 $\pm$ 0.32 1.22 $\pm$ 0.38	4.98 $\pm$ 1.46 1.37 $\pm$ 0.92
Chiang et al.	270	3.0	Cho/Cr	GBM (14) MET (12)		1.30 $\pm$ 0.45 0.29 $\pm$ 0.51	1.82 $\pm$ 0.66 1.55 $\pm$ 0.74

En este estudio, se han analizado los cocientes Cho/Cr y Cho/Naa en las regiones de realce tumoral, de peri-realce y no realce/No hiperintensa T2. El término peri-realce ha sido preferido al de peri-tumoral ya que el margen de un glioma de alto grado no está bien definido en las imágenes RMI potenciadas en T2 debido a la elevada naturaleza infiltrativa de los gliomas. (9,21). Los cocientes de los vóxeles se promediaron dentro de cada una de las regiones. Se han encontrado diferencias significativas en los promedios de Cho/Cr y Cho/NAA entre GBM y metástasis en la zona de realce tumoral y el área de peri-realce. La combinación de ambos cocientes se puede usar para extraer una regla de decisión. Estos hallazgos son consistentes con lo ya publicado, lo que apoya nuestras conclusiones. Pero a diferencia de las aproximaciones previas, la investigación en esta Tesis también se centra en la visualización de la infiltración tumoral.

Aunque la comparación entre las relaciones de metabolitos en las regiones tumoral y peri-realce posibilita la diferenciación entre GBM y metástasis, en cambio no muestra

directamente donde se puede localizar la infiltración. Con la aproximación aquí desarrollada, la infiltración se puede detectar automáticamente y visualizar usando mapas de colores e imágenes nosológicas. La imagen nosológica ofrece una forma interesante de representar la heterogeneidad tumoral, que puede ser de ayuda clínica en la toma de decisiones terapéuticas. Sin embargo, una limitación de las aproximaciones previas para imagen nosológica, ha sido que sólo se tenía en cuenta la información espectroscópica de RM dentro de las lesiones definidas mediante RMI (16). De tal manera que, las imágenes nosológicas resultantes muestran un contorno tumoral similar al que se puede observar en la imagen de RMI. Esto no es lo esperable en el caso de tumores con infiltración difusa (p.e. (21)). En la metodología aquí desarrollada, los mapas de colores, calculados a partir de la relación Cho/NAA, se ha superpuesto con las imágenes nosológicas para visualizar la infiltración ya que el cociente Cho/NAA y NAA son importantes biomarcadores para la infiltración tumoral en gliomas (36). Los espectros RM con valores no normales del cociente Cho/NAA se han encontrado en las regiones peri-realce y no-realce/no hiperintensa en T2 de gliomas, y, además, se ha publicado la existencia de una correlación negativa entre el nivel de NAA y el grado de infiltración del tumor (7, 37, 38). La región de peri-realce representa un incremento en el agua intersticial debido a alteraciones en la permeabilidad capilar y ruptura de la barrera cerebro-sanguínea, originada por el tumor (9). En el caso de gliomas de alto grado, esta región contiene infiltración celular a lo largo de los canales vasculares. En metástasis, la anormalidad de la señal en la región peri-realce probablemente es debida a edema vasogénico puro. Debido a los efectos de volumen parcial, se pueden obtener en las imágenes nosológicas de metástasis algunos píxeles blancos. Estos píxeles blancos tienen su origen en vóxeles que, parcialmente, contienen tejido de realce tumoral o de peri-realce en ERMI. Sin embargo, contrariamente a lo que sucede en GBM, no se han encontrado para las metástasis vóxeles blancos de infiltración fuera de la región de peri-realce.

Una limitación de la metodología desarrollada en esta parte de la Tesis es que sólo se han adquirido datos de espectroscopía de RM bidimensional (2D-ERMI), con el paralelepípedo de adquisición ERMI se localizó con el objetivo de incluir el máximo volumen del tumor para así diferenciar entre lesiones solitarias de metástasis y de GBM. El uso de ERMI tridimensional probablemente permita cubrir la casi totalidad del tumor (39) y así posibilitar una diferenciación más precisa entre GBM y metástasis, aunque, a costa de un incremento significativo del tiempo de adquisición. Otra posible limitación

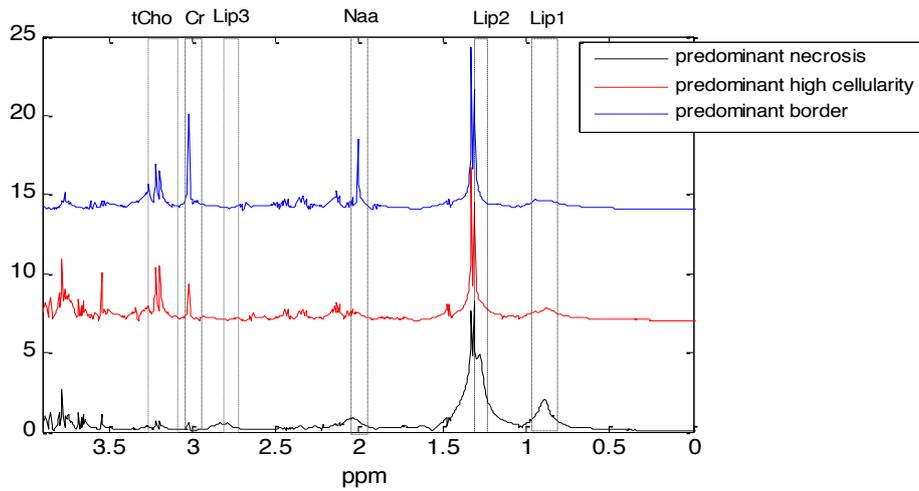
de la metodología desarrollada es que no se incluye correlación con otro tipo de datos de RMI como difusión potenciada, imagen de difusión de tensor y perfusión potenciada. La combinación de dichos métodos con ERMI puede producir una potencial mejora del diagnóstico (9, 10, 40-46), aunque, como en el caso de la ERMI tridimensional el tiempo de adquisición puede aumentar significativamente.

## **4.2.- PERFIL METABÓLICO EX VIVO MEDIANTE HR-MAS**

### **4.2.1.- Correlación del perfil metabólico mediante HR-MAS de la muestra de biopsia cerebral y tipo de tejido tumoral**

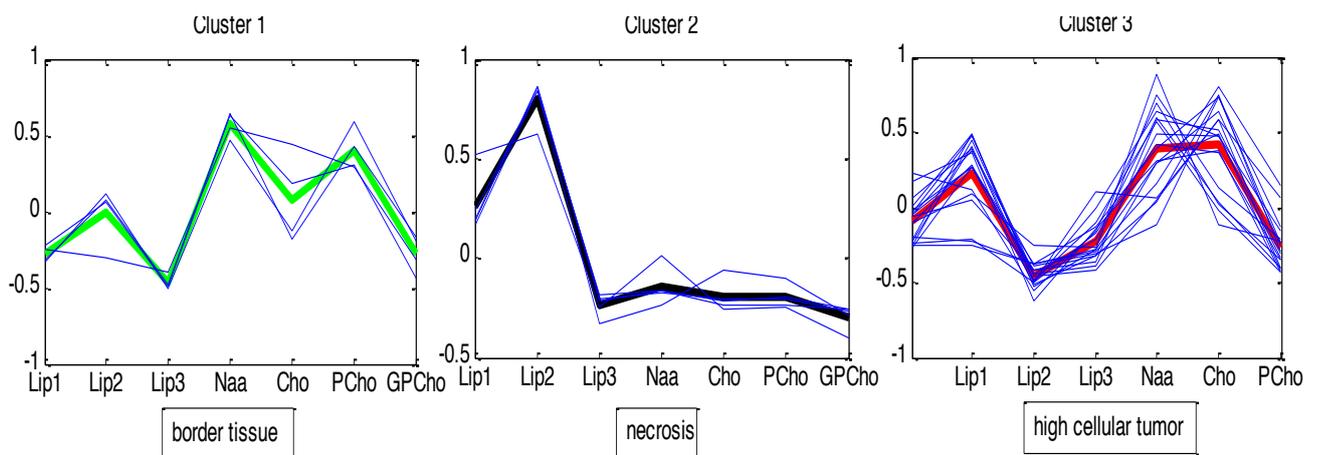
#### Resultados del análisis estadístico

De acuerdo con el examen histológico, se ha observado una gran extensión de heterogeneidad en el tejido para todos los tumores gliales estudiados. En particular para el grupo de los GBM, aunque en todos los casos fueron clasificados como tumor, a partir de la histopatología existe una elevada variabilidad en su composición del tejido como diferente contenido necrótico, alta celularidad o tejido periférico. Algunos ejemplos contenían el 90-100% de necrosis y otros contenían sólo áreas de periferia adyacente infiltrante del tumor. Los espectros de HR-MAS dentro del grupo de GBM mostraron diferencias importantes en la concentración de Naa, tCho, Lips y Cr (ver Figura 33). Se observó una distribución de la concentración de metabolitos altamente dispersa alrededor de los valores medios y se pudieron identificar valores fuera de la distribución media. Estas varianzas tan grandes podrán justificarse por el hecho de que los espectros de los tejidos de GBM provengan de diferentes localizaciones tumorales, es decir de regiones con distinto contenido de tipo de tejido. Este hecho puede tener una influencia en las concentraciones de metabolitos, como previamente ya se ha mostrado (2,3). Por esta razón se investigó si el grupo de los casos con valores de concentraciones lejos de la distribución media pudieran constituir una nueva subclase dentro del grupo de GBM.

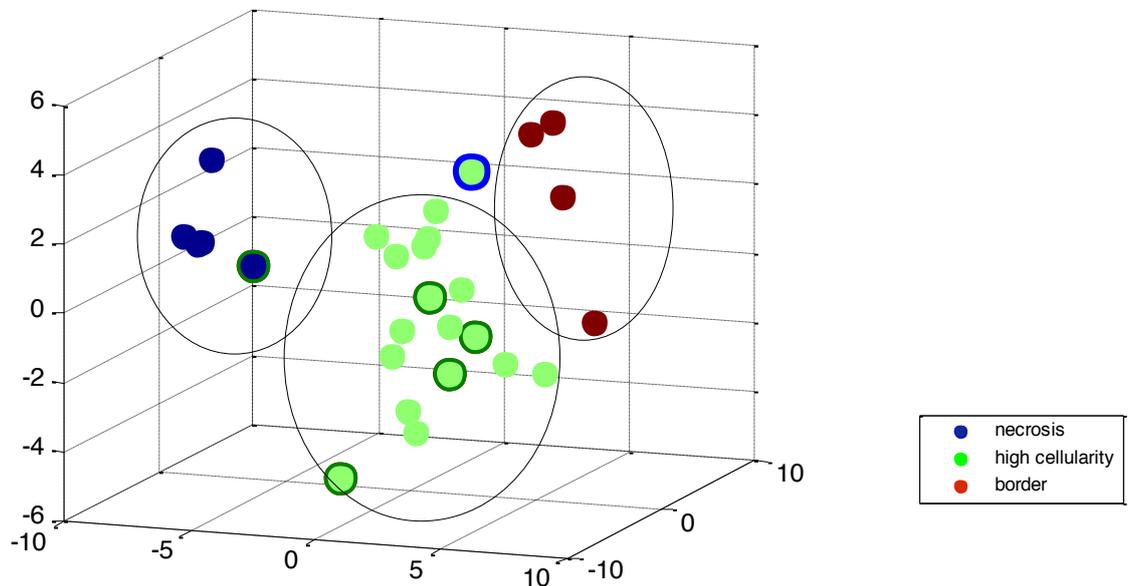


**Figura 33.-** Datos HR-MAS para muestras de GBM conteniendo diferentes tipo de tejido. Sin usar ningún conocimiento previo, la opción mejor para el agrupamiento del conjunto de GBM son 3 subgrupos según la solución de “Homogeneity-Separation” siguiendo los índices de Sil y Wint. A partir de otros análisis estadísticos, como KL, de forma general, se constató que 3 es el número óptimo de conjuntos para el uso del algoritmo de grupos k-medio.

Los resultados del proceso de agrupamiento para la correlación entre tipo de tejido y concentración de metabolitos se muestran en la Figuras 34 y 35. En la Figura 34 se visualizan los perfiles característicos para los centroides obtenidos, junto con los vectores característica de los objetos asignados para cada uno de los tres grupos, después del centrado y normalización de la media a cero y a una unidad de desviación estándar.



**Figura 34.-** Grupos de perfiles de características, los centroides están marcados en negrita, y los objetos dentro de los grupos en azul



**Figura 35.-** Grupos obtenidos a partir de las concentraciones de los metabolitos. De manera visual directa se pueden detectar diferencias considerables entre los perfiles metabólicos de los tres grupos (Figura 34). Los grupos obtenidos son homogéneos y claramente separables (Figura 35). El conjunto 1 (C1) se caracteriza por elevados niveles de NAA, un comportamiento atípico para los tumores GBM, pero típico para la región periférica del tumor o para regiones de infiltración en tejido normal (12). Los objetos en el conjunto 2 (C2) muestran niveles de Lip(s) muy elevados, lo que es una característica esperable en GBM y se encuentra principalmente asociada a necrosis (3), mientras que el conjunto 3 (C3) posee niveles altos de compuestos de Colina (Cho(s)), biomarcador de la elevada celularidad que caracteriza el crecimiento celular activo del tumor (13).

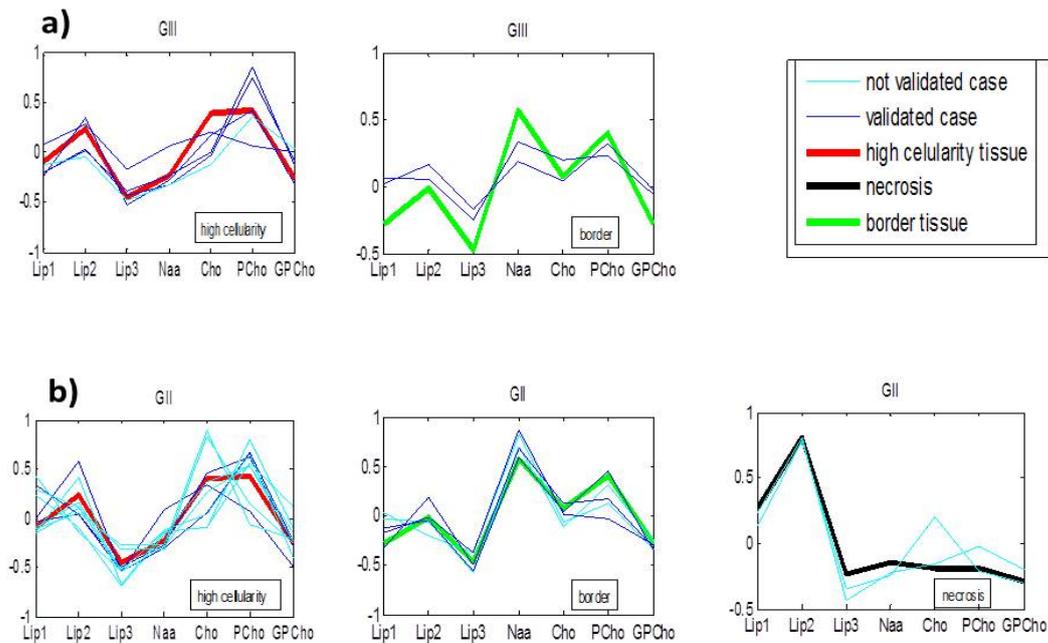
Cuando estos resultados se comparan con las conclusiones obtenidas a partir de la histología se obtiene un muy buen acuerdo con las concentraciones de metabolitos. Así, para 21 de los 22 casos validados histológicamente el contenido del tipo de tejido predominante fue idéntico tanto a partir del agrupamiento por perfiles metabólicos como del procedimiento histopatológico. Esto confirma que el conjunto C1 representa los casos con tejido tumoral periférico/infiltrante, C2 con tejido predominante necrótico y C3 con tejido predominante de alta celularidad. A partir de ahora la nomenclatura para las clases de tejido se simplificará para los grupos obtenidos como tejido: periférico, necrótico y alta celularidad, respectivamente. En la Figura 35 se muestra todas las clases de GBM en un plano escalado multidimensional (las 7 dimensiones (7 metabolitos característicos) son reducidos a 3 dimensiones) haciendo hincapié en la distribución de

los datos dentro de los grupos. El caso no correctamente clasificado, con borde azul claro en la Figura 35, agrupado como predominantemente tejido de alta celularidad, está compuesto mayoritariamente con tejido normal. Como este tipo de tejido no ha sido considerado en el proceso de clasificación del estudio, se puede considerar como un caso fuera de todos los promedios lo que podría explicar su posición alejada de los tres conjuntos obtenidos. Los cinco casos para los que no se dispone de la validación histológica (bordeados con verde oscuro en la Figura 35) no interfieren en los resultado del agrupamiento ya que como se puede observar quedan evidentemente incluidos como objetos dentro de cada grupo.

Cuando se tiene en cuenta los cocientes entre metabolitos se obtiene un acuerdo con los resultados histológicos para 18 de los 22 casos. Para tres de los cuatro casos no clasificados correctamente el tejido predominante a partir del agrupamiento es periférico, mientras que el resultado de histopatología es de alto contenido de células tumorales. Uno de los casos no clasificados se asignó mediante agrupamiento como alta celularidad mientras que por histología fue tejido normal (el mismo caso no clasificado cuando se trabajó directamente con las concentraciones de los metabolitos).

#### **- Resultados de la generalización a gliomas de grado bajo**

Para el grupo de tumores Grado III, en 2 de los 7 casos hay una elevada correlación con tejido tipo periférico mientras que para 5 casos se ha encontrado una alta correlación con el modelo de tejido de elevada celularidad, como se comprueba en la Figura 36a. Estos resultados están de acuerdo con los datos histológicos. Para el caso 28 se encuentra una situación especial, desde el punto de vista histopatológico el resultado es 50%-50% tejido de alta celularidad e infiltración. Este caso se ha clasificado, en base al máximo coeficiente de correlación, como predominantemente tejido de clase periférico. No obstante, también se ha obtenido una elevada correlación con tejido de alta celularidad. Para este clase de tumores no se han encontrado casos con tejido necrótico predominante. En el caso del grupo de tumores GII, 11 de los casos estuvieron altamente correlacionados con tejido tumoral de clase alta celularidad, en 5 de los casos con tejido tipo periférico y 2 con tejido necrótico, ver Figura 36b. Se ha encontrado un muy buen acuerdo con la histología para 7 de los 9 casos validados histológicamente.



**Figura 36.** Asignación de las clases de tejidos basado en los coeficientes de correlación mas elevados, para los grupos de tumores: a) GIII y b) GII

### - Discusión

La histopatología es hoy en día el procedimiento común para la evaluación detallada y el diagnóstico de tumores del SNC. Esta técnica proporciona información no sólo del tipo y grado del tumor sino también de la patología del tejido tumoral. Las técnicas de RMN, que proporcionan una elevada información bioquímica sobre las moléculas del organismo investigado, son vistas como una alternativa y complementaria en el diagnóstico y evaluación de tumores del SNC. En particular la espectroscopía de volumen único (ERM) y multivoxel (ERMI), ya comentadas en apartados anteriores, junto con HR-MAS, que se discutirá en los apartados siguientes, han probado un grado de precisión elevado en la determinación del grado y tipo de tumor. En estudios previos se ha demostrado que se pueden correlacionar los cambios metabólicos con los tipos de tumor (14, 15) y grados (16-19). Sin embargo, debido a la heterogeneidad del tejido la gradación de tumores gliales no es siempre directa con estas técnicas. Mediante HR-MAS es factible cuantificar la microheterogeneidad de los GBM como se muestra en (17). No obstante, las conclusiones que se obtuvieron en (17) fueron para un número limitado de muestras provenientes de un único paciente con GBM. Aquí se propone un estudio mas complejo incluyendo muestras de diferentes pacientes con tumores gliales

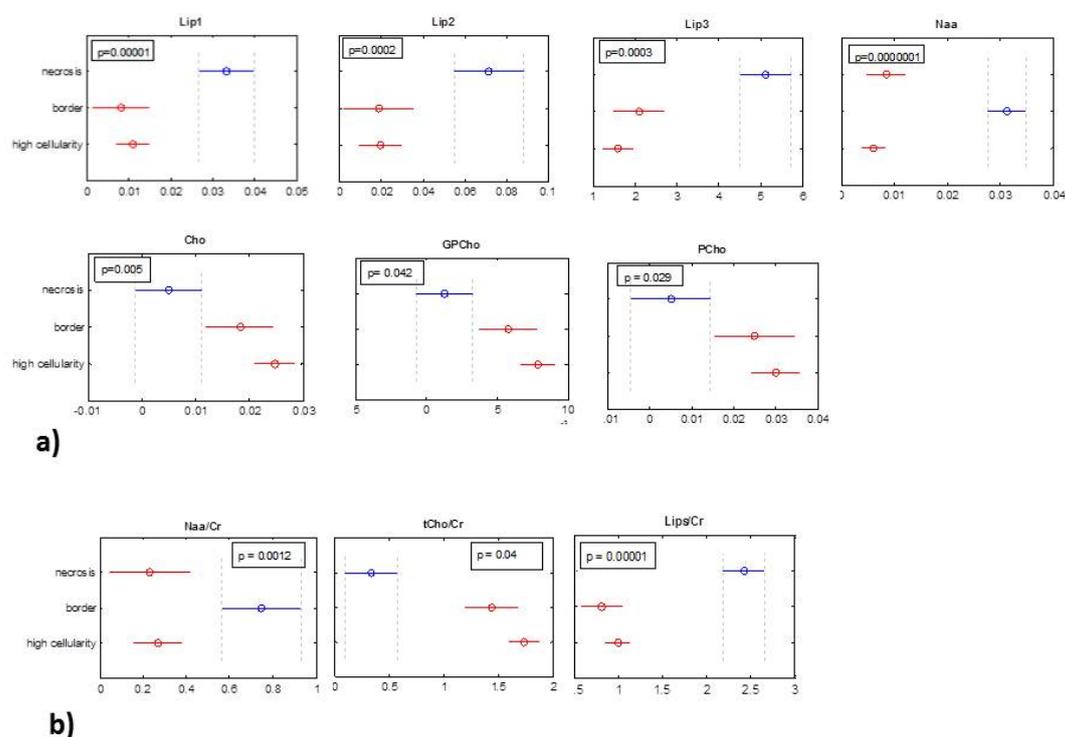
con distintos grados de agresividad y mediante un avanzado método estadístico. Los resultados obtenidos confirman que se puede diferenciar los tipos de tejido tumoral para los tumores gliales independientemente del grado de agresividad simplemente usando la información proveniente de los datos ex vivo de HR-MAS. Además, se demuestra que las variaciones en las concentraciones de los metabolitos están correlacionados y no son independientes entre sí, y basado en estos hallazgos, los modelos representativos de tejidos que se obtienen a partir de los perfiles metabólicos son necrótico, alta celularidad y periférico.

#### - **Biomarcadores mejores para la diferenciación de tejidos**

Los lípidos son los marcadores mas fiables para la progresión tumoral y un incremento en sus concentraciones indican necrosis, que es una de las características histopatológicas de los tumores de grado alto (20). Esto ha sido apoyado mediante estudios ex vivo posteriores, mostrando no sólo una correlación entre los lípidos móviles visibles en RMN (con tiempos de correlación altos) y el porcentaje de necrosis (3), sino también la presencia de lípidos móviles en tumores sin necrosis (21), mientras que en (1) se muestra que las concentraciones de lípidos móviles están linealmente correlacionados con la cantidad de necrosis. Los resultados aquí obtenidos confirman plenamente dichas observaciones. Adicionalmente se demuestra que los lípidos pueden ser un biomarcador fiable para la identificación de tejido del borde del tumor cuando las concentraciones de los lípidos son apenas detectables; y también para separar tejido de alta celularidad y tejido periférico del tumor respecto a la necrosis; ver Figura 37 donde se ha realizado un análisis de comparación múltiple (22)

El grupo del conjunto de compuestos de Colina (tCho), que incluye PCho (fosfatidilcolina) y GPCho (Glicerofosfatidilcolina), está asociado con la progresión del tumor del SNC a concentraciones elevadas. En regiones tumorales de metástasis y GBM se han encontrado elevadas concentraciones de tCho (23), reflejando un incremento en la celularidad y rápida destrucción-formación de membranas celulares durante el crecimiento de células cancerosas (13, 24-27). La concentración de Colina no es suficiente para diferenciar gliomas de bajo grado de alto grado (28), aunque su combinación con las variaciones de mI y Lípidos-macromoléculas como se ha visto en el apartado 6.1 y en (29) puede permitir una diferenciación entre GII, GIII y GBM. No obstante, la concentración de Cho puede servir como biomarcador para diferenciar entre

los tipos de tejidos como se muestran en los resultados de este apartado. La menor cantidad de tCho en gliomas de alto grado en comparación con los de bajo grado puede ser debido al efecto de la dilución de la densidad absoluta celular por la presencia de necrosis (30). Los resultados aquí obtenidos confirman las observaciones anteriores. Además de estudios previos, los resultados aquí obtenidos demuestran que la degradación en las concentraciones de tCho está relacionada no sólo con el grado de agresividad sino también con la heterogeneidad del tejido. Los valores de la concentración de Cho son mayores en regiones tumorales de alta celularidad.



**Figura 37.-** Diferencias entre las tres clases de tejidos para a) los metabolitos considerados en esta parte de la tesis y b) para los valores de los cocientes de metabolitos. El valor promedio viene representado por un círculo y las líneas alrededor proporcionan el intervalo de valores que toman esas características. También se indica el valor p relativamente altas en regiones periféricas del tumor, pero son muy bajas en necrosis (Figura 37).

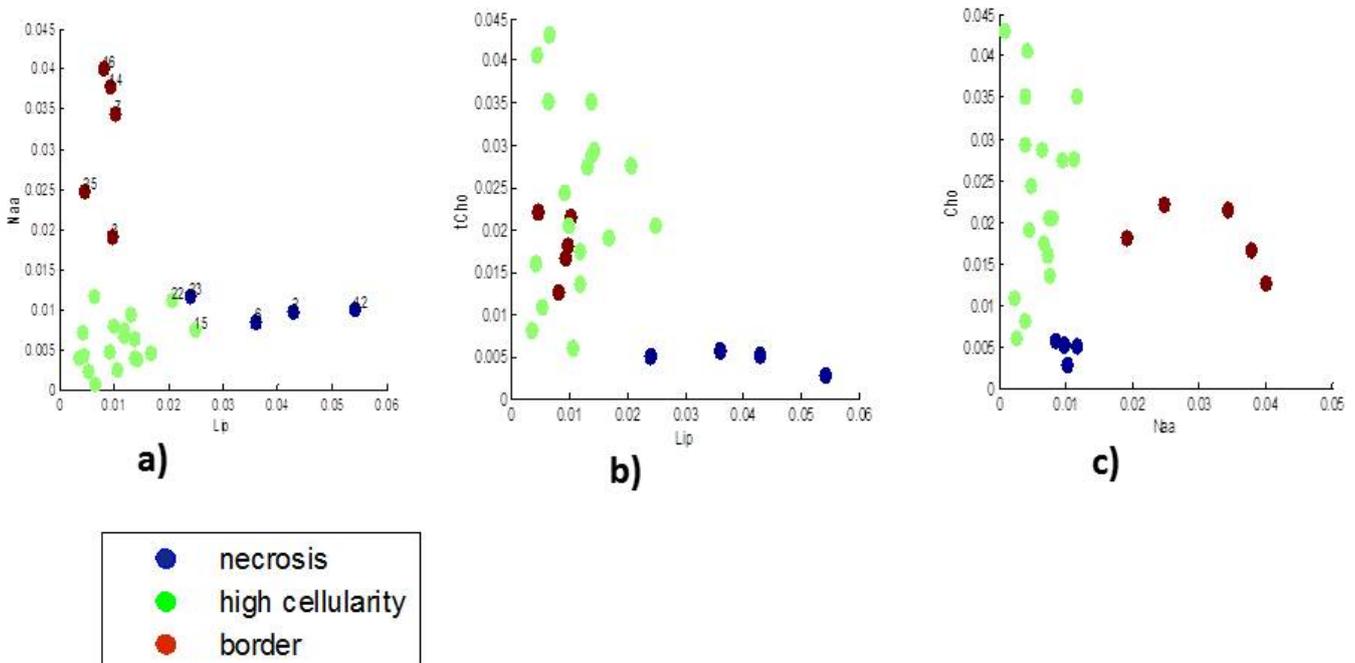
La señal singlete del NAA a 2,01 ppm se asocia como marcador de la función neuronal normal y se ha demostrado que su concentración es baja en regiones tumorales (12, 30). Se pueden esperar niveles altos de NAA en las regiones periféricas del tumor con respecto a las zonas de tumor activo. En esta parte de la tesis las alteraciones en la concentración de NAA parecen también suceder entre los diferentes tipos de tejido tumoral considerados. Demostramos que de hecho también puede actuar como biomarcador para tejido periférico, pero también para separar la necrosis respecto al resto de los grupos de tejidos considerados, tal que los niveles de Naa son casi despreciables en tejido necrótico en comparación con el tejido periférico, y son pequeñas en comparación con el grupo de tejido de alta celularidad.

La Creatina (Cr) se usa típicamente como referencia interna. En (28) se muestra que la relación NAA/Cr disminuye significativamente en comparación con el mismo cociente en tejido normal ( $p < 0.01$ ). En la referencia (31) los cocientes tCho/Cr disminuyen en gliomas de alto grado con la malignidad del tumor debido a la baja celularidad en los gliomas de alto grado, que contienen una gran cantidad de necrosis, mientras que la relación tCho/Cr puede ser útil para resolver los problemas de clasificación de algunos tumores (32). Sin embargo, en el apartado 6.1 correspondiente a la aplicabilidad de la espectroscopía RMN in vivo (ERM), se ha demostrado que mediante un análisis multiparamétrico se pueden distinguir entre los diferentes tipos de gliomas GII, GIII y GBM mediante el análisis combinado de Cho/Cr con ml/H<sub>2</sub>O y MMA/Cr y MMB/Cr, donde MMA (lípidos-macromoléculas a 0,9 ppm) y MMB (lípidos-macromoléculas a 1,2 ppm). Por consiguiente, también se han considerado los cocientes de los Lip, tCho y Naa con Cr. Los resultados en este apartado confirman los hallazgos previos. Como resultado más interesante se puede indicar que la diferenciación entre los tipos de tejido no es tan fiable cuando se utilizan los cocientes de metabolitos que cuando se usan las concentraciones de los mismos.

Por otro lado, se ha mostrado, para un único caso, que la cantidad de Lactato (Lac) (1) se correlacionan con los niveles de necrosis. No obstante, el proceso del manejo de las biopsias previo al estudio mediante HR-MAS, extracción quirúrgica, proceso de congelación, condiciones de temperatura, perfusión con la disolución salina deuterada, entre otros, pueden tener una influencia en la cantidad final de Lac.

### - Caracterización de las clases de tejidos

Los resultados sugieren que todos los metabolitos investigados podrían ser usados como biomarcadores fiables para la diferenciación de las clases de tejidos consideradas. De hecho, son complementarios entre sí y que sólo se puede obtener una clasificación fiable entre tejido tumoral necrótico, periférico y de alta celularidad cuando se considera en conjunto toda la información metabólica, es decir el perfil metabólico completo obtenido mediante HR-MAS. Las alteraciones en NAA, tCho y lípidos están interconectadas. Estas interconexiones dan lugar, por ejemplo, a las correlaciones entre la disminución en tCho y Lípidos y el aumento de NAA y el tejido tumoral periférico.. En la Figura 38 se han seleccionado los diferentes grupos de metabolitos necesarios para describir el espacio en el que analizar los datos para los GBM. Se puede verificar que el agrupamiento Lips-NAA posibilita una mejor separación entre tejido periférico y alta celularidad (ver parte a), que el grupo de metabolitos Lips-tCho permite una buena separación entre necrosis y alta celularidad (ver parte b), mientras que la mejor separación entre los tres clases de tejidos viene dada en el grupo tCho-NAA (ver parte c).



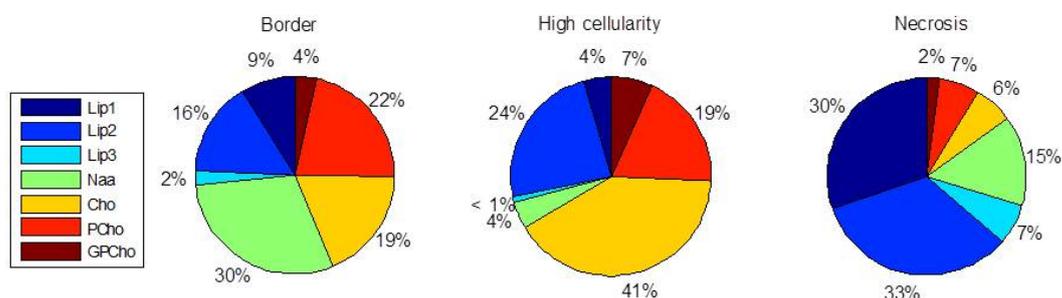
**Figura 38.** Los 7 casos de GBM representados en el espacio Lip-Naa (a), Cho-Lip (b) y Cho-Naa(c)

- **Necrosis**

Las características típicas de necrosis implican incrementos significativos de las concentraciones de Lips y de los cocientes Lips/Cr comparados con los respectivos niveles en tejidos de alta celularidad y periférico. Estos resultados están de acuerdo con las conclusiones formuladas en artículos previos (1,3). Además, se ha encontrado que para la necrosis que los valores de NAAa y NAA/Cr son prácticamente despreciables y que las concentraciones de tCho y tCho/Cr también son muy bajas. Tomando como referencia la suma de todos los metabolitos considerados, en el tejido necrótico se observa que los niveles de NAA < 20%, mientras que en Lips > 60% y los de Cho < 30%, ver Figura 39.

- **Periférico**

Una característica diferencial del tejido periférico es el alto nivel de NAA. Estos resultados confirman los datos bibliográficos previos. Los lípidos pueden jugar un papel importante en la separación del tejido periférico y necrótico, así como el grupo de tCho (ver Figura 39). Los niveles de Lips < 40%, de NAA > 20%, de Cho > 20%. Los cocientes Lips/Cr son bajos o muy bajos, el de Cho/Cr, PCho/Cr y GPCho/Cr son < 1,5 y NAA/Cr no es despreciable.



**Figura 39.** Distribución de metabolitos para las diferentes clases de tejidos.

Los porcentajes de los valores reflejan los cocientes entre las concentraciones de los metabolitos individuales y la suma de todas las concentraciones consideradas.

#### - **Alta Celularidad**

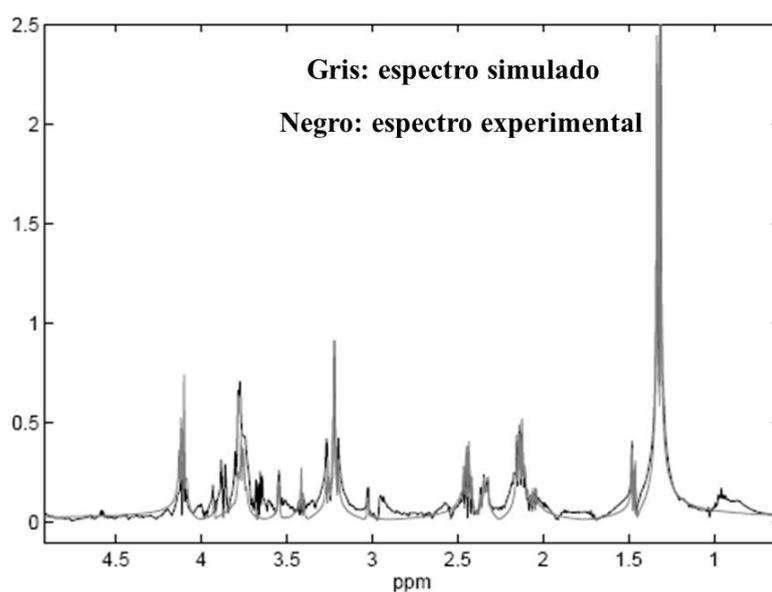
Las concentraciones de tCho son las más elevadas para el tejido de alta celularidad en comparación con el resto de grupos. Los niveles de NAA y su cociente respecto a Cr son muy reducidos. Los Lips y Lips/Cr son mucho más bajos que para el tejido necrótico pero no se diferencian mucho de los valores obtenidos para el tejido periférico. Como conclusión de los resultados obtenidos el nivel de Lip(s) < 50%, el nivel de NAA < 10%, el nivel de Cho(s) > 40% en tejido de alta celularidad y los cocientes de los ácidos grasos/Cr son bajos o muy bajos, los cocientes Cho/Cr, PCho/Cr y GPCho/Cr son mayores o próximos a 1,5 y la proporción Naa/Cr es despreciable.

Se han encontrado para todos los casos, independientemente del grado de agresividad, las mismas características metabólicas para los tipos de tejidos considerados. Los perfiles metabólicos para tejido necrótico, periférico y de alta celularidad para todos los grupos de tumores son próximos a los modelos de tejido considerado como referencia.

Hay que destacar el hecho que los tejidos de las muestras examinadas presentaban un contenido variable de tejido tumoral necrótico, periférico y de alta celularidad, como se dependía de los datos histopatológicos. Esta característica podía ser también observada en los datos de HR-MAS como en aquellos casos que se encontraban muy próximos al límite entre dos clases de tejidos.

#### **4.2.2.- Clasificación metabólica ex vivo (HR-MAS) de tumores del SNC**

En la Figura 40 se muestra, a modo de ejemplo, un ajuste mediante AQSES. El espectro pre-procesado (en negro) es el resultado del procedimiento de pre-procesado aplicado a la señal de la Figura 33(b). El ajuste es adecuado en la región de frecuencias entre 1 y 3 ppm (incluida la resonancia de la Cr), en cambio muestra algunas diferencias residuales entre 3 y 4 ppm. Las diferencias más acusadas alrededor de 3,6 ppm pueden ser probablemente debidas a la baja amplitud supuesta para la señal de mI, que podrán ser explicado por el hecho de que la contribución de mI a 4,05 ppm parece no existir en el espectro. Se puede realizar una misma observación para Asp a 2,8 ppm que con toda probabilidad ha sido eliminado durante el proceso de corrección de la línea base debido a su solapamiento con las señales de los ácidos grasos.



**Figura 40.** Comparación de la región de interés entre el espectro magnitud pre-procesado experimental (negro) y simulado (gris).

Los resultados de la clasificación se recogen en la Tabla 14. Relativo a los métodos usados de extracción de características diferenciales metabólicas, tanto AQSES como el espectro global, en general, proporcionan resultados mejores que el método de integración de picos y son comparables entre sí. Por otro lado, la metodología de clasificación LS-SVM parece, sin embargo, mejorar la calidad de la clasificación cuando se compara con el método estándar lineal LDA.

**Tabla 14.** Precisión en porcentaje en la clasificación entre pares de tumores del SNC para cada metodología usada

Processing	Classification	GBM vs GLI	GBM vs MET	GBM vs MEN	GLI vs MET	GLI vs MEN	MET vs MEN
Whole spectrum	LS-SVM	89.81	93.10	90.71	92.86	94.53	87.38
Peak integration	LDA	85.63	86.79	86.58	84.04	88.53	79.38
Peak integration	LS-SVM	88.37	91.66	91.48	90.86	88.67	85.75
AQSES	LDA	89.67	86.48	87.42	84.75	86.33	88.50
AQSES	LS-SVM	91.95	91.86	90.19	92.93	92.40	89.88

## Discusión

Aunque se ha estudiado con profusión la cuestión relativa al diagnóstico de tumores del SNC usando TE corto ( $< 40$  ms) o largo ( $> 136$  ms) (ver referencias 8-12), no se ha descrito un procedimiento completo (pre-procesado, procesado y clasificación) para los datos de HR-MAS. Los métodos propuestos en este apartado, de hecho usados en vivo ERM, han sido adaptados a HR-MAS. En general, la metodología general propuesta permite una extracción de características diferencial metabólicas que permiten una buena-excelente separación entre los diferentes pares de tumores del SNC, como se observa en la Tabla 14, en donde se observan porcentajes de precisión entre 85 y 95% aproximadamente.

Como se observa en la Tabla 14 se consiguen clasificaciones más precisas con el método LS-SVM que con LDA. Similares observaciones se obtuvieron para ERM in vivo a TE corto (9). Como se ha comentado, en general se obtiene una buena separación entre los tumores del SNC considerados, especialmente entre GBM y MET, sugiriendo que HR-MAS podría ser un interesante método complementario a ERM in vivo y RMI. En el apartado 6.2.2.3 comprobaremos la posibilidad de traslación de los datos ex vivo de HR-MAS a imagen de espectroscopía in vivo.

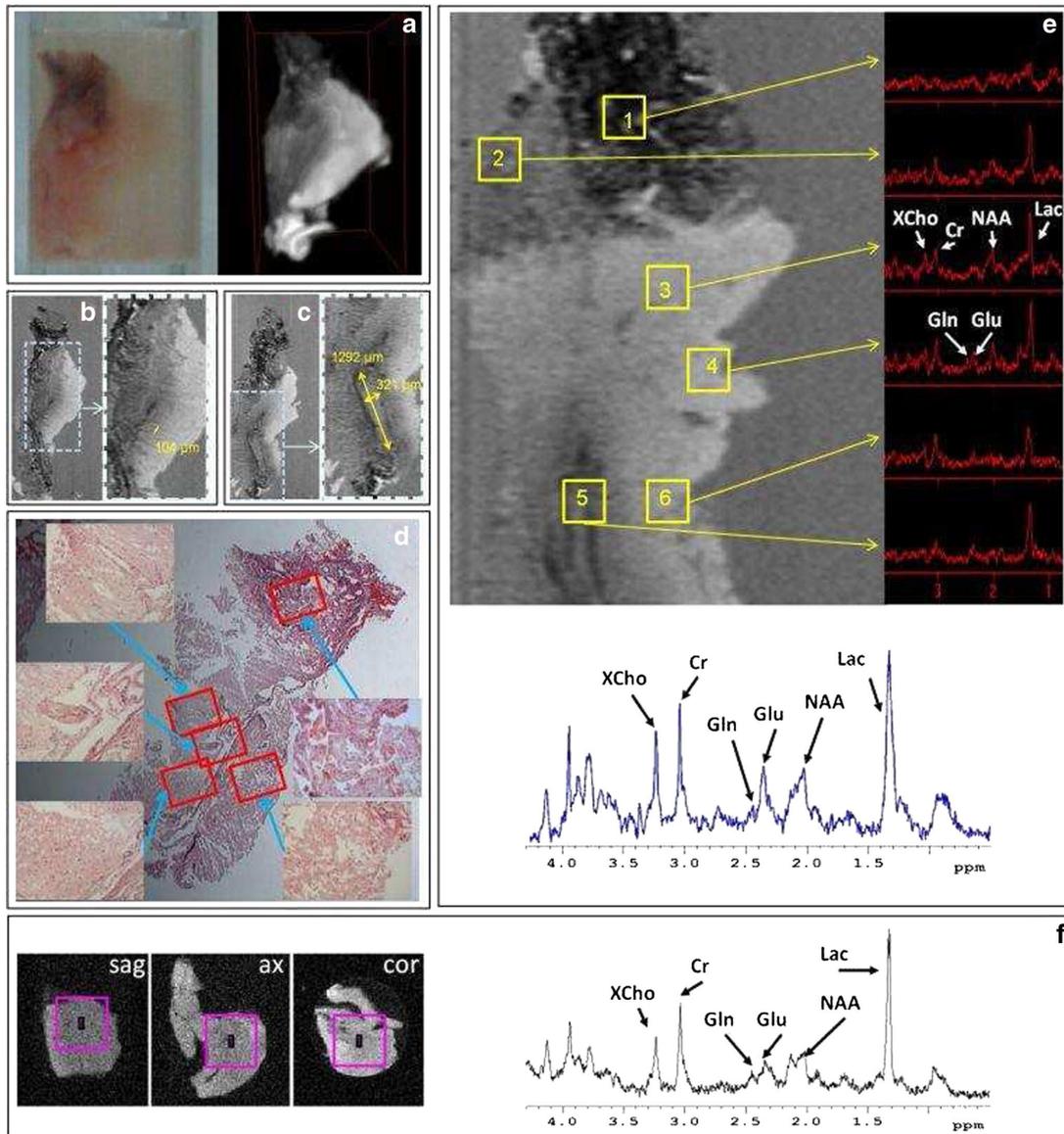
Además de la precisa separación entre GBM y MET (cercana al 90% en conjunto) también es destacable la muy buena diferenciación entre GBM y Gliomas de grado II y III, lo que permitiría delimitar mejor las diferentes regiones de agresividad dentro de los tumores gliales y en particular en GBM, como veremos posteriormente. También es destacable la diferenciación, con los valores máximos de precisión (casi 95%) entre Gliomas y Meningiomas. Aquí hay que destacar, aunque es una característica general de HR-MAS, que la única información que se maneja es el perfil metabólico desconociendo de forma completa la localización de la lesión, que en el caso de meningiomas es de gran ayuda para la RMI.

Como conclusión general, los perfiles metabólicos ex vivo obtenidos mediante HR-MAS pueden proporcionar una información adicional interesante al apoyo al diagnóstico en los tumores del SNC así como para mejorar la información proporcionada por la imagen de espectroscopía ERM. La traslación de la información detallada metabólica de HR-MAS podría ser de enorme ayuda para definir mejor la extensión y el tipo de tejido afecto dentro de las masas tumorales del SNC.

### **4.3. DESARROLLO DE LA MICROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA (MRM) COMO SOPORTE AL DIAGNÓSTICO DE GLIOMAS CEREBRALES**

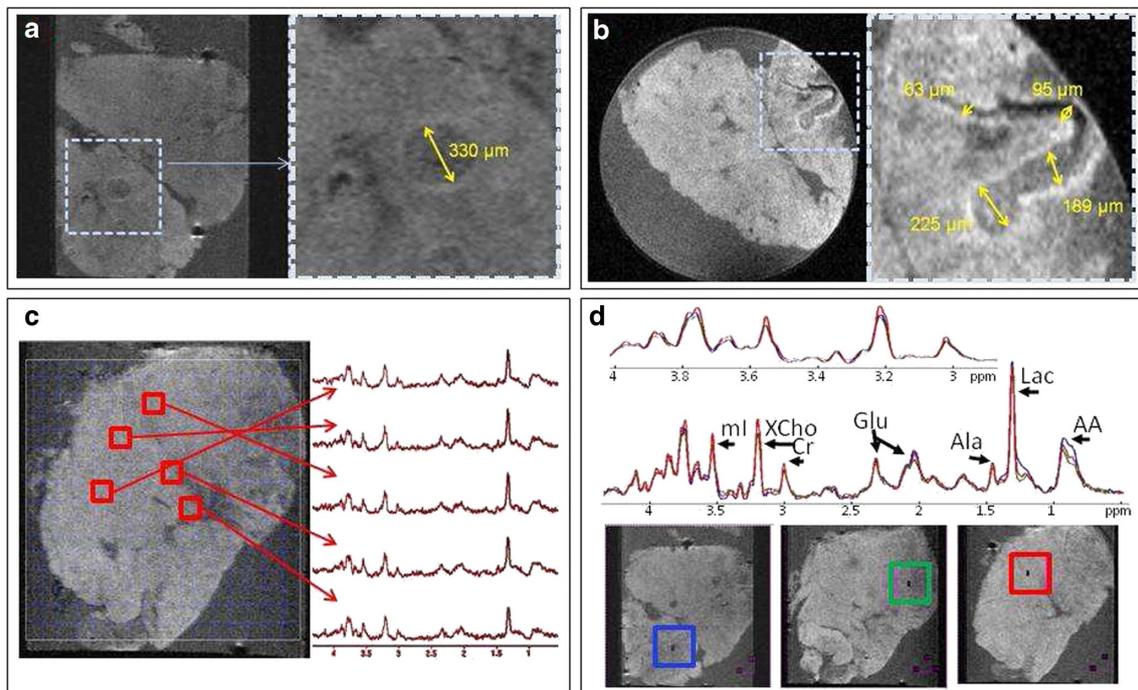
El estudio mediante MRM (microscopia de resonancia magnética) de biopsias de glioblastoma humano se realizaron sin apenas alteraciones en las muestras. Con este objetivo se sumergieron en PBS y mantuvieron a bajas temperaturas durante el experimento. Usando la secuencia de pulso RARE corta (500  $\mu\text{m}$ ) y larga (50  $\mu\text{m}$ ) se obtuvieron cortes finos de una resolución de 16x16  $\mu\text{m}$ . Las imágenes RARE con un grosor de 500  $\mu\text{m}$  permitieron una rápida localización de la muestra así como la detección de algunas zonas como vasos que pueden observarse a través del tejido con una resolución moderada. Las imágenes RARE con 50  $\mu\text{m}$  de grosor (Figura 41b,c) demuestran un alto grado de detalle en todas las muestras si las comparamos con las imágenes a 500  $\mu\text{m}$ . Esta mejora en la resolución fue suficiente para mostrar claramente la microheterogeneidad que posteriormente se apreció en las preparaciones histológicas (Fig. 41d). Además la mejora en la nitidez permite apreciar detalles microanatómicos en la estructura de estos tejidos como por ejemplo fibras (fig. 41b,c). Estos cambios tisulares en las muestras también se observaron en los cortes examinados con Hematosilina-Eosina tras el experimento en MRM. Las Resonancia de Espectroscopia (ERM) aportaron el perfil metabólico correspondiente a cada parte de la muestra tales como lactato, creatina, colina, glutamina, glutamato, N-acetilaspartato y alanina además de otros que fueron fácilmente detectables (Fig. 41e). En las muestras se pueden distinguir claramente tres tipos de tejidos. En la parte inferior izquierda, las áreas grises de la RMN aparecen como poco teñidas en la microscopia óptica (MO) y se correlacionan con áreas de necrosis (Fig. 41e recuadros 5 y 6). En el medio a la derecha se observa un área blanca y brillante en la RMN que en la MO aparece como teñida de forma intensa por H&E que se correlaciona como tejido viable (Fig. 41e, recuadros 3 y 4). Estas dos observaciones son concordantes con lo hallado y explicado en el apartado 4.2.1. relativo a la correlación entre el tipo de tejido y perfil metabólico ex vivo mediante HR-MAS en GBM. En la parte superior de la muestra en la RMN aparece como una zona negra que visto bajo MO aparece como contenido de hematíes correspondiente a área hemorrágica (Fig. 41e, recuadros 1 y 2). Las áreas hipointensas (negras) en secuencias ponderadas T2 de RMN son frecuentemente asociadas a la presencia de deoxyhemoglobina y hemosiderina. La media del Espectro de esta muestra se aprecia en la base de la Fig 1e y es el resultado de área de diferentes tejidos y

compuestos metabólicos. Este Espectro puede compararse con diferentes zonas de la misma muestra (Fig. 41f). El Espectro global es similar a la media del Espectro que se muestra en la Fig. 41e, por lo que con esta información aislada no podemos conocer si las diferencias (por ejemplo en las diferentes proporciones de Glutamina y glutamato) se deben a diferentes perfiles metabólicos en el tejido o a diferentes porcentajes en el mismo perfil.



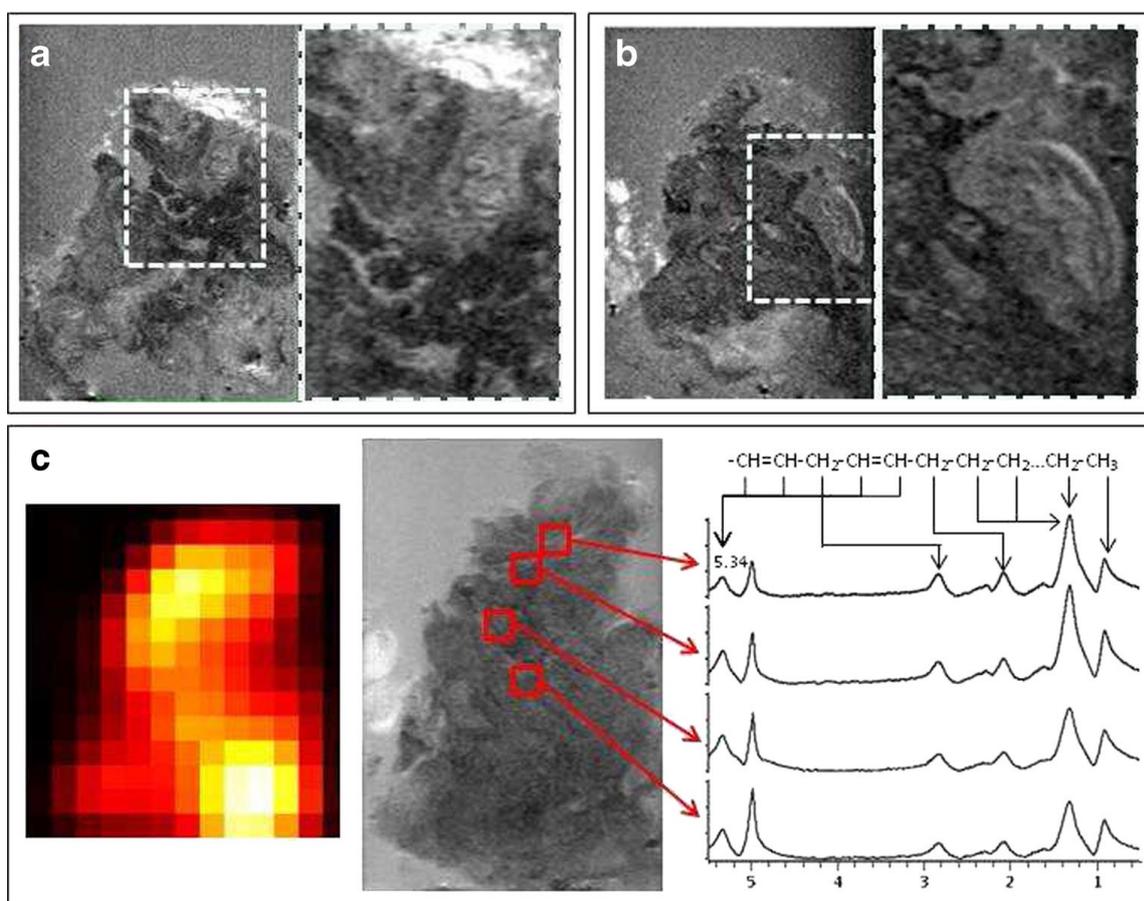
**Fig. 41.** Resultados de microscopía y espectroscopia de una muestra heterogénea de glioblastoma (muestra 1). **a)** Imagen óptica de la muestra en el tubo de la RMN (izquierda) y reconstrucción 3D (derecha). **b) c)** Imágenes RARE (cortes de 50 micras) que muestra los detalles de la heterogeneidad de la muestra **d)** Corte teñido de H&E con magnificaciones en la zona de necrosis, alta celularidad y detalles capilares **e)** A la derecha Espectros en diferentes localizaciones de volumen de la muestra, indicando las señales de los principales metabolitos. Los diferentes espectros muestran perfiles metabólicos propios de cada región. En la base se recoge el espectro medio del total de la muestra. **f)** Imagen y espectro de otra pieza de la misma biopsia (muestra 2). El espectro corresponde al volumen señalado en sagital (sag), axial (ax) y coronal (cor).

En algunas muestras, a pesar de que haya hiperplasia y vasos sinuosos (Fig. 42a,b), los tejidos fueron homogéneos y el espectro en diferentes áreas es similar (Fig. 42c). Sin embargo, se constatan pequeñas diferencias (Fig. 42d). Las señales de lactato, alanina, glutamato, creatina, colina y aminoácidos se pueden identificar en 3 localizaciones elegibles apreciando ligeras diferencias de intensidades de señal. En este caso, el espectro medio de la muestra fue representativo porque la muestra entera estaba constituida en su mayoría por tejido homogéneo.



**Fig. 42.** Imágenes y espectros de de una muestra homogénea de glioblastoma en ERMi (muestra 3). Pese a la homogeneidad de la muestra se aprecian algunos vasos con diferentes tamaños y tortuosidad (a,b) el espectro muestra a una resaltable similaridad (c). Al aumentar el volumen localizado en las muestras solo existen pequeñas diferencias en el perfil metabólico del espectro (d). a-d Imágenes RARE a 50 micras de grosor con áreas ampliadas (a,b) apreciando vaso de 330 micras de diámetro (a) y su tortuosidad (b). D Tres localizaciones voxel único y superpuesto su espectro (zoom con rango de 3-4 ppm en la parte superior izquierda)

Es destacable que incluso en una muestra muy necrótica se puede observar diferentes áreas de contraste y textura (Fig 43a,b). La muestra de este tumor se compone principalmente de lípidos, como se muestra en los espectros en la Fig. 43c. Los picos en el espectro de  $^1\text{H}$  de los carbonos de ácidos grasos saturados e insaturados se recogen en un experimento multivoxel (Fig. 43c) construyendo un mapa de densidad de distribución de intensidad de la resonancia de  $^1\text{H}$  a 5.34 ppm del grupo  $-\text{CH}=\text{CH}-$  (Fig. 43c, izquierda). Se pueden apreciar diferencias en la proporción de señal en cada una de las localizaciones seleccionadas en relación a la composición de lípidos. Esta heterogeneidad en la estructura y composición de los lípidos en áreas necróticas puede ser debido a que inicialmente pueden provenir de diferentes tipos de tejidos.



**Fig. 43.** Imágenes de ERMi y ERM de una muestra necrótica de Glioblastoma (muestra 4). **a),b)** Imágenes RARE a 50 micras de grosor de corte. **c)** Distribución de los lípidos de acuerdo al registro de pico a 5.34 ppm (izquierda). Algunas localizaciones del espectro se muestran a la derecha con la indicación de los diversos tipos de hidrogeno de la cadena lipídica alfa. Esta pieza de tejido es muy heterogénea como se puede apreciar en **a)** y **b)**. El resultado metabólico del espectro de los lípidos indica un alto nivel de necrosis, sin embargo los perfiles distan de ser homogéneos en toda la muestra.

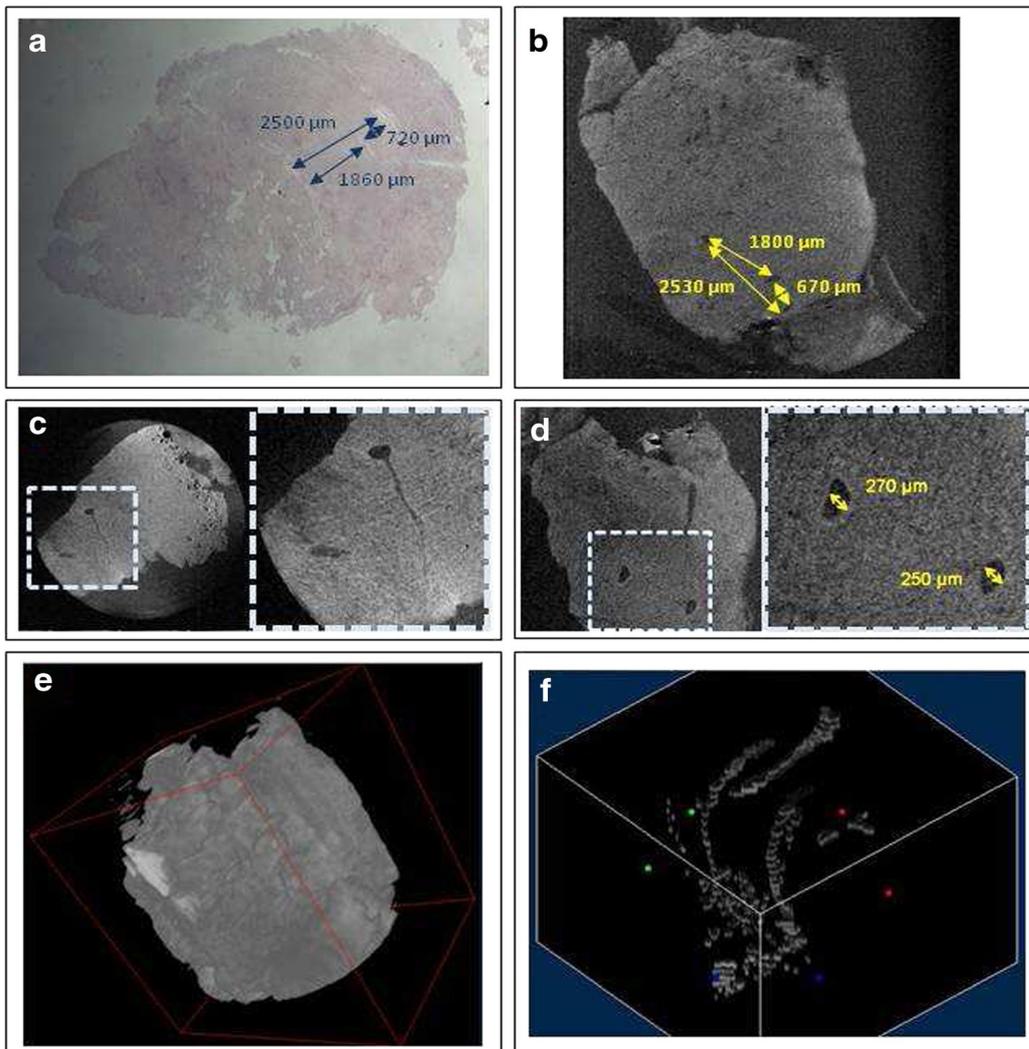
La metodología HR-MAS como ya hemos descrito y utilizado en el apartado 4.2, es otra técnica de RMN ampliamente usada para obtener espectros de alta resolución en muestras de tejidos (180-185). Descontando la velocidad y resolución que aporta esta técnica, la interpretación bioquímica del espectro de la HR-MAS está limitada al hecho de que el espectro es la media de toda la muestra introducida en el rotor. Con el uso de la ERMi se puede conocer la distribución espacial de los metabolitos y su porcentaje en cada localización. Además en la MRM el tamaño de la muestra puede ser mayor que en los estudios de HR-MAS y sin la distorsión que provoca la velocidad del rotor. Estas ventajas de la ERMi sobre la HR-MAS se convierten en mayores en casos de tejidos muy heterogéneos como los Glioblastomas.

La aplicación de la ERMi y ERM al estudio de metabolismo tumoral in vivo en animales ha permitido un gran detalle metabólico (198-204). Estudios realizados sobre el metabolismo en general en glioblastomas han permitido identificar dos fenotipos de GBM así como la intensa glicolisis en sus células tumorales (204-208). En otros experimentos se ha demostrado el valor de estas técnicas para evidenciar la distribución de determinados metabolitos o grupo de metabolitos como lactato, colina, creatina y N-acetilaspártato (NAA) (209-211). El NAA se encuentra en los tejidos normales externos al tumor, la colina fue más elevada cerca del área de infiltración tumoral, bajos niveles de creatina en la zona central tumoral y el lactato casi exclusivamente en los tumores (como se ha demostrado ampliamente el apartado 4.2.1). Los lípidos insaturados se relacionan con las zonas de apoptosis inducida por los tratamientos, y los lípidos saturados en las áreas de necrosis (212). En este contexto la ERM se verificó como prueba para detectar el pH en el microambiente usando moléculas sonda (209-211) mostrando pH ácido en áreas tumorales no viables y pH normal en áreas viables. La ERM también se ha utilizado para conocer el máximo metabolismo de glucosa que pueden utilizar los ratones tumorales con GBM con ERM in vivo con respecto a ratones sin tumor provocando en ambos hiperglucemias hasta que la glucosa se acumule en el espacio extracelular (201). También se ha demostrado alteración en el pH extracelular en gliomas tras infusión de glucosa, Estos experimentos se han realizado con tiempos eco cortos con el fin de conseguir la máxima información metabólica. Desde que se reducen los efectos del T2 más moléculas son detectables. Los estudios

multivoxel con rangos de 0.75 a 5  $\mu$ L permiten el estudio tridimensional de las muestras .

Cuando los efectos T2 se minimizan, se pueden detectar más moléculas y se mejora la identificación de sistemas de espin acoplados (190,191) . En algunos de esos estudios, se han realizados experimentos de volumen único ( volúmenes de 27-125 ml) para así obtener el perfil metabólico del tumor y de la región contralateral ( 201,202,205), mientras que en otros estudios las secuencias multivoxel han proporcionado una distribución espacial detallada de los metabolitos (203,204,207) con volúmenes entre 0,75 y 5 ml por voxel.

En esta parte de la tesis hemos realizado el análisis de la vascularización de biopsias de GBM humano obteniendo un modelo 3D de la distribución de los vasos en la muestra (Fig. 44). Además este estudio permite las secciones virtuales en cualquier orientación deseada con el fin de medir el diámetro de los vasos y sus aferencias (Fig 44c,d). La resolución espacial en este estudio está fuera del alcance de la aplicación clínica de la MRM. La resolución espacial conseguida en esta parte de la Tesis es muy superior a la que se puede obtener en equipos clínicos de RMI. Las imágenes de 500 micras de espesor también han mostrado diferencias en contraste dentro de las muestras y algunos detalles que, aunque puedan ser mejor interpretadas usando secciones a mayor resolución, ellas mismas pueden proporcionar un paso intermedio entre la MRM de alta resolución y la MO (microscopia óptica) y los estudios in vivo de RMI. Respecto a la ERM, los pequeños volúmenes medidos en experimentos de multivoxel (0,031 microlitros) y volumen único (1 microlitro) han proporcionado información espacialmente localizada de los metabolitos y lípidos presentes en los GBM. Las biopsias de GBM estudiadas mostraron importantes diferencias a nivel histológico, tanto en contenido metabólico, contraste de imagen y vascularización. La resolución alcanzada en los pixels de las imágenes de MRM han permitido observar pequeños vasos sanguíneos, regiones con diversas texturas de tejido, y áreas con diferente contraste natural en concordancia con el posterior estudio histológico.



**Fig. 44.** Análisis microanatómico de biopsias con ERMi (muestra 5). **a)** Imagen óptica de una sección histológica teñida con H&E. **b)** Comparación con la imagen de ERMi. Las distancias y diámetros de diferentes vasos se han medido tanto en MO como ERMi siendo similares los resultados. **c)** y **d)** Imágenes de diferentes secciones de ERMi) con detalles de tamaño y aferencias de vasos. **e)** Imagen de reconstrucción completa de una muestra desde cortes de ERMi. **f)** Modelo 3D de la distribución de los vasos dentro de la muestra ( las zonas coloreadas muestran los puntos de referencia)



## **5. CONCLUSIONES**

1.- Se ha comprobado la aplicabilidad del protocolo de ERM diseñado (ERMI combinado con Volumen Único a TE corto y largo) para la obtención del perfil metabólico de la zona de máxima celularidad en los tumores del SNC. Lo que ha permitido una diferenciación adecuada entre diferentes tipos de lesiones del SNC y de los grados II, III y IV en tumores gliales.

2.- A partir de la mejor localización del volumen único en la región de máxima celularidad, se han encontrado los cocientes de metabolitos cuyo análisis combinado permiten la separación entre grado II, II y IV en tumores gliales, concretamente: MMA/Cr; MMB/Cr, ml/H<sub>2</sub>O, Co/Cr, Cr/H<sub>2</sub>O y MMA/H<sub>2</sub>O.

3.- Los valores promedio de los cocientes Cr/H<sub>2</sub>O y ml/H<sub>2</sub>O disminuyen progresivamente desde grado II a IV, mientras que el MMA/H<sub>2</sub>O aumenta desde grado II a IV.

4.- La participación activa dentro del proyecto europeo eTUMOUR ha permitido colaborar en el desarrollo y evaluación de un programa informático de apoyo al diagnóstico clínico (CADS) de tumores del SNC.

5.- El programa CADS permite: i) la transformación automática de los espectros de volumen único; ii) control de la calidad de los espectros in vivo de volumen único; iii) análisis comparativo cualitativo entre espectros de diversos tipos de lesiones del SNC; iv) clasificación automática de tumores del SNC, en particular el nivel de agresividad.

6.- En la evaluación clínica de CADS se han utilizado 79 casos con diferentes tipos de lesiones del SNC. Los resultados más significativos permiten destacar, que de manera automática y objetiva usando exclusivamente perfiles metabólicos las curvas ROC: i) para tumores gliales de bajo grado es superior para el análisis mediante CADS (sensibilidad = 0,96) que para RMI (sensibilidad = 0,76); ii) para tumores gliales de alto grado son similares para CADS (sensibilidad = 0,79) que para RMI (sensibilidad = 0,78).

7.- La inclusión de la ERMI en el protocolo de ERM propuesto, además de una mejor localización de la región mas activa del tumor, permite disponer de la comparación del perfil metabólico entre: i) parénquima no afecto y lesión, lo que puede servir de control interno para cada paciente; ii) diferentes regiones dentro de la lesión y diferenciar entre necrosis, edema, y grados; iii) zonas peritumorales con infiltración.

8.- Se ha desarrollado un sistema de imagen nosológica, a partir de los perfiles metabólicos de diferentes regiones tumorales y no afectas mediante ERMI, que permite, de forma automática, la localización de vóxeles con tejido infiltrado, mediante la comparación de los valores de Co/Cr vs Co/NAA, en la zona peritumoral. Entre sus posibles usos clínico se ha demostrado su potencial utilización para la diferenciación entre GBM.

9.- Se ha encontrado una muy buena correlación entre los perfiles metabólicos ex vivo obtenido mediante HRMAS y los tipos de tejido, con una nítida separación entre necrosis, elevada celularidad y tejido periférico tumoral.

10.- Las variaciones en la concentración de los metabolitos, en particular Colina, N-acetilaspártato y lípidos/macromoléculas, permiten extraer modelos de metabolitos representativos para cada clase de tejido.

11.- Por consiguiente, la técnica de HR-MAS ex vivo puede proporcionar información metabólica relevante en la investigación del tejido canceroso. Asimismo, el adecuado acuerdo entre las características metabólicas ex vivo, obtenidas a partir de la clasificación y los resultados histopatológicos, puede proporcionar información adicional interesante para una mejor interpretación de los espectros in vivo, así como para incrementar su importancia en los métodos no invasivos en la clasificación de tumores cerebrales.

12.- Los diferentes perfiles metabólicos ex vivo obtenidos mediante HR-MAS han permitido una muy buena diferenciación, usando diferentes métodos de análisis de espectros y estadísticos, entre distintos tipos de lesiones del SNC, en particular, cabe destacar, con valores superiores al 90%, a la aplicación combinada del programa de análisis de espectros AQSES y el análisis estadístico LS-SVM.

13.- La diferenciación entre tumores gliales y meningiomas es superior al 95% usando única y exclusivamente los perfiles metabólicos ex vivo mediante HR-MAS sin ninguna información clínica adicional, como entre otras la localización de la lesión.

14.- Se ha demostrado la posibilidad y capacidad para realizar estudios anatómicos y metabólicos mediante Microscopía de Resonancia Magnética (MRM) en biopsias no tratadas de tejido tumoral del SNC sumergidas en PBS y sin fijación alguna.

15.- Mediante las imágenes de alta resolución en las biopsias estudiadas se han podido obtener información metabólica localizada, (volumen espectro de 0,031  $\mu$ L), con elevada resolución espacial (18x18x50  $\mu$ m), a nivel microscópico.

16.- Los datos multimodales obtenidos mediante las tres técnicas Microscopía de RM, Espectroscopía de RM y Microscopía Óptica (MRM, ERM y MO) ofrecen información complementaria y concurrente sobre las características de los tejidos para el estudio de tumores humanos del SNC.

17.- La realización del estudio de MRM en tejido humano permite una comparación más directa con los estudios habituales en modelos animales, también estudiados in vivo y ex vivo a alta campo magnético. Además puede ayudar a la transferencia de conocimientos desde MRM y ERM a alta resolución a RMI y ERM en la práctica clínica.



## BIBLIOGRAFIA

1. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival, *J Neurosurg*, 2001;95:190–98.
2. Stewart LA, Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials, *Lancet*, 2002;359:1011–18
3. O'Reilly SM, Newlands ES, Glaser MG, et al., Temozolomide: a new oral cytotoxic chemotherapeutic agent with promising activity against primary brain tumours, *Eur J Cancer*, 1993;29A:940–42
4. Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, et al. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide, *J Clin Oncol*, 2002;20:1375–82.
5. Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U ; ALA-Glioma Study Group. Neurosurgery. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. 2008 Mar;62(3):564-76; discussion 564-76
6. Pinto LW, Araújo MB, Vettore AL, Wernersbach L, Leite AC, Chimelli LM, Soares FA .Glioblastomas: correlation between oligodendroglial components, genetic abnormalities, and prognosis. *Virchows Arch*. 2008 May;452(5):481-90.
7. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N Engl J Med*, 2005;352:987–96.
8. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, et al., A phase III trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma, *Neuro Oncol*, 2003;5:79–88.
9. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE II, et al., Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma, *Clin Cancer Res*, 2007;13:1253–9.
10. Maxwell JA, Johnson SP, Quinn JA, et al., Quantitative analysis of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in malignant glioma, *Mol Cancer Ther*, 2006;5:2531–9.

11. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:205-16.
12. Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg.* 1978;49:333-43.
13. Brada M, Thomas DG, Bleehan NM, Roberts JT, Senanayake F, Abram P, et al. Medical Research Council (MRC) randomized trial of adjuvant chemotherapy on high grade glioma (HGG)-BR05. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 1998;17: A1543.
14. Levin VA, Silver P, Hannigan J, Wara WM, Gutin PH, Davis RL, et al. Superiority of postradiotherapy adjuvant chemotherapy with CCNU, procarbazine, and vincristine (PCV) over BCNU for anaplastic gliomas: NCOG 6G61 final report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1990;18:321-4.
15. Tatter SB, Wilson CB, Harsh IV GR. Neuroepithelial tumors of the adult brain. En: Youmans JR, ed. *Neurological Surgery. A comprehensive reference guide to the diagnosis and management of neurosurgical problems.* Philadelphia: WB Saunder; 1996; 4: 2612-84.
16. Young HF. Brain tumors. En: Grossman RG, ed. *Principles of Neurosurgery.* New York: Raven Press, ltd. , 1991: 113-63.
17. Black PM. Brain tumors. (first of two parts). *The New England Journal of Medicine* 1991; 324(21): 1471-6.
18. Kelly PJ. Computed tomography and histologic limits in glial neoplasm: Tumors type and selection for volumetric resection. *Surg Neurol*, 1993; 39(6): 458-65.
19. Parisi JE. The astrocytomas. 34th Annual Neuropathology Review. Maryland, 1996:1-17.
20. Tchang S, Scotti G, Terbrugge K, Melancon D, Bélanger G, Milner C, et al. Computerized tomography as a possible aid to histological grading of supratentorial glioma. *J Neurosurg* 1977; 46:735-9.
21. Murovic J, Turowski K, Wilson CHB, Hoshino T, Levin V. Computerized tomography in the prognosis of malignant cerebral gliomas. *J Neurosurg* 1986; 65:799-806.
22. Todd NU, Graham DJ. Complications of primary malignant brain tumors. En: Thomas DGT, Graham DJ, eds. *Malignant brain tumors.* London: Springer-Verlag, 1995: 115-50.

23. Sawle GU. Imaging the head: Functional imaging. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1995; 58: 132-144.
24. Krings T, Buchbinder BR, Butler WE, Chiappa KH, Jiang HJ, Cosgrove GR, et al. Functional magnetic resonance imaging and transcranial magnetic stimulation: Complementary approaches in the evaluation of cortical motor function. *Neurology* 1997; 48: 1406-1416.
25. Prat-Acín R, Díaz-Vicente FJ, Banzo-Marraco J, Villagrasa-Compared J, Prats-Rivera E, Delgado Castro M, et al. Predicción histológica de los tumores cerebrales mediante SPECT con talio 201. *Rev. Neurol* 1997; 25 (144): 1168-1170.
26. Demuth, T., Berens, M.E.: (2004) Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol.* 2004; 70: 217-228.
27. González-Gómez, P., Bello, M.J., Arjona, D., Lomas, J., Alonso, M.E., De Campos, J.M., Vaquero, J., Isla, A., Gutiérrez, M., Rey, J.A.: Promoter hypermethylation of multiple genes in astrocytic gliomas. *Int J Oncol.* 2003; 22: 601-608.
28. Mollenhauer, J., Wiemann, S., Scheurlen, W., Korn, B., Hayashi, Y., Wilgenbus, K., von Deimling, A., Poustka, A.: DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet.* 1997; 17: 32-39.
29. Fan, X., Muñoz, J., Sanko, S.G., Castresana, J.S.: PTEN, DMBT1, and p16 alterations in diffusely infiltrating astrocytomas. *Int J Oncol.* 2002; 21: 667-674.
30. Bello, M.J., Rey, J.A.: The p53/Mdm2/p14ARF cell cycle control pathway genes may be inactivated by genetic and epigenetic mechanisms in gliomas. *Cancer Genet Cyto-genet.* 2006; 164: 172-173.
31. Koichi Ichimura., Bondesson Bolin, M., Goike, H.M., Schmidt, E.E., Moshref, A., Collins, V.P.: Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 Pathway is a Prerequisite for Human Astrocytic Gliomas with G1-S Transition Control Gene Abnormalities. *Cancer research.* 2000; 60: 417-424.
32. Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004; 64: 6892-6899.
33. Nakamura, M., Watanabe, T., Klangby, U., Asker, C., Wiman, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H.: p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol.* 2001; 11: 159-168.
34. González-Gómez, P., Bello, M.J., Alonso, M.E., Arjona, D., Lomas, J., de Campos, J.M., Isla, A., Rey, J.A.: CpG island methylation status and mutation analysis of the RB1 gene essential promoter region and protein-binding pocket domain in nervous system tumours. *Br J Cancer.* 2003; 88: 109-114.

35. Nakamura, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H.: Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest.* 2001; 81: 77-82.
36. Arjona, D., Bello, M.J., Rey, J.A.: EGFR intragenic loss and gene amplification in astrocytic gliomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006; 164: 39-43.
37. Joensuu, H., Pupa, M., Sihto, H., Tynninen, O., Nupponen, N.N.: Amplification of genes encoding KIT, PDGFRalpha and VEGFR2 receptor tyrosine kinases is frequent in glioblastoma multiforme. *J Pathol.* 2005; 207: 224-231.
38. Ekstrand, A.J., Sugawa, N., James, C.D., Collins, V.P.: Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 4309-4313.
39. Wong, A.J., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Kinzler, K.W., Hamilton, S.R., Vogelstein, B.: Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84: 6899-6903.
40. Kaur, B., Tan, C., Brat, D.J., Post, D.E., Van Meir, E.G.: Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol.* 2004; 70: 229-243.
41. Lamszus, K., Heese, O., Westphal, M.: Angiogenesis-related growth factors in brain tumors. *Cancer Treat Res.* 2004; 117: 169-190.
42. Visted, T., Enger, P.O., Lund-Johansen, M., Bjerkvig, R.: Mechanisms of tumor cell invasion and angiogenesis in the central nervous system. *Front Biosci.* 2003; 8: 289-304.
43. Chan, A.S., Leung, S.Y., Wong, M.P., Yuen, S.T., Cheung, N., Fan, Y.W., Chung, L.P.: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the anaplastic progression of astrocytoma, oligodendroglioma, and ependymoma. *Am J Surg Pathol.* 1998; 22: 816-826.
44. DeAngelis, L. M. (2001). "Brain tumors." *N Engl J Med* 344(2): 114-23.
45. Brada, M., S. Ashley, et al. (2005). "Neoadjuvant phase II multicentre study of new agents in patients with malignant glioma after minimal surgery. Report of a cohort of 187 patients treated with temozolomide." *Ann Oncol* 16(6): 942-9.
46. Keime-Guibert, F., O. Chinot, et al. (2007). "Radiotherapy for glioblastoma in the elderly." *N Engl J Med* 356(15): 1527-35.
47. Balana, C., J. Capellades, et al. (2007). "Clinical course of high-grade glioma patients with a "biopsy-only" surgical approach: a need for individualised treatment." *Clin Transl Oncol* 9(12): 797-803.

48. Kleinberg, L. R., J. Weingart, et al. (2004). "Clinical course and pathologic findings after Gliadel and radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma: implications for patient management." *Cancer Invest* 22(1): 1-9.
49. Valtonen, S., U. Timonen, et al. (1997). "Interstitial chemotherapy with carmustine-loaded polymers for high-grade gliomas: a randomized double-blind study." *Neurosurgery* 41(1): 44-8; discussion 48-9.
50. Marina OI, Suh JH, Reddy CA, Barnett GH. Treatment outcomes for patients with glioblastoma multiforme and a low Karnofsky Performance Scale score on presentation to a tertiary care institution. Clinical article. *J Neurosurg.* 2011 Aug;115(2):220-9. doi: 10.3171/2011.3.JNS10495. Epub 2011 May 6.
51. Lakshmi Nayak, Katherine S. Panageas, Anne S. Reiner. Radiotherapy and temozolomide for anaplastic astrocytic gliomas. *J Neurooncol.* 2015 May; 123(1): 129–134.
- Lakshmi Nayak, Katherine S. Panageas, Anne S. Reiner, Jason T. Huse, Elena Pentsova, Stephanie G. Braunthal, Lauren E. Abrey, Lisa M. DeAngelis, and Andrew B. Lassman
52. Ross B, Michaelis T. Clinical applications of magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Q* 1994;10:191-247.
- 53 McBride DQ, Miller BL, Nikas DL, et al. Analysis of brain tumors using 1H magnetic resonance spectroscopy. *Surg Neurol* 1995; 44:137-44.
- 54 Ursenius JP, Kauppinen RA, Vainio PA, et al. Quantitative metabolite patterns of human brain tumors: detection by 1H NMR spectroscopy in vivo and in vitro. *JCAT* 1994;18:705-13.
55. Ross B, Michaelis T. Clinical applications of magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Q* 1994;10:191-247.
56. Preul MC, Caramanos Z, Leblanc R, Villemure JG, Arnold DL. Using pattern recognition of in vivo proton MRSI data to improve the diagnosis and surgical management of patients with brain tumors. *NMR Biomed* 1998;11:192-200.
57. McBride DQ, Miller BL, Nikas DL, et al. Analysis of brain tumors using 1H magnetic resonance spectroscopy. *Surg Neurol* 1995; 44: 137-144.
58. Krouwer HGJ, Kin TA, Rand SD, et al. Single-voxel proton MR spectroscopy of nonneoplastic brain lesions suggestive of a neoplasm. *AJNR Am J Neuroradiol* 1998; 19: 1695-1703.
59. Final Report Summary - ETUMOUR (Web-accessible magnetic resonance support system for brain tumour diagnosis and prognosis, incorporating in vivo and ex vivo genomic and metabolomic data) [http://cordis.europa.eu/result/rcn/50778\\_en.html](http://cordis.europa.eu/result/rcn/50778_en.html)

- 60 Manton DJ, Lowry M, Blackband SJ, Horsman A. Determination of proton metabolite concentrations and relaxation parameters in normal human brain and intracranial tumors. *NMR in Biomed* 1995; 8: 104-112.
61. Hanstock CC; Rothman DL, Howseman A, et al. In vivo determination of NAA concentration in the human brain using the proton aspartyl resonance (abstr). In: Book of abstracts: Society of Magnetic Resonance in Medicine 1989. Berkley, Calif: Society of Magnetic Resonance in Medicine, 1989; 442.
- 62 Sijens PE, Levendag PC, Vecht CJ, van Dijk P, Oudkerk M. <sup>1</sup>H MR spectroscopy detection of lipids and lactate in metastatic brain tumors. *NMR in Biomed* 1996; 9: 65-7
63. Negendank WG, Sauter R, Brown TR, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy in patients with glial tumors: a multicenter study. *J Neurosurg* 1996; 84: 449-458.
64. Majós C, Alonso J, Aguilera C, et al. Utility of proton MR spectroscopy in the diagnosis of radiologically atypical intracranial meningiomas. *Neuroradiology* 2003;45:129-36.
65. Tzika AA, Cheng LL, Goumnerova L, et al. Biochemical characterization of pediatric brain tumors by using in vivo and ex vivo magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosurg* 2002;96:1023-31.
- 66 Negendank WG, Sauter R, Brown TR, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy in patients with glial tumors: a multicenter study. *J Neurosurg* 1996;84:449-58.
- 67 McBride DQ, Miller BL, Nikas DL, et al. Analysis of brain tumors using <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy. *Surg Neurol* 1995; 44: 137-144.
68. Castillo M, Kwok L. Proton MR spectroscopy of common brain tumors. *Neuroimaging Clin North Am* 1998; 8: 733-752.
69. Castillo M, Kwok L, Mukherji SK. Clinical applications of proton MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol* 1996; 17: 1-15.
70. Meyerand ME, Pipas JM, Mamourian A, Tosteson TD, Dunn JF. Classification of biopsy-confirmed brain tumors using single-voxel MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999; 20: 117-123.
- 71 Fountas KN, Kapsalaki EZ, Gotsis SD, et al. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of brain tumors. *Stereotact Funct Neurosurg* 2000; 74: 83-94.
- 72.- L. L. Cheng, D. C. Anthony, A. R. Comite, P. M. Black, A. A. Tzika, and R. G. Gonzalez, "Quantification of microheterogeneity in glioblastoma multiforme with ex vivo high-resolution magic-angle spinning (HRMAS) proton magnetic resonance spectroscopy," *Neuro215 oncol*, vol. 2, no. 2, pp. 87-95, 2000.

- 73.- V. Tugnoli, L. Schenetti, A. Mucci, F. Parenti, R. Cagnoli, V. Righi, A. Trincherò, L. Nocetti, C. Toraci, L. Mavilla, G. Trentini, E. Zunarelli, and M. R. Tosi, "Ex vivo HR-MAS MRS of human meningiomas: a comparison with in vivo <sup>1</sup>H MR spectra," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 18, no. 5, pp. 859–69, 2006.
- 74.- M.C. Martínez-Bisbal, B. Celda-Muñoz, L. Martí-Bonmatí, P. Ferrer-Ripollés, A.J. Revert-Ventura, J. Piquer Belloch, E. Molla-Olmos, E. Arana-Fernández de Moya, R. Dosda-Muñoz. Contribución de la espectroscopia de RMN a la clasificación de gliomas de alto grado. Valor predictivo de la macromoléculas. *Rev Neurol*. 2002;34 (4):309-313.
- 75.- M.C. Martínez-Bisbal, L. Martí-Bonmatí, J. Piquer, A. Revert, P. Ferrer, J.L. Llácer, M. Piotto, O. Assemat and B. Celda. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo <sup>1</sup>H MRS study of human high grade gliomas. *NMR in Biomedicine*, 2004;17:191-205.
76. Sijens PE, Levendag PC, Vecht CJ, van Dijk P, Oudkerk M. <sup>1</sup>H MR spectroscopy detection of lipids and lactate in metastatic brain tumors. *NMR in Biomed* 1996; 9: 65-71.
77. Kimura T, Sako K, Gotoh T, Tanaka K. In vivo single-voxel proton MR spectroscopy in brain lesions with ring-like enhancement. *NMR in Biomed* 2001; 14: 339-349.
- 78.- Celda, B., Monleon, D., Martínez-Bisbal, M.C., et al. (2006) MRS as endogenous molecular imaging for brain and prostate tumors: FP6 project "eTUMOR". *Adv Exp Med Biol*, 587, 285-302.
- 79- Stefan, D.; Cesare, F. D.; Andrasescu, A.; Popa, E.; Lazariev, A.; Vescovo, E.; Strbak, O.; Williams, S.; Starcuk, Z.; Cabanas, M.; van Ormondt, D. & Graveron-Demilly, D. (2009), 'Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals: the jMRUI software package', *Measurement Science and Technology* 20(10), 104035
- 80.- Automatic quantitation of localized in vivo <sup>1</sup>H spectra with LCMoDel. Provencher SW. *NMR Biomed*. 2001 Jun;14(4):260-4.
- 81 Tate AR, Underwood J, Acosta DM, Julia-Sape M, Majos C, Moreno-Torres A. Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra. *NMR Biomed* 2006; 19: 411-434.
82. M.C. Martínez-Bisbal , B. Celda-Muñoz , L. Martí-Bonmatí , P. Ferrer-Ripollés , A.J. Revert-Ventura , J. Piquer-Belloch , E. Mollá-Olmos , E. Arana-Fernández de Moya , R. Dosdá-Muñoz . Contribución de la espectroscopía de resonancia magnética a la clasificación del glioma de alto grado. Valor predictivo de las macromoléculas. *Rev Neurol* 2002; 34 (4): 309-313
83. Al-Okaili RN, Krejza J, Woo JH, Wolf RL, O'Rourke DM, Judy KD, Poptani H, Melhem ER. Intraxial brain masses: MR imaging-based diagnostic strategy, initial experience. *Radiology*. 2007 May;243(2):539-50.

84. Bottomley, PA. Selective volume method for performing localized NMR spectroscopy. U.S. Patent 4 480 228 (1994).
85. Kaminogo M, Ishimaru H, Morikawa M, Ochi M, Ushijima R, Tani M, et al. Diagnostic potential of short echo time MR spectroscopy of gliomas with single voxel and point resolved spatially localized proton spectroscopy of brain. *Neuroradiology* 2001; 43: 35363.
86. Castillo M, Smith JK, Kwock L. Correlation of myoInositol levels and grading of cerebral astrocytomas. *Am J Neuroradiol* 2000; 21: 16459.
87. Stefan, D.; Cesare, F. D.; Andrasescu, A.; Popa, E.; Lazariiev, A.; Vescovo, E.; Strbak, O.; Williams, S.; Starcuk, Z.; Cabanas, M.; van Ormondt, D. & Graveron-Demilly, D. (2009), 'Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals: the jMRUI software package', *Measurement Science and Technology* 20(10), 104035
88. Poptani H, Gupta RK, Roy R, Pandey R, Jain VK, Chhabra DK. Characterization of intracranial mass lesions with in vivo proton MR spectroscopy. *Am J Neuroradiol* 1995; 16: 1593603.
89. Mader I, Roser W, Hagberg G, Schneider M, Sauter R, Seelig J, et al. Proton chemical shift imaging, metabolic maps and single voxel spectroscopy of glial brain tumors. *MAGMA* 1996; 4: 13950.
90. Ping H. Lai, Jih T. Ho, Wei L. Chen, Shu S. Hsu, Jyh S. Wang, Huay B. Pan and Chien F. Yang, Brain Abscess and Necrotic Brain Tumor: Discrimination with Proton MR Spectroscopy and Diffusion-Weighted Imaging. *AJNR* 2002; 23: 13699.
91. Dusak A1, Hakyemez B, Kocaeli H, Bekar A., Magnetic resonance spectroscopy findings of pyogenic, tuberculous, and Cryptococcus intracranial abscesses. *Neurochem Res.* 2012; 37(2):233.
92. Shuo-Hsiu Hsu, , Ming-Chung Chou , Cheng-Wen Ko, Shu-Shong Hsu, Huey-Shyan Lin, Jui-Hsun Fu, Po-Chin Wang, Huay-Ben Pan, Ping-Hong Lai. Proton MR spectroscopy in patients with pyogenic brain abscess: MR spectroscopic imaging versus single-voxel spectroscopy. *European Journal of Radiology* 2013; 82(8): 1299.
93. Ai-Qin L, Ji-Xin Shou, Xue-Yuan Li, Lin Ma, and Xiao-Han Zhu. Metabolic changes in acute cerebral infarction: Findings from proton magnetic resonance spectroscopic imaging. *Exp Ther Med.* 2014 Feb; 7(2): 451
94. Martínez-Bisbal MC, Celda B, Martí-Bonmat L, Casanova-Estruch B, Coret-Ferrer F. Differences in the spectroscopy of the lesions of the remitting relapsing form of multiple sclerosis shown by magnetic resonance. *Rev Neurol.* 2002 May 1-15;34(9):807.
95. Gutowski NJ, Gómez-Ansón B, Torpey N, Revesz T, Miller D, Rudge P. Oligodendroglial gliomatosis cerebri: (1)H-MRS suggests elevated glycine/inositol levels. *Neuroradiology.* 1999 Sep;41(9):650

96. Celda, B., Monleon, D., Martinez-Bisbal, M.C., et al. (2006) MRS as endogenous molecular imaging for brain and prostate tumors: FP6 project "eTUMOR". *Adv Exp Med Biol*, 587, 285-302.
97. Stefan, D.; Cesare, F. D.; Andrasescu, A.; Popa, E.; Lazariiev, A.; Vescovo, E.; Strbak, O.; Williams, S.; Starcuk, Z.; Cabanas, M.; van Ormondt, D. & Graveron-Demilly, D. (2009), 'Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals: the jMRUI software package', *Measurement Science and Technology* 20(10), 104035
98. Automatic quantitation of localized in vivo <sup>1</sup>H spectra with LCModel. Provencher SW. *NMR Biomed*. 2001 Jun;14(4):260-4.
99. Tate AR, Underwood J, Acosta DM, Julia-Sape M, Majos C, Moreno-Torres A. Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra. *NMR Biomed* 2006; 19: 411-434.
100. Dammers R, Haitsma IK, Schouten JW, Kros JM, Avezaat CJ, Vincent AJ (2008) Safety and efficacy of frameless and frame-based intracranial biopsy techniques. *Acta Neurochir* 150:23–29
101. Devos A, Lukas L, Suykens JAK, Vanhamme L, Tate AR, Howe FA, Majos C, Moreno-Torres A, van der Graaf M, Arus C, Van Huffel S (2004) Classification of brain tumours using short echo time <sup>1</sup>H MR spectra. *J Magn Reson* 170:164–175
102. Lukas L, Devos A, Suykens JAK, Vanhamme L, Howe FA, Majos C, Moreno-Torres A, van der Graaf M, Tate AR, Arus C, Van Huffel S (2004) Brain tumor classification based on long echo proton MRS signals. *Artif Intell Med* 31:73–89
103. Garcia-Gomez JM, Luts J, Julia-Sape M, Krooshof P, Tortajada S, Vicente Robledo J, Melssen W, Fuster-Garcia E, Olier I, Postma G, Monleon D, Moreno-Torres A, Pujol J, Candiota A-P, Martinez-Bisbal MC, Suykens JAK, Buydens L, Celda B, Van Huffel S, Arus C, Robles M (2009) Multiproject-multicenter evaluation of automatic brain tumor classification by magnetic resonance spectroscopy. *MAGMA* 22:5–18
104. Opstad KS, Murphy MM, Wilkins PR, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA (2004) Differentiation of metastases from high-grade gliomas using short echo time <sup>1</sup>H spectroscopy. *J Magn Reson Imaging* 20:187–192
105. Ishimaru H, Morikawa M, Iwanaga S, Kaminogo M, Ochi M, Hayashi K (2001) Differentiation between high-grade glioma and metastatic brain tumor using singlevoxel proton MR spectroscopy. *Eur Radiol* 9:1784–1791
106. Di Costanzo A, Scarabino T, Trojsi F, Popolizio T, Catapano D, Giannatempo GM, Bonavita S, Portaluri M, Tosetti M, d'Angelo VA, Salvolini U, Tedeschi G (2008) Proton MR spectroscopy of cerebral gliomas at 3T: spatial heterogeneity, and tumor grade and extent. *Eur Radiol* 18:1727–1735

107. Fan G, Sun B, Wu Z, Guo Q, Guo Y (2004) In vivo single-voxel proton MR spectroscopy in the differentiation of high-grade gliomas and solitary metastases. *Clin Radiol* 59:77–85
108. Law M, Cha S, Knopp EA, Johnson G, Arnett J, Litt AW (2002) High-grade gliomas and solitary metastases: differentiation by using perfusion and proton spectroscopic MR imaging. *Radiology* 222:715–721
109. Chiang IC, Kuo Y-T, Lu C-Y, Yeung K-W, Lin W-C, Sheu F-O, Liu G-C (2004) Distinction between high-grade gliomas and solitary metastases using peritumoral 3-T magnetic resonance spectroscopy, diffusion, and perfusion imaging. *Neuroradiology* 46:619–627
110. Duyn J, Moonen C (1993) Fast proton spectroscopic imaging of human brain using multiple spin-echoes. *Magn Reson Med* 30:409–414
111. Hollander M, Wolfe DA (1973) *Nonparametric statistical methods*. Wiley, New York
112. Tukey JW (1949) Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics* 5:99–114
113. Otsu N (1979) A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans Syst Man Cybern* 9:62–66
114. Szabo de Edelenyi F, Rubin C, Esteve F, Grand S, Decorps M, Lefournier V, Le Bas JF, Remy C (2000) A new approach for analyzing proton magnetic resonance spectroscopic images of brain tumors: nosologic images. *Nat Med* 6:1287–1289
115. Luts J, Laudadio T, Idema AJ, Simonetti AW, Heerschap A, Vandermeulen D, Suykens JAK, Van Huffel S (2009) Nosologic imaging of the brain: segmentation and classification using MRI and MRSI. *NMR Biomed* 22:374–390
116. Van Driessen K, Rousseeuw PJ (1999) A fast algorithm for the minimum covariance determinant estimator. *Technometrics* 41:212–223
117. Ho S, Bullitt E, Gerig G (2002) Level-set evolution with region competition: Automatic 3-D segmentation of brain tumors. *International Conference on Pattern Recognition*, IEEE Computer Society, Washington, 532–535
118. DeAngelis LM (2001) Brain tumours. *N Engl J Med*, 344:114–123
119. Norden AD, Wen PY, Kesari S (2005) Brain metastases. *Curr Opin Neurol* 18:654–661
120. Lefranc F, Sadeghi N, Camby I, Metens T, Dewitte O, Kiss R (2006) Present and potential future issues in glioblastoma treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 6:719–732

121. Eichler AF, Loeffler JS (2007) Multidisciplinary management of brain metastases. *Oncologist* 12:884–898
122. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996
123. Rades D, Kueter J-D, Hornung D, Veninga T, Hanssens P, Schild SE, Dunst J (2008) Comparison of stereotactic radiosurgery (SRS) alone and whole brain radiotherapy (WBRT) plus a stereotactic boost (WBRT + SRS) for one to three brain metastases. *Strahlenther Onkol* 184:655-662
124. Rees J (2003) Advances in magnetic resonance imaging of brain tumours. *Curr Opin Neurol* 16:643–650
125. Schaefer PW, Budzik Jr RF, Gonzalez RG (1996) Imaging of cerebral metastases. *Neurosurg Clin N Am* 7:393–423
126. Young GS, Setayesh K (2008) Spin-echo echo-planar perfusion MR imaging in the differential diagnosis of solitary enhancing brain lesions: distinguishing solitary metastases from primary glioma. *Am J Neuroradiol* 30:575–577
127. Smith EA, Carlos RC, Junck LR, Tsien CI, Elias A, Sundgren PC (2009) Developing a clinical decision model: MR spectroscopy to differentiate between recurrent tumor and radiation change in patients with new contrast-enhancing lesions. *Am J Roentgenol* 192:45–52
128. Weber M-A, Giesel FL, Stieltjes B (2008) MRI for identification of progression in brain tumors: from morphology to function. *Expert Rev Neurother* 8:1507–1525
129. Hamstra DA, Galban CJ, Meyer CR, Johnson TD, Sundgren PC, Tsien C, Lawrence TS, Junck L, Ross DJ, Rehemtulla A, Ross BD, Chenevert TL (2008) Functional diffusion map as an early imaging biomarker for high-grade glioma: correlation with conventional radiologic response and overall survival. *J Clin Oncol* 26:3387–3394
130. Usenius J-P, Vainio P, Hernesniemi J, Kauppinen RA (1994) Choline-containing compounds in human astrocytomas studied by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy in vivo and in vitro. *J Neurochem* 63:1538–1543
131. Danielsen RE, Ross B (1999) Magnetic resonance spectroscopy diagnosis of neurological diseases. Marcel Dekker Inc., New York
132. Podo F (1999) Tumour phospholipid metabolism. *NMR Biomed* 12:413–439
133. Kinoshita Y, Yokota A (1997) Absolute concentrations of metabolites in human brain tumors using in vitro proton magnetic resonance spectroscopy. *NMR Biomed* 10:2–12

134. Preul MC, Caramanos Z, Leblanc R, Villemure JG, Arnold DL (1998) Using pattern analysis of in vivo proton MRSI data to improve the diagnosis and surgical management of patients with brain tumors. *NMR Biomed* 11:192–200
135. Ganslandt O, Stadlbauer A, Fahlbusch R, Kamada K, Buslei R, Blumcke I, Moser E, Nimsky C (2005) Proton magnetic resonance spectroscopic imaging integrated into image-guided surgery: correlation to standard magnetic resonance imaging and tumor cell density. *Neurosurgery* 56:291–298
136. Croteau D, Scarpace L, Hearshen D, Gutierrez J, Fisher JL, Rock JP, Mikkelsen T (2001) Correlation between magnetic resonance spectroscopy imaging and image-guided biopsies: Semiquantitative and qualitative histopathological analyses of patients with untreated glioma. *Neurosurgery* 49:823–829
137. Stadlbauer A, Gruber S, Nimsky C, Fahlbusch R, Hammen T, Buslei R, Tomandl B, Moser E, Ganslandt O (2006) Preoperative grading of gliomas by using metabolite quantification with high-spatial-resolution proton MR spectroscopic imaging. *Radiology* 238:958–969
138. Osorio JA, Ozturk-Isik E, Xu D, Cha S, Chang S, Berger MS, Vigneron DB, Nelson SJ (2007) 3D 1H MRSI of brain tumors at 3.0 tesla using an eight-channel phased-array head coil. *J Magn Reson Imaging* 26:23-30
139. Law M, Yang S, Wang H, Babb JS, Johnson G, Cha S, Knopp EA, Zagzag D (2003) Glioma grading: Sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging. *Am J Neuroradiol* 24:1989–1998
140. Tsuchiya K, Fujikawa A, Nakajima M, Honya K (2005) Differentiation between solitary brain metastasis and high-grade glioma by diffusion tensor imaging. *Br J Radiol* 78:533–537
141. Price SJ, Jena R, Burnet NG, Hutchinson PJ, Dean AF, Pena A, Pickard JD, Carpenter TA, Gillard JH (2006) Improved delineation of glioma margins and regions of infiltration with the use of diffusion tensor imaging: An image-guided biopsy study. *Am J Neuroradiol* 27:1969–1974
142. Di Costanzo A, Scarabino T, Trojsi F, Giannatempo GM, Popolizio T, Catapano D, Bonavita S, Maggialelli N, Tosetti M, Salvolini U, d'Angelo VA, Tedeschi G (2006) Multiparametric 3T MR approach to the assessment of cerebral gliomas: tumor extent and malignancy. *Neuroradiology* 48:622–631
143. Cha S, Lupo JM, Chen M-H, Lamborn KR, McDermott MW, Berger MS, Nelson SJ, Dillon WP (2007) Differentiation of glioblastoma multiforme and single brain metastasis by peak height and percentage of signal intensity recovery derived from dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion mr imaging. *Am J Neuroradiol* 28:1078–1084

144. Wang W, Steward CE, Desmond PM (2008) Diffusion tensor imaging in glioblastoma multiforme and brain metastases: the role of p, q, L, and fractional anisotropy *Am J Neuroradiol* 30:203–208
145. Wang S, Kim S, Chawla S, Wolf RL, Zhang W-G, O'Rourke DM, Judy KD, Melhem ER, Poptani H (2009) Differentiation between glioblastomas and solitary brain metastases using diffusion tensor imaging. *Neuroimage* 44:653–660
146. Celda, B., Monleon, D., Martinez-Bisbal, M.C., et al. (2006) MRS as endogenous molecular imaging for brain and prostate tumors: FP6 project "eTUMOR". *Adv Exp Med Biol*, 587, 285-302.
147. Automatic quantitation of localized in vivo <sup>1</sup>H spectra with LCModel. Provencher SW. *NMR Biomed.* 2001 Jun;14(4):260-4.
148. .- Tate AR, Underwood J, Acosta DM, Julia-Sape M, Majos C, Moreno-Torres. Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra. *NMR Biomed* 2006; 19: 411-434.
149. .- Pouillet JB, Martinez-Bisbal MC, Valverde D, Monleon D, Celda B, Arus C, Van Huffel S. Quantification and classification of high-resolution magic angle spinning data for brain tumor diagnosis. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007; 5407-5410.
150. McGill R, Tukey JW, Wayne A. Variations of Box Plots. *The American Statistician* 1978; 32:12-16.
- 151.- Daly LE, Bourke GJ. Interpretation and uses of medical statistics. Wiley-Blackwell; 2000.
- 152.- .- McQueen JB. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. *Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability* 1967;1:281–297.
- 153.- Hartigan JA, Wong MA. A K-means clustering algorithm. *Applied Statistics* 1979; 28:100–108.
- 154.- Tavazoie S, Hughes JD, Campbell MJ, Cho RJ, Church GM. Systematic determination of genetic network architecture. *Nat Genet* 1999; 22:281-285.
- 155.- Hollander M, Wolfe DA. *Nonparametric Statistical Methods*. New York: Wiley; 1973.
- 156.- T. Laudadio, N. Mastronardi, L. Vanhamme, P. Van Hecke, and S. Van Huffel, "Improved Lanczos algorithms for blackbox MRS data quantitation," *J. Magn. Reson.*, vol. 157, no. 2, pp. 292–7, 2002.
- 157.- M. Carmen Martinez-Bisbal, Beatriz Martinez-Granados, Vicente Rovira, Bernardo Celda, Vicent Esteve. Magnetic resonance spectroscopy and imaging on

fresh human brain tumor biopsies at microscopic resolution. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407(22):6771-6780

158.- Pfeuffer J, Tkac I, Choi IY, Merkle H, Ugurbil K, Garwood M, Gruetter R (1999) Localized in vivo <sup>1</sup>H NMR detection of neurotransmitter labeling in rat brain during infusion of [<sup>1-13</sup>C] D-glucose. *Magn Reson Med* 41:1077

159.- Brazilian Aging Brain Study Group, Grinberg LT, Amaro E Jr,

Teipel S, dos Santos DD, Pasqualucci CA, (2008) Assessment of factors that confound MRI and neuropathological correlation of human postmortem brain tissue. *Cell Tissue Bank* 9:195

159.- Stadlbauer A, Gruber S, Nimsy C, Fahlbusch R, Hammen T, Buslei R, Tomandl B, Moser E, Ganslandt O (2006) Preoperative grading of gliomas by using metabolite quantification with high spatial-resolution proton MR spectroscopic imaging. *Radiology* 238:958

160. Howe FA, Barton SJ, Cudlip SA, Stubbs M, Saunders DE, Murphy M, Wilkins P, Opstad KS, Doyle VL, McLean MA, Bell BA, Griffiths JR (2003) Metabolic profiles of human brain tumors using quantitative in vivo <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 49:223

161. Castillo M, Kwok L (1999) Clinical applications of proton magnetic resonance spectroscopy in the evaluation of common intracranial tumors. *Top Magn Reson Imaging* 10:104

162.- Howe FA, Opstad KS (2003) <sup>1</sup>H MR spectroscopy of brain tumours and masses. *NMR Biomed* 16:123

163. Martinez-Bisbal MC, Celda B (2009) Proton magnetic resonance spectroscopy imaging in the study of human brain cancer. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 53:618

164. Sibtain NA, Howe FA, Saunders DE (2007) The clinical value of proton magnetic resonance spectroscopy in adult brain tumours. *Clin Radiol* 62:109

165. Tong Z, Yamaki T, Harada K, Houkin K (2004) In vivo quantification of the metabolites in normal brain and brain tumors by proton MR spectroscopy using water as an internal standard. *Magn Reson Imaging* 22:1017

166. Hourani R, Brant LJ, Rizk T, Weingart JD, Barker PB, Horska A (2008) Can proton MR spectroscopic and perfusion imaging differentiate between neoplastic and nonneoplastic brain lesions in adults? *AJNR Am J Neuroradiol* 29:366

167. Hourani R, Horska A, Albayram S, Brant LJ, Melhem E, Cohen KJ, Burger PC, Weingart JD, Carson B, Wharam MD, Barker PB (2006) Proton magnetic resonance spectroscopic imaging to differentiate between nonneoplastic lesions and brain tumors in children. *J Magn Reson Imaging* 23:99

168. Lai PH, Weng HH, Chen CY, Hsu SS, Ding S, Ko CW, Fu JH, Liang HL, Chen KH (2008) In vivo differentiation of aerobic brain abscesses and necrotic glioblastomas multiforme using proton MR spectroscopic imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 29:1511
169. Vuori K, Kankaanranta L, Hakkinen AM, Gaily E, Valanne L, Granstrom ML, Joensuu H, Blomstedt G, Paetau A, Lundbom N (2004) Low-grade gliomas and focal cortical developmental malformations: differentiation with proton MR spectroscopy. *Radiology* 230:703
170. Law M, Yang S, Wang H, Babb JS, Johnson G, Cha S, Knopp EA, Zagzag D (2003) Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 24:1989
171. Catala I, Henry R, Dillon WP, Graves EE, McKnight TR, Lu Y, Vigneron DB, Nelson SJ (2006) Perfusion, diffusion and spectroscopy values in newly diagnosed cerebral gliomas. *NMR Biomed* 19:463
172. Devos A, Lukas L, Suykens JA, Vanhamme L, Tate AR, Howe FA, Majos C, Moreno-Torres A, van der Graaf M, Arus C, Van Huffel S (2004) Classification of brain tumours using short echo time 1HMR spectra. *J Magn Reson* 170:164
173. Burtscher IM, Skagerberg G, Geijer B, Englund E, Stahlberg F, Holtas S (2000) Proton MR spectroscopy and preoperative diagnostic accuracy: an evaluation of intracranial mass lesions characterized by stereotactic biopsy findings. *AJNR Am J Neuroradiol* 21:
174. Ishimaru H, Morikawa M, Iwanaga S, Kaminogo M, Ochi M, Hayashi K (2001) Differentiation between high-grade glioma and metastatic brain tumor using singlevoxel proton MR spectroscopy. *Eur Radiol* 11:1784
175. Stadlbauer A, Nimsy C, Buslei R, Pinker K, Gruber S, Hammen T, Buchfelder M, Ganslandt O (2007) Proton magnetic resonance spectroscopic imaging in the border zone of gliomas: correlation of metabolic and histological changes at low tumor infiltration initial results. *Investig Radiol* 42:218
176. Law M, Cha S, Knopp EA, Johnson G, Arnett J, Litt AW (2002) High-grade gliomas and solitary metastases: differentiation by using perfusion and proton spectroscopic MR imaging. *Radiology* 222:715
177. Schlemmer HP, Bachert P, Herfarth KK, Zuna I, Debus J, van Kaick G (2001) Proton MR spectroscopic evaluation of suspicious brain lesions after stereotactic radiotherapy. *AJNR Am J Neuroradiol* 22: 1316
178. Weybright P, Sundgren PC, Maly P, Hassan DG, Nan B, Rohrer S, Junck L (2005) Differentiation between brain tumor recurrence and radiation injury using MR spectroscopy. *AJR Am J Roentgenol* 185:1471

179. Stadlbauer A, Moser E, Gruber S, Buslei R, Nimsy C, Fahlbusch R, Ganslandt O (2004) Improved delineation of brain tumors: an automated method for segmentation based on pathologic changes of 1H-MRSI metabolites in gliomas. *Neuroimage* 23:454
- 180 . Dowling C, Bollen AW, Noworolski SM, McDermott MW, Barbaro NM, Day MR, Henry RG, Chang SM, Dillon WP, Nelson SJ, Vigneron DB (2001) Preoperative proton MR spectroscopic imaging of brain tumors: correlation with histopathologic analysis of resection specimens. *AJNR Am J Neuroradiol* 22:604
181. Benveniste H, Blackband S (2002) MR microscopy and high resolution small animal MRI: applications in neuroscience research. *Prog Neurobiol* 67:393
182. Benveniste H, Blackband SJ (2006) Translational neuroscience and magneticresonancemicroscopy. *Lancet Neurol* 5:536
183. Thelwall PE, Shepherd TM, Stanisz GJ, Blackband SJ (2006) Effects of temperature and aldehyde fixation on tissue water diffusion properties, studied in an erythrocyte ghost tissue model. *Magn Reson Med* 56:282
184. Fatterpekar GM, Naidich TP, Delman BN, Aguinaldo JG, Gultekin SH, Sherwood CC, Hof PR, Drayer BP, Fayad ZA (2002) Cytoarchitecture of the human cerebral cortex: MR microscopy of excised specimens at 9.4 Tesla. *AJNR Am J Neuroradiol* 23:1313
185. Yushkevich PA, Avants BB, Pluta J, Das S, Minkoff D, Mechanic- Hamilton D, Glynn S, Pickup S, Liu W, Gee JC, Grossman M, Detre JA (2009) A high-resolution computational atlas of the human hippocampus from postmortem magnetic resonance imaging at 9.4 T. *Neuroimage* 44:385
186. Blackwell ML, Farrar CT, Fischl B, Rosen BR (2009) Targetspecific contrast agents for magnetic resonance microscopy. *Neuroimage* 46:382
187. Shenkar R, Venkatasubramanian PN, Zhao JC, Batjer HH, Wyrwicz AM, Awad IA (2008) Advanced magnetic resonance imaging of cerebral cavernous malformations: part I. High-field imaging of excised human lesions. *Neurosurgery* 63:782
188. Gonzalez-Segura A, Morales JM, Gonzalez-Darder JM, Cardona- Marsal R, Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Monleon D (2011) Magnetic resonance microscopy at 14 Tesla and correlative histopathology of human brain tumor tissue. *PLoS One* 6, e27442
189. Shepherd TM, Flint JJ, Thelwall PE, Stanisz GJ, Mareci TH, Yachnis AT, Blackband SJ (2009) Postmortem interval alters the water relaxation and diffusion properties of rat nervous tissue implications for MRI studies of human autopsy samples. *Neuroimage* 44:820

- 190 . Brazilian Aging Brain Study Group, Grinberg LT, Amaro E Jr, Teipel S, dos Santos DD, Pasqualucci CA, Leite RE, Camargo, Heinsen H (2008) Assessment of factors that confound MRI and neuropathological correlation of human postmortem brain tissue. *Cell Tissue Bank* 9:195
191. Tkac I, Starcuk Z, Choi IY, Gruetter R (1999) In vivo <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magn Reson Med* 41: 649
192. Pfeuffer J, Tkac I, Provencher SW, Gruetter R (1999) Toward an in vivo neurochemical profile: quantification of 18 metabolites in short-echo-time (<sup>1</sup>H) NMR spectra of the rat brain. *J Magn Reson* 141:104
193. Pfeuffer J, Tkac I, Choi IY, Merkle H, Ugurbil K, Garwood M, Gruetter R (1999) Localized in vivo <sup>1</sup>H NMR detection of neurotransmitter labeling in rat brain during infusion of [<sup>1-13</sup>C] D-glucose. *Magn Reson Med* 41:1077
194. Gruetter R (1993) Automatic, localized in vivo adjustment of all first- and second order shim coils. *Magn Reson Med* 29:804
195. Zoula S, Herigault G, Ziegler A, Farion R, Decorps M, Remy C (2003) Correlation between the occurrence of <sup>1</sup>H-MRS lipid signal, necrosis and lipid droplets during C6 rat glioma development. *NMR Biomed* 16:199
196. Ziegler A, von Kienlin M, Decorps M, Remy C (2001) High glycolytic activity in rat glioma demonstrated in vivo by correlation peak <sup>1</sup>H magnetic resonance imaging. *Cancer Res* 61:5595
197. Garcia-Martin ML, Herigault G, Remy C, Farion R, Ballesteros P, Coles JA, Cerdan S, Ziegler A (2001) Mapping extracellular pH in rat brain gliomas in vivo by <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopic imaging: comparison with maps of metabolites. *Cancer Res* 61: 6524
198. Hakumaki JM, Poptani H, Sandmair AM, Yla-Herttuala S, Kauppinen RA (1999) <sup>1</sup>H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the in vivo detection of apoptosis. *Nat Med* 5: 1323
199. Levin VA, Leibel SA, Gutin PH (1997) In: De Vita VTj, Hellman S, Rosenberg SA (eds) *Cancer principles and practice of oncology*, 5th edn. Lippincott-Raven, Philadelphia
200. Cha S (2006) Update on brain tumor imaging: from anatomy to physiology. *AJNR Am J Neuroradiol* 27:475
201. Steinberg JD, Velan SS (2012) Measuring glucose concentrations in the rat brain using echo-time-averaged point resolved spectroscopy at 7 Tesla. *Magnetic Resonance in Medicine*:n/a
- 202.. Simoes RV, Garcia-Martin ML, Cerdan S, Arus C (2008) Perturbation of mouse glioma MRS pattern by induced acute hyperglycemia. *NMR Biomed* 21:251

203. Thorsen F, Jirak D, Wang J, Sykova E, Bjerkvig R, Enger PO, van der Kogel A, Hajek M (2008) Two distinct tumor phenotypes isolated from glioblastomas show different MRS characteristics. *NMR Biomed* 21:830
204. Liimatainen T, Hakumaki J, Tkac I, Grohn O (2006) Ultra-short echo time spectroscopic imaging in rats: implications for monitoring lipids in glioma gene therapy. *NMR Biomed* 19:554
205. Liimatainen TJ, Erkkila AT, Valonen P, Vidgren H, Lakso M, Wong G, Grohn OH, Yla-Herttuala S, Hakumaki JM (2008) <sup>1</sup>H MR spectroscopic imaging of phospholipase-mediated membrane lipid release in apoptotic rat glioma in vivo. *Magn Reson Med* 59:1232
206. Liimatainen T, Hakumaki JM, Kauppinen RA, Ala-Korpela M (2009) Monitoring of gliomas in vivo by diffusion MRI and (1) H MRS during gene therapy-induced apoptosis: interrelationships between water diffusion and mobile lipids. *NMR Biomed* 22:272
207. Griffin JL, Lehtimaki KK, Valonen PK, Grohn OH, Kettunen MI, Yla-Herttuala S, Pitkanen A, Nicholson JK, Kauppinen RA (2003) Assignment of <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance visible polyunsaturated fatty acids in BT4C gliomas undergoing ganciclovir-thymidine kinase gene therapy-induced programmed cell death. *Cancer Res* 63:3195
208. Provent P, Benito M, Hiba B, Farion R, Lopez-Larrubia P, Ballesteros P, Remy C, Segebarth C, Cerdan S, Coles JA, Garcia-Martin ML (2007) Serial in vivo spectroscopic nuclear magnetic resonance imaging of lactate and extracellular pH in rat gliomas shows redistribution of protons away from sites of glycolysis. *Cancer Res* 67:7638
209. Doblas S, He T, Saunders D, Hoyle J, Smith N, Pye Q, Lerner M, Jensen RL, Towner RA (2012) In vivo characterization of several rodent glioma models by <sup>1</sup>H MRS. *NMR Biomed* 25:685
210. Ziegler A, von Kienlin M, Decors M, Remy C (2001) High glycolytic activity in rat glioma demonstrated in vivo by correlation peak <sup>1</sup>H magnetic resonance imaging. *Cancer Res* 61:5595
211. Garcia-Martin ML, Herigault G, Remy C, Farion R, Ballesteros P, Coles JA, Cerdan S, Ziegler A (2001) Mapping extracellular pH in rat brain gliomas in vivo by <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopic imaging: comparison with maps of metabolites. *Cancer Res* 61: 6524
212. Hakumaki JM, Poptani H, Sandmair AM, Yla-Herttuala S, Kauppinen RA (1999) <sup>1</sup>H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the in vivo detection of apoptosis. *Nat Med* 5: 1323

