



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**Contribución al fenotipado molecular de
tumores cerebrales preclínicos mediante
estudios *in vitro* e *in vivo***

Juana Martín Sitjar de Togoires
Julio 2013



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Contribución al fenotipado molecular de tumores
cerebrales preclínicos mediante
estudios *in vitro* e *in vivo*

Juana Martín Sitjar de Togoies

Julio 2013

Memoria presentada por Juana Martín Sitjar de Togores para optar al grado de Doctora dentro del programa de doctorado de Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona. Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Carles Arús Caraltó y la Dra. Margarida Julià Sapè.

Director de la tesis

Directora de la tesis

Carles Arús Caraltó

Margarida Julià Sapè

La doctoranda

Juana Martín Sitjar de Togores

En Cerdanyola del Vallès, a 19 de julio de 2013

*A mi abuelo Roberto Martín,
quien esperaba con ilusión este
momento y no llegó a vivirlo.*

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, querría agradecerle al Dr. Carles Arús el haberme aceptado en su grupo de investigación y haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección y la de Margarida Julià-Sapé. Gracias por darme la oportunidad de vivir esta etapa, en la que he podido desarrollarme tanto a nivel científico como personal.

Gracias a todos mis compañeros del GABRMN. A Ana Paula Candiota y a Margarida Julià-Sapé, por ser mi punto de referencia al llegar al grupo y por continuar dándome su apoyo y orientación durante estos años. A Ana Paula, por aportarme toda su experiencia inicialmente cuando trabajábamos juntas en los proyectos europeos. A Marga principalmente por guiarme en la última etapa de la tesis, hasta acabar siendo mi directora de tesis. A Teresa Delgado, quien ha estado desde mi primer día en el grupo, y quien ha sido mi mayor apoyo estos años, tanto en lo laboral como lo personal. A M^a Rosa Quintero, quien fue mi precursora inmediata en el grupo con mi tema de tesis. Gracias por el duro esfuerzo que hizo posible para mí empezar esta tesis. A Rui Simoes, por transmitirme su pasión por la ciencia. A Elena Jiménez y Myriam Dávila, por su eterna sonrisa y su constante buen humor. Gracias también a Alina García y Magdalena Cieska y gracias a todos los que han compartido estos años de trabajo y a todos los que han pasado por el grupo, unos compañeros excelentes: Silvia Ferrer, Sandra Ortega, Óscar Tibaduisa, Edgar Villarraga, Iván Olier, Sergi Torralba, Josep Alemany, Alexander Pérez,

A todos los miembros del *Servei de Ressonància Magnètica Nuclear* de la UAB y en especial Miquel Cabañas. Gracias Miquel por hacerme reír en los momentos de estrés y por ayudarme a solucionar casi cualquier “interferencia demoniaca” dispuesta a malograr mi experimental en el *Servei*.

A Geovanni Rivera, por conseguir devolverme la sonrisa en cuestión de segundos.

A Blanca San Segundo por acogerme unos días en su laboratorio antes de lanzarme a Taiwán para aprender nuevas técnicas que aplicar en esta tesis.

A Jason Tzen y su equipo por acogerme durante dos meses en la Universidad de Taichung (Taiwán) para enseñarme a sintetizar gotículas lipídicas de oleosina y caleosina. Y por ayudarme también a descubrir las delicias gastronómicas de su tierra.

A M^a Antonia Molins, del *Parc Científic de Barcelona*, por ayudarme en mi primera toma de contacto con el HR-MAS.

A Myriam Royo, Gerardo Acosta y Sonia Varón por ayudarme durante mi estancia en el Parc Científic de Barcelona para aprender a inmovilizar gotículas en una matriz sólida. Todo un mundo nuevo para mí.

Finalmente querría también agradecerles a mi familia y amigos, que hayan participado en el desarrollo de este trabajo dándome ánimos para no desfallecer en este largo proceso. A todos, muchas gracias por su paciencia y por estar a mi lado apoyándome.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	VII
Índice de tablas.....	XII
Índice de ecuaciones.....	XIII
Abreviaturas.....	XIV
1. Introducción.....	1
1.1 Tumores cerebrales.....	1
1.1.1 Epidemiología, clasificación y etiología.....	1
1.1.2 Diagnóstico.....	4
1.2 Introducción a la espectroscopía de RMN de muestras biológicas.....	7
1.2.1 Conceptos básicos.....	7
1.2.2 Parámetros espectrales.....	11
1.2.3 Espectroscopía de RMN de alta resolución por giro de ángulo mágico: High resolution magic angle spinning (HR-MAS) de muestras biológicas.....	17
1.2.4 Espectroscopía (ERM) <i>in vivo</i>	20
1.2.5 Imagen de resonancia magnetic (IRM).....	23
1.2.6 Imagen espectroscópica de resonancia magnética (IERM).....	25
1.3 Lípidos “móviles”, detección mediante RMN y localización subcelular	28
1.3.1 Papel del citoesqueleto en la acumulación de gotículas lipídicas citoplasmáticas	32
1.3.2 Origen metabólico de los lípidos que originan las señales de ML.....	34
1.3.3 Las células C6 como modelo de estudio para los ML.....	45
1.3.4 AOB como modelo de estudio para los ML	46
1.3.5 Modelos murinos de tumores cerebrales preclínicos.....	48
1.4 Metodologías matemáticas de reconocimiento de patrones.....	49
2. Objetivos.....	57
3. Materiales y métodos.....	59
3.1 Cultivos celulares.....	59
3.1.1 Condiciones de cultivo.....	59
3.1.1.1 Recuperación de las células sembradas en flascos de 75 cm ²	60

3.1.1.2 Recuperación de las células sembradas en flascos de 500 cm ²	60
3.1.2 Tinción con Nile red.....	61
3.1.3 Estudio de la viabilidad celular pre y post HR-MAS.....	61
3.2 Preparación de AOB y controles lipídicos.....	62
3.2.1 Sobreexpresión de oleosina y caleosina en <i>Escherichia coli</i>	62
3.2.1.1 Preparación de células competentes de <i>E.</i>	62
3.2.1.2 Preparación de geles SDS-PAGE	63
3.2.1.3 Transformación bacteriana	65
3.2.1.4 Amplificación del plásmido	66
3.2.1.5 Sobreexpresión de las proteínas	67
3.2.1.6 Purificación de las proteínas de interés	68
3.2.1.7 Elución de las proteínas de geles preparativos	69
3.2.2 Obtención de oleosina y caleosina de semillas de sésamo.....	70
3.2.3 Preparación de AOB.....	71
3.2.4 Preparación de controles lipídicos.....	72
3.2.5 Inmovilización de los AOBs en una matriz sólida.....	73
3.2.6 Liberación de las gotículas inmovilizadas.....	76
3.3 Preparación de liposomas multilamelares.....	77
3.4 Modelos preclínicos de tumores cerebrales.....	77
3.4.1 Glioblastoma.....	78
3.4.2 Oligodendroglioma.....	79
3.4.3 Histopatología.....	80
3.5 Espectroscopía de RMN <i>in vitro</i> : HR-MAS.....	80
3.5.1 Ajuste del ángulo mágico.....	80
3.5.2 Calibración de la temperatura.....	81
3.5.3 Preparación de las muestras para analizarlas por HR-MAS.....	83
3.5.4 Adquisición de espectros de ¹ H de HR-MAS.....	84
3.5.5 Cuantificación de las resonancias de interés con Topspin	85
3.6 Estudios por RM <i>in vivo</i>	85
3.6.1 Adquisición y post-procesamiento.....	86
3.6.1.1 Estudios por IRM.....	99
3.6.1.2 Estudios por IERM.....	87
3.6.1.3 Post-procesamiento de los estudios por IERM.....	87
3.7 Estudio por reconocimiento de patrones de los datos de IERM.....	88
3.8 Análisis estadístico.....	95
3.8.1 Análisis estadístico de los experimentos de HR-MAS.....	95

3.8.2	Análisis estadístico por reconocimiento de patrones de los datos MRSI.....	96
4.	Resultados y discusión.....	97
A.	Estudio de los lípidos móviles (ML) en sistemas modelo y líneas celulares.....	97
4.1	Efecto de la velocidad de giro en el análisis de las muestras estudiadas por HR-MAS.....	97
4.1.1	Caracterización de las células C6 por HR-MAS.....	97
4.1.1.1	Cambios en el patrón espectral de las células C6.....	97
4.1.1.2	Viabilidad e integridad celular tras los experimentos con HR- MAS.....	103
4.1.2	Preparación y estudio de las gotículas lipídicas artificiales (AOB) y los controles lipídicos por HR-MAS.....	104
4.1.2.1	Caracterización de las gotículas lipídicas artificiales mediante microscopía óptica y electrónica.....	104
4.1.2.2	Cambios en el patrón espectral de las gotículas lipídicas y los controles lipídicos.....	108
4.1.3	Estudio de las gotículas lipídicas artificiales inmovilizadas en una matriz sólida.....	112
4.1.4	Tratamiento de la matriz de Sephacryl S-1000 conteniendo gotículas inmovilizadas con ditiotreitol.....	118
4.1.5	Caracterización de los liposomas multilamelares.....	121
4.1.5.1	Caracterización de los liposomas multilamelares mediante microscopía óptica y electrónica.....	121
4.1.5.2	Efectos de la velocidad de giro en el patrón espectral de HR- MAS de los liposomas multilamelares.....	122
4.1.6	Discusión del efecto de la velocidad de giro en espectros HR-MAS a 9,4 T en el análisis de muestras conteniendo ML.....	125
B.	Estudio de la metabolómica de tumores cerebrales preclínicos mediante estrategias de reconocimiento de patrones.....	133
4.2	Obtención de clasificadores para tumores cerebrales preclínicos basados en ERM e IERM.....	133
4.2.1	Diferenciación entre glioblastoma, oligodendroglioma de grado II y parénquima cerebral sano. Clasificador 1.....	133
4.2.2	Diferenciación entre glioblastoma, oligodendroglioma de grado III y parénquima cerebral sano. Clasificador 2.....	138

4.2.3 Diferenciación entre glioblastoma, oligodendroglioma de grado II, oligodendroglioma de grado III y parénquima cerebral sano. Clasificador 3.....	144
4.2.4 Diferenciación entre oligodendroglioma de grado II, oligodendroglioma de grado III y parénquima cerebral sano. Clasificador 4.....	149
4.2.5 Discusión sobre los resultados de los clasificadores para tipo y grado de tumores cerebrales preclínicos.....	152
5. Conclusiones.....	157
6. Bibliografía.....	161
7. Anexos.....	173
7.1 Clasificación WHO de tumores del sistema nervioso.....	173
7.2 Información de los plásmidos.....	175
7.2.1 Plásmido que contiene oleosina.....	175
7.2.2 Plásmido que contiene caleosina.....	176
7.3 Programas de pulsos de las secuencias empleadas.....	179
7.3.1 Pulso y adquisición.....	179
7.3.2 Pulso y adquisición con presaturación del agua.....	180
7.4 Variables seleccionadas en los clasificadores.....	182
7.5 Artículos	183

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Tasa de incidencia de los tumores cerebrales en mujeres (parte superior) y hombres (parte inferior) a nivel mundial por GLOBOCAN.....	2
Figura 1.2. IRM de un absceso piogénico y un OA de grado II.....	4
Figura 1.3. Efecto en la orientación de un núcleo atómico con un número cuántico (l) de 1/2 sometido a un campo magnético (B_0).....	7
Figura 1.4. Efecto de la intensidad del campo magnético sobre la frecuencia e intensidad de las poblaciones de núcleos.....	8
Figura 1.5. Efecto de una radiofrecuencia (perturbación) sobre el estado de equilibrio de una muestra sometida a un B_0	9
Figura 1.6. Detección de la señal de RMN.....	10
Figura 1.7. Aplicación de la transformada de Fourier sobre la FID.....	10
Figura 1.8. Desplazamientos químicos del protón.....	12
Figura 1.9. Multiplicidades características de los grupos alquilo más comunes.....	13
Figura 1.10. Relajación transversal (T_2) y longitudinal (T_1).	15
Figura 1.11. Diferencia en la adquisición de una muestra biológica sin giro y girando en HR-MAS.....	18
Figura 1.12. Ejemplo de un rotor girando en ángulo mágico.....	19
Figura 1.13. Efecto de la velocidad de giro en la aparición de sidebands en HR-MAS.....	20
Figura 1.14. A) Espectro de 1H ($TE=30ms$; $TR= 2000ms$) de materia blanca de un voluntario sano. B) Espectro adquirido con los mismos parámetros que en A) de un GBM.....	21
Figura 1.15. Diagrama de una de las estrategias de selección de un vóxel de excitación determinado dentro del tejido explorado por RMN.....	24
Figura 1.16. Imágenes de resonancia magnética ponderadas en T_1 , T_2 y densidad protónica.....	25
Figura 1.17. Imagen espectroscópica de resonancia magnética nuclear.....	26
Figura 1.18. Principales resonancias de los “lípidos móviles”.....	28
Figura 1.19. Imagen del artículo de Mountford y colaboradores de 1982 donde se muestra el patrón espectral de los ML.....	30
Figura 1.20. Células C6 con tinción Nile Red observadas por microscopía epifluorescente	32
Figura 1.21. Interacción de las gotículas lipídicas y los microtúbulos.....	34

Figura 1.22. Figura modificada a partir de la publicada por Jackowski y colaboradores sobre la síntesis de los TAG.....	37
Figura 1.23. Representación de las vías metabólicas de síntesis de catabolismo de fosfolípidos y lípidos neutros.....	40
Figura 1.24. Ciclo del ácido tricarboxílico en células tumorales.....	41
Figura 1.25. Acumulación de ésteres de colesterol en células tumorales.....	44
Figura 1.26. Tráfico de ácidos grasos a nivel celular.....	45
Figura 1.27. Estructura de los AOBs empleados en el estudio.....	48
Figura 1.28. LDA de Fisher. Efecto de elegir dos valores diferentes de w	51
Figura 1.29. Pantalla de la DSS (Decision Support System) v.3.0.1.....	54
Figura 1.30. Pestaña de visualización de datos del <i>Spectra Classifier</i>	55
Figura 1.31. Pestaña para la evaluación del clasificador desarrollado con el <i>Spectra Classifier</i>	56
Figura 3.1. Control de la sobreexpresión de caleosina y oleosina.....	68
Figura 3.2. Selección de las bandas de caleosina y oleosina.....	69
Figura 3.3. Ejemplo de cuantificación de las proteínas oleosina.....	70
Figura 3.4 . Esquema de la reacción que tiene lugar en el primer paso para la activación de la matriz sólida.....	74
Figura 3.5. Formación de la sal Bunte.....	74
Figura 3.6. Esquema del resultado de la interacción de la sal Bunte con el DTT para formar un gel con un grupo tiol.....	75
Figura 3.7. Proceso de bloqueo de los grupos mercapto con los grupos tiopiridil.....	75
Figura 3.8. Esquema de la estructura del gel activado, listo para interaccionar con las gotículas lipídicas.....	76
Figura 3.9. Interacción entre la matriz activa y los AOBs.....	76
Figura 3.10. Ejemplo de ajuste del ángulo mágico a 6.000 Hz.....	81
Figura 3.11. Espectros superpuestos adquiridos a diferentes temperaturas para calcular la temperatura real de adquisición en el interior de la sonda.....	82
Figura 3.12. Rotores usados para HR-MAS y piezas de montaje.....	84
Figura 3.13. Ejemplos de vóxeles seleccionados siguiendo el criterio definido en las muestras de glioblastoma.....	90
Figura 4.1. Comparación entre espectros de células C6 adquiridos a 500 Hz (verde) y 15.000 Hz (negro) a día 4 y 7 de cultivo.....	98
Figura 4.2. Las regiones mostradas (entre 1,52-0,64 ppm y 3,38-2,87 ppm) de los espectros de HR-MAS adquiridos a 37 °C corresponden a células C6 de día 4 de cultivo.....	99

Figura 4.3. Efecto de la velocidad de giro en la visibilidad de varias resonancias de células C6 a días 4 y 7 de cultivo.....	102
Figura 4.4. La reversibilidad del patrón espectral de las células C6 fue comprobada adquiriendo un espectro de células C6 a 3.000 Hz al comienzo del experimento (negro) y un espectro adquirido a la misma velocidad al terminar los experimentos adquiridos a diferentes velocidades de giro (verde).....	103
Figura 4.5. Efecto de la velocidad de giro en la integridad celular.....	104
Figura 4.6. Distribución de frecuencias de tamaños y volúmenes de las AOB de oleosina	105
Figura 4.7. Distribución de frecuencias de tamaños y volúmenes de las AOB de caleosina	106
Figura 4.8. Imágenes adquiridas en microscopio confocal de AOBs antes (A) y después (B) de la adquisición por HR-MAS.....	107
Figura 4.9. Imágenes de AOBs de caleosina antes (A) y después (B) de la adquisición por HR-MAS. La barra blanca equivale a 200 nm en la imagen A y a 500 nm en la imagen B.....	107
Figura 4.10. Comparación entre el espectro de las gotículas lipídicas artificiales de oleosina (arriba) y de caleosina (abajo) adquiridas con HR-MAS girando a 3.000 Hz.....	108
Figura 4.11. Efecto de la velocidad de giro en la visibilidad de las señales de lípidos móviles provenientes de las gotículas lipídicas artificiales de oleosina y caleosina.....	109
Figura 4.12. Efecto de la velocidad de giro en la visibilidad de las señales de lípidos móviles provenientes de las gotículas lipídicas artificiales de oleosina y caleosina y de los controles lipídicos.....	110
Figura 4.13. En esta figura se muestran tres espectros adquiridos con HR-MAS a 37 °C y girando a 3.000 Hz.....	113
Figura 4.14. Se muestra la comparación en la detección de los ML a 0,88 y 1,28 ppm entre la MA (azul) y la MI (gris) tras la interacción con los AOB de caleosina y oleosina.....	114
Figura 4.15. Imagen tomada por microscopía electrónica de barrido (Merlin FE-SEM) de la matriz activa (imágenes superiores) y la matriz inactiva (imágenes inferiores) tras interaccionar con las AOBs de oleosina.....	116
Figura 4.16. Efecto de la velocidad de giro en la detección de las señales de ML detectadas de las AOB inmovilizadas en la matriz sólida.....	117
Figura 4.17. Comparación de la velocidad de giro en la región de los ML (a 1,28 y	

0,88 ppm) para la muestra de matriz activa incubada con caleosina y tratada con DTT.....	119
Figura 4.18. Comparación de la velocidad de giro en la región de los ML a la máxima y la mínima velocidad estudiadas para la muestra de matriz activa incubada con caleosina y antes y después de tratar con DTT.....	120
Figura 4.19. Distribución de diámetros de los liposomas multilamelares.....	121
Figura 4.20. Liposomas multilamelares observados por microscopía confocal y electrónica.....	122
Figura 4.21. Liposomas multilamelares observados por microscopía confocal (izquierda) y microscopía electrónica (derecha).....	123
Figura 4.22. Efecto de la velocidad de giro en el patrón espectral de los liposomas multilamelares.....	124
Figura 4.23. Esquema de la dinámica de las gotículas lipídicas citosólicas que contienen TAG en células C6.....	130
Figura 4.24. Imagen tomada de Griffin y colaboradores donde se muestra el efecto de la velocidad de giro, temperatura e intensidad de campo en espectros de ¹ H de HR-MAS.....	131
Figura 4.25. Resultados de <i>Bootstrapping</i> y BER para el clasificador de GBM vs OD2 vs tejido no tumoral.....	134
Figura 4.26. Espectros promedio de los espectros no tumorales, de los GBM y los OD2.....	135
Figura 4.27. Imágenes nosológicas y de histopatología del grupo de test del clasificador de GBM vs OD2 vs tejido no tumoral.....	136
Figura 4.28. Distribución de errores y aciertos del grupo de entrenamiento (izquierda) y del grupo de test (derecha) del clasificador de GBM vs OD2 vs NT.....	137
Figura 4.29. Resultados de <i>Bootstrapping</i> y BER para el clasificador de GBM vs OD3 vs tejido no tumoral.....	139
Figura 4.30. Información sobre los <i>outlayers</i> del grupo de test del clasificador GBM vs OD3 vs NT.....	140
Figura 4.31. Imágenes nosológicas del grupo de test del clasificador de GBM vs OD2 vs NT.....	142
Figura 4.32. Espectros promedio de las zonas identificadas como no tumoral, OD3 o GBM de los ratones C432 y S784.....	143
Figura 4.33. Distribución de errores y aciertos del grupo de entrenamiento (izquierda) y del grupo de test (derecha) del clasificador de GBM vs OD3 vs NT.....	144
Figura 4.34. Resultados de <i>Bootstrapping</i> y BER para el clasificador de GBM vs	

OD2 vs OD3 vs NT.....	145
Figura 4.35. Zoom de los resultados del clasificador para el grupo de test para poder visualizar 3 los tres puntos que se alejan más del centro del clasificador.....	146
Figura 4.36. Imágenes nosológicas del grupo de test del clasificador GBM vs OD2 vs OD3 vs NT.....	147
Figura 4.37. Espectros promedio de las zonas identificadas como no tumoral, OD3 o GBM del ratón C432.....	148
Figura 4.38. Distribución de errores y aciertos del grupo de entrenamiento (izquierda) y del grupo de test (derecha) del clasificador de GBM vs OD2 vs OD3 vs NT.....	148
Figura 4.39. Resultados de <i>Bootstrapping</i> y BER para el clasificador de OD2 vs OD3 vs NT.....	149
Figura 4.40. Espectros promedio de los espectros no tumorales, de los GBM y los OD2.....	150
Figura 4.41. Imágenes nosológicas del grupo de test del clasificador OD2 vs OD3 vs NT.....	151
Figura 4.42. Distribución de errores y aciertos del grupo de entrenamiento (izquierda) y del grupo de test (derecha) del clasificador de GBM vs OD2 vs OD3 vs NT.....	152

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales resonancias de metabolitos detectables por ERM de ¹ H <i>in vivo</i> a 1,5 T en parénquima cerebral humano normal y/ patológico.....	22
Tabla 3.1. Composición del gel de separación al 12,5 de acrilamida.....	64
Tabla 3.2. Composición del gel de empaquetamiento al 4,75 % de acrilamida....	64
Tabla 3.3. Relación de ecuaciones para el ajuste de la temperatura en función a la velocidad de giro.....	83
Tabla 3.4. Distribución de los ratones en el grupo de entrenamiento o test incluidos en el clasificador de GBM, OD2 y NT.....	92
Tabla 3.5. Distribución de los ratones en el grupo de entrenamiento o test incluidos en el clasificador de GBM, OD3 y NT.....	93
Tabla 3.6. Distribución de los ratones en el grupo de entrenamiento o test incluidos en el clasificador de GBM, OD2, OD3 y NT.....	94
Tabla 3.7. Distribución de los ratones en el grupo de entrenamiento o test incluidos en el clasificador de OD2, OD3 y NT.....	95
Tabla 4.1. Cambio en el área de los ML para las células de día 4 (n=3) y día 7 (n=4) de cultivo variando la velocidad de giro entre 500 y 15.000 Hz.....	101
Tabla 4.2. Cambio en las áreas de los ML a 0,88 y 1,28 ppm para las AOBs de caleosina (n=3).....	111
Tabla 4.3. Cambio en las áreas de los ML a 0,88 y 1,28 ppm para las AOBs de oleosina (n=4).....	112
Tabla 4.4. Diferencias en la detección de ML entre la MA y la MI.....	115
Tabla 4.5. Cambio en las áreas de los ML a 0,88 y 1,28 ppm para las AOBs de caleosina inmovilizadas en la matriz sólida.....	117
Tabla 4.6. Cambio en las áreas de los ML a 0,88 y 1,28 ppm para las AOBs de oleosina inmovilizadas en la matriz sólida.....	118
Tabla 4.7. Comparación de la velocidad de giro en la región de los ML (a 1,28 y 0,88 ppm) para la muestra de matriz activa incubada con caleosina y tratada con DTT.....	119
Tabla 4.8. Cambio en las áreas de los ML a 0,88 y 1,28 ppm y la fosfatidilcolina a 3,25 ppm para los liposomas multilamelares	124

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1.1. Frecuencia de precesión.....	8
Ecuación 1.2. Transformada de Fourier.....	10
Ecuación 1.3. Desplazamiento químico (δ).....	11
Ecuación 1.4. Relajación longitudinal.....	15
Ecuación 1.5. Relajación transversal.....	16
Ecuación 1.6. Relación señal/ruido.....	17
Ecuación 1.7. El ángulo mágico.....	19
Ecuación 3.1. Ecuación empleada para calibrar la temperatura real a la que se encuentra la muestra girando en la sonda de HR-MAS.....	82
Ecuación 3.2. Normalización por <i>unit length</i> , donde I_{norm} es la intensidad normalizada para cada punto del espectro e I_{real} es la intensidad inicial para cada punto entre 0 y 4,5 ppm.....	87
Ecuación 3.3. <i>Balanced error rate</i>	96

ABREVIATURAS

ACAT	Acil-CoA:colesterol aciltransferasa
ACC	AcetilCoA carboxilasa
ACSF	<i>Artificial cerebrospinal fluid</i>
AG	Ácidos grasos
AOB	<i>Artificial oil bodies</i>
ALD	Análisis discriminante lineal
AMARES	<i>Advanced method for accurate, robust, and efficient spectral fitting</i>
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
ASCII	<i>American Standard Code for Information Interchange</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
au	<i>Arbitrary units</i>
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
BER	<i>Balanced error rate</i>
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCC	<i>Correctly classified cases</i>
CCT	CTP:fosfolina citidiltransferasa
ChCCp	<i>Choline containing compounds</i>
CP-MAS	<i>Cross polarized magic angle spinning</i>
CSI	<i>Chemical shift imaging</i>
DAG	Diacilglicerol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DSS	<i>Decision Support System</i>
DTT	Ditiotreitol
EA	<i>Earlich ascites</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	<i>Endothelial growth factor receptor</i>
ERM	Espectroscopía de resonancia magnética
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FASTMAP	<i>Fast automatic shimming technique by mapping along projections</i>
FID	<i>Free induction decay</i>
FOV	<i>Field of view</i>
FS	<i>Feature selection</i>
GABRMN	<i>Grup d'Aplicacions de la Ressonancia Magnetica Nuclear</i>

Abreviaturas

GBM	Glioblastoma
GEM	<i>Genetically engineered mice</i>
GPC	Glicerofosfolina
G3P	Glicerol-3-fosfato
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HR-MAS	<i>High resolution magic angle spinning</i>
HSB	<i>Hue, Saturation, Brightness</i>
IERM	Imagen por espectroscopía de resonancia magnética
IRM	Imagen de resonancia magnética
I.P.	Intraperitoneal
IPTG	<i>Isopropyl-β-D-Thiogalactoside</i>
jMRUI	<i>java Magnetic Resonance Users Interface</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LOO	<i>Leave one out</i>
MA	Matriz active
MI	Matriz inactive
ML	<i>Mobile lipids</i>
MTX	Matriz
MV	Multivóxel
NEX	<i>Number of excitations</i>
NS	<i>Number of slices</i>
OA	Oligoastrocitoma
OD2	Oligodendroglioma grado II
OD3	Oligodendroglioma grado III
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCA	<i>Principal components analysis</i>
PC-plc	Fosfolipasa C específica para PdtCho
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PL	<i>Phospholipids</i>
pla2	Fosfolipasa A2
pId	Fosfolipasa D
ppm	Partes por millón
PRESS	<i>Point resolved spectroscopy</i>
PtdCho	<i>Phosphatidylcholine</i>

Abreviaturas

p/v	Relación peso volume
RARE	<i>Rapid acquisition with refocused echoes</i>
RF	Radiofrecuencia
RM	Resonancia magnética
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
rpm	Revoluciones por minute
RPMI	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFFS	<i>Sequential forward feature selection</i>
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SNR	<i>Signal to noise ratio</i>
spv	<i>Spectral vector</i>
ST	<i>Slice thickness</i>
sw	<i>Spectral width</i>
TAC	Tomografía axial computerizada
TAG	Triacilglicéridos
TAT	<i>Total acquisition time</i>
TD	<i>Time domain</i>
TE	Tiempo de eco
TEC	Tiempo de eco corto
TEMED	Tetrametiletilediamina
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TMS	Tetrametilsilano
TR	Tiempo de reciclaje
VAPOR	<i>Variable pulse power and optimized relaxation delays</i>
VOI	<i>Volume of interest</i>
v/v	Relación volumen/volume
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tumores cerebrales

1.1.1. Epidemiología, clasificación y etiología

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) abarcan menos de un 2 % del total de casos de cáncer diagnosticados cada año a nivel mundial (aproximadamente 175.000) representado entre 0,4 y 25,4 de casos por 100.000 adultos (figura 1.1). A pesar de ello, constituyen una fuente importante de mortalidad y discapacidad.

De todos los tumores intracraneales primarios, la mayoría (60 %) están originados por células de tipo glial; el 28 % derivan de células tipo meningeal y un 7,5 % tienen su origen en los nervios espinales y craneales, es decir, del sistema nervioso periférico (SNP) [1]. Los linfomas y tumores de líneas germinales constituyen aproximadamente un 4 % y un 1 % del total, respectivamente. La Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, WHO) clasifica los tumores del sistema nervioso en diferentes grados de malignidad basándose en cuatro criterios histopatológicos (atipia nuclear, actividad mitótica, hiperplasia endotelial y necrosis) y en datos de supervivencia, correspondientes a las entidades tumorales y a los pacientes respectivamente [2, 3]. En el Anexo 7.1 [4] se muestra la clasificación de los tumores del SNC. Todo esto se combina dando como resultado una escala de cuatro grados de malignidad, que conforman el sistema de clasificación clínica más aceptada actualmente:

- GRADO I: Tumores con bajo potencial proliferativo, naturaleza difusa y posibilidad de cura mediante resección quirúrgica (Ejemplo: astrocitoma pilocítico).
- GRADO II: Tumores infiltrantes con bajo índice mitótico pero con potencial de recidiva. Algunos tienden a progresar hacia lesiones de alto grado (Ejemplo: astrocitomas bien diferenciados, oligodendrogliomas (ODG) y ependimomas).
- GRADO III: Tumores de alto grado con evidencia histológica de malignidad generalmente en forma de actividad mitótica elevada, clara expresión de capacidad infiltrativa y anaplasia (Ejemplo: astrocitoma anaplásico)

Introducción

- GRADO IV: Tumores de alto grado con elevada actividad mitótica, necrosis y rápida evolución pre y post operatoria (Ejemplo: glioblastoma).

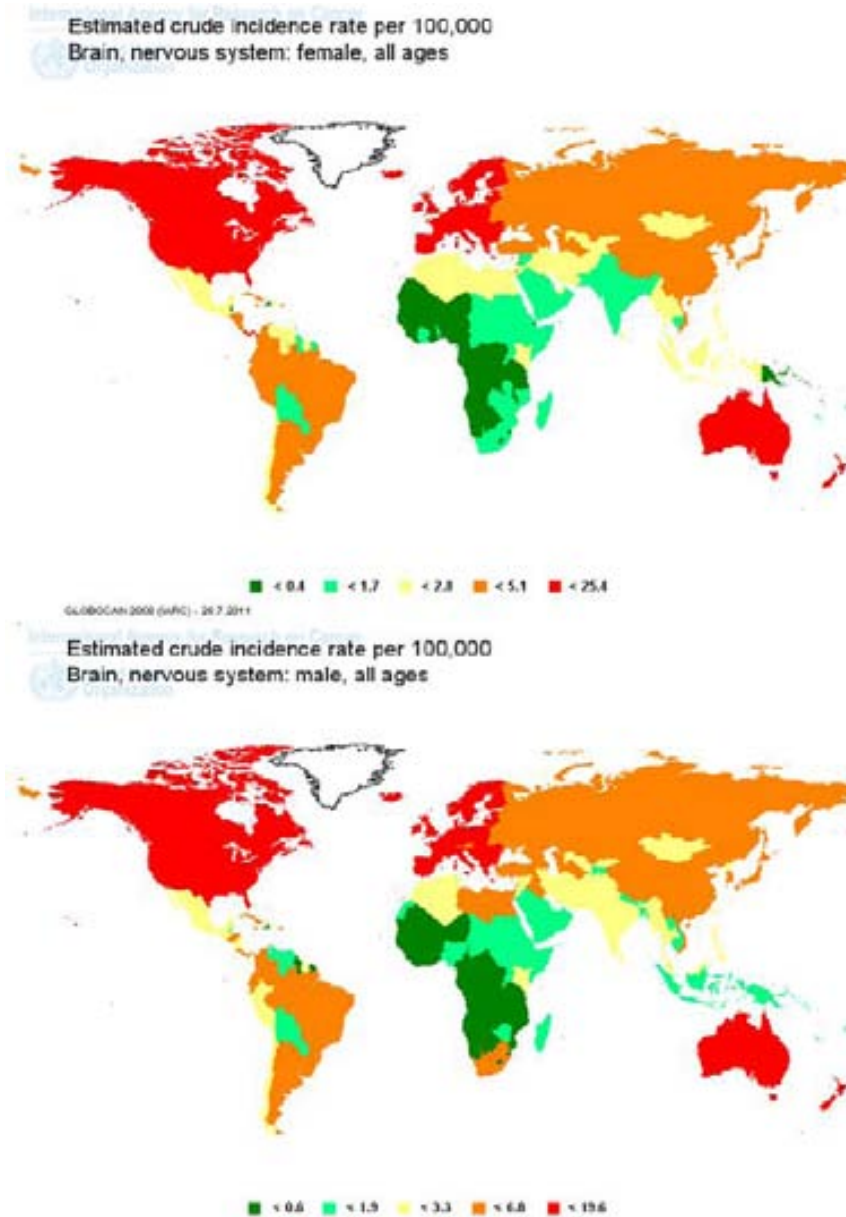


Figura 1.1. Tasa de incidencia de los tumores cerebrales en mujeres (parte superior) y hombres (parte inferior) a nivel mundial por GLOBOCAN [5].

Los gliomas son tumores originados por células de la estirpe glial y se clasifican en diferentes grupos según el tipo celular concreto que los origina, y su grado, siendo los principales grupos Astrocitomas (conteniendo principalmente células de tipo astrocitario), Oligodendrogliomas (ODGs, conteniendo principalmente células de tipo oligodendrocítico) y Oligoastrocitomas (OAs, con contenido mixto de células de tipo

astrocitario y/o oligodendrocítico). Los astrocitomas constituyen la mayor parte de los gliomas y se dividen en astrocitoma pilocítico (grado I), astrocitomas difusos de bajo grado (grado II) y astrocitomas anaplásicos (grado III). Los astrocitomas pilocíticos son tumores de crecimiento lento con pronóstico favorable y tasas de supervivencia superiores a cinco años en más del 85 % de los casos. Los astrocitomas de grado II, sin embargo, no pueden ser reseccionados quirúrgicamente en su totalidad ya que son altamente infiltrantes y tienden a evolucionar a estadios más agresivos (grado III) siendo la tasa de supervivencia mayor o igual a 5 años del 60 %. Por otro lado, los ODG se clasifican en ODG de bajo grado (II) y ODG anaplásicos (III). Los oligodendrogliomas crecen lentamente y pueden desarrollarse durante años antes de ser diagnosticados, mientras que los astrocitomas suelen presentar un crecimiento más agresivo. La incidencia de los oligoastrocitomas puede variar de un 1,8 a un 19 % del total de gliomas, porque el diagnóstico varía según los diferentes laboratorios de análisis y muchas veces son considerados bien como ODGs o bien como astrocitomas. Su pronóstico y tendencia a la malignización dependen de las proporciones de los distintos tipos celulares que los constituyen.

Cualquiera de los tres tipos principales de glioma puede transformarse en glioblastoma multiforme (GBM, grado IV) [2]. El GBM es el tumor maligno primario más frecuente en el SNC: es muy resistente a la quimio y radioterapia y sólo un 3 % de los pacientes afectados sobrevive más de tres años, siendo la supervivencia media de 90 días [6, 7]. Entre sus características histopatológicas cabe destacar: atipia nuclear, pleomorfismo celular, trombosis vascular, proliferación microvascular y necrosis.

Un caso particular dentro de los tumores del SNC son las metástasis, ya que no son tumores primarios sino que proceden de neoplasmas originados en otros tejidos, en su mayoría carcinomas de pulmón o mama. Algunos se originan a partir de melanomas, coriocarcinomas y carcinomas de células claras de riñón [4].

La etiología de los tumores del SNC no está clara todavía. No se han descrito factores ambientales y/o estilos de vida concretos como causas directas de dicha enfermedad, a excepción de síndromes hereditarios como por ejemplo neurofibromatosis tipo 1 y 2, síndrome de von Hippel-Lindau, esclerosis tuberosa y síndromes de Li-Fraumeni y Turcot [2].

1.1.2. Diagnóstico

Los síntomas más comunes entre los pacientes de tumor cerebral suelen ser: dolor de cabeza, mareos, cambios cognitivos no específicos o signos neurológicos focales, dependiendo de la localización, tamaño y tasa de proliferación del tumor. El diagnóstico debe permitir distinguir estos casos de otras patologías que pueden presentar síntomas similares, como por ejemplo hematomas subdurales, abscesos cerebrales, hidrocefalia, esclerosis múltiple, malformaciones vasculares, infartos cerebrales y otros. Muchas de estas patologías presentan características radiológicas que permiten diferenciarlas de los tumores, por lo que las herramientas más utilizadas en el diagnóstico de dicha patología son la tomografía axial computerizada (TAC) y la imagen por resonancia magnética (IRM). Sin embargo, una de las limitaciones más importantes de estas herramientas no invasivas es la dificultad para distinguir los tumores del SNC de algunas otras patologías, como abscesos o enfermedades desmielinizantes, que precisan un estudio más detallado y que, en muchos casos, terminan requiriendo una biopsia del tejido anómalo (figura 1.2).

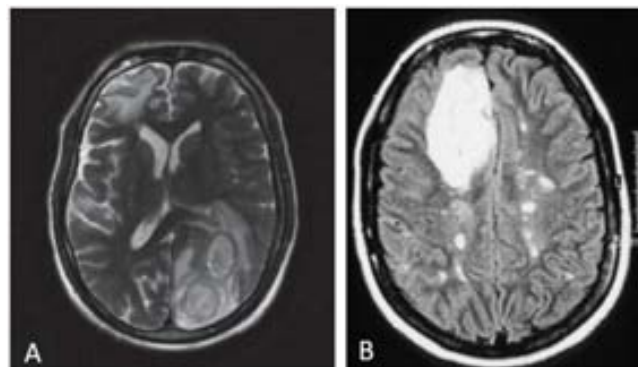


Figura 1.2. En A puede verse una imagen de RM ponderada en T_2 y adquirida en el plano axial de un paciente afectado por una lesión hiperintensa en la región occipito-parietal del cerebro. Aparentemente dicha lesión podría confundirse con una metástasis, a pesar de que resultó ser un absceso piogénico [8]. La imagen B muestra un corte axial adquirido con el método FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*), similar a una ponderación en T_2 , en un paciente afectado por esclerosis múltiple. La gran masa en el lóbulo frontal derecho muestra características de intensidad y homogeneidad similares a las lesiones pequeñas centrales (placas de esclerosis múltiple) lo cual, unido al historial del paciente, podría sugerir que se trata de una placa de tamaño anormalmente grande. Sin embargo una biopsia estereotáctica demostró que la lesión frontal era un OA de grado II, a pesar de lo poco habitual que es la concurrencia de ambas patologías [9].

La IRM es la técnica estándar utilizada en el diagnóstico de tumores cerebrales, ya que presenta numerosas ventajas respecto al TAC y otras técnicas de neuroimagen. Por ejemplo, las imágenes adquiridas por RM presentan un cociente señal/ruido muy elevado que permite distinguir de manera eficaz entre las estructuras normales propias del SNC y también diferenciar entre tejido normal y anómalo.

Un estudio rutinario de una masa cerebral anómala por IRM (ver sección 1.2 para un resumen de los principios básicos de la IRM) se compone de imágenes ponderadas en T_2 (TR y TE largos) (T_{2w}), imágenes ponderadas en T_1 (TR y TE cortos) (T_{1w}) y secuencias FLAIR (TR largo y TE variable), que atenúan la señal del líquido cefalorraquídeo que puede dar lugar a confusión en imágenes T_{2w} . La detección, caracterización y delimitación precisa de las lesiones requiere la obtención de un buen contraste entre tejido tumoral y tejido circundante. Por ello, la administración de agentes de contraste durante los estudios por IRM constituye un método coadyuvante de diagnóstico establecido en los centros clínicos. Este tipo de compuestos acentúan la diferencia de intensidad de señal entre los tumores y el tejido normal, alcanzando el espacio extracelular del tejido a través de lesiones en la barrera hematoencefálica (BHE) [10]. El grado de contraste alcanzado dependerá de la integridad de la BHE, la concentración intravascular de agente de contraste y de sus propiedades magnéticas, la vascularización de la lesión (perfusión) y del flujo sanguíneo, entre otros factores.

Actualmente existen muchos agentes de contraste aplicables a la detección de tumores cerebrales, siendo los más utilizados aquellos cuya composición base es el gadolinio, y que se denominan agentes de contraste de primera generación. Éstos sólo cruzan la BHE en caso de lesión o rotura, por lo que normalmente no son captados por tumores de bajo grado [11]. Los GBM sí que presentan normalmente rotura de BHE y aparecen como nódulos hipointensos en su centro necrótico que captan el contraste de manera irregular (normalmente siguiendo un patrón en forma de anillo hiperintenso que bordea los límites de la masa) al estudiarlos con secuencias ponderadas en T_1 post-administración de contraste [12]. El problema principal de este sistema de diagnóstico es que entre un 9 y un 37,5 % de los gliomas de alto grado (astrocitomas de grado III, oligodendrogliomas de grado III y glioblastomas) no muestran captación de contraste y un 34-50 % de los gliomas de bajo grado (oligodendrogliomas de grado II, oligoastrocitomas de grado II y oligoastrocitomas) sí captan contraste, por lo que en esos casos un diagnóstico limitado únicamente a los resultados obtenidos mediante el contraste por IRM resultaría erróneo [13]. Existe una segunda generación de agentes de contraste que difiere de la anterior en la concentración de gadolinio y en las propiedades de relajatividad. Además se están sintetizando nuevos agentes para

mejorar la detección, seguimiento y estudio de respuesta a terapia de este tipo de lesiones [14].

Además de las secuencias de IRM clásicas (T_{1w} , T_{2w} , T_{1w} post contraste) existen técnicas de imagen avanzadas como por ejemplo la de difusión, la imagen funcional y la angiografía dentro del protocolo de diagnóstico de tumores cerebrales para valorar con mayor precisión la extensión de la lesión y sus características vasculares [15].

En resumen, puede decirse que el diagnóstico no invasivo de un tumor cerebral comprende diferentes etapas, siendo la última de ellas la orientación radiológica del grado y tipo de la lesión. El primer paso es la detección, que normalmente se lleva a cabo mediante las imágenes ponderadas en T_2 , ya que los tumores aparecen como masa hiperintensa respecto al parénquima cerebral normal. Las secuencias T_1 con contraste producirán diferentes tipos de imagen dependiendo de la vascularización del tumor y de la integridad de la BHE. A continuación se evalúa el impacto de la lesión en el resto del encéfalo así como en los ventrículos y se determina con la mayor precisión posible la localización espacial del tumor y su extensión. Es importante analizar si las estructuras vasculares propias del cerebro, como la arteria carótida o la arteria cerebral media se ven afectadas por la masa. Finalmente se procede a determinar el tipo y grado de la lesión, si es primaria o metastásica, benigna o maligna, con el fin de aplicar el tratamiento más adecuado según el caso. Normalmente la confirmación del diagnóstico se realiza a partir de un análisis histopatológico de una biopsia del tejido anómalo, bien sea estereotáctica o parte de una resección quirúrgica. Esto conlleva riesgos tanto a nivel de mortalidad/morbilidad del paciente [16, 17] como de diagnóstico, ya que se puede subestimar el grado del tumor dependiendo de la zona de la que se haya extraído la biopsia [18]. En resumen, disponer de herramientas eficaces de diagnóstico no invasivo es de relevancia para mejorar en lo posible el enfoque terapéutico de este tipo de lesiones. En este sentido la evaluación de la metabólica tumoral detectada mediante espectroscopía de RMN puede contribuir a una mejora de la precisión diagnóstica [19].

1.2 Introducción a la espectroscopía de RMN de muestras biológicas

El fenómeno de la resonancia magnética nuclear (RMN) se describió por primera vez en 1938 por Isador Rabi [20]. Pero no fue hasta 1946 que se aplicó esta técnica para realizar estudios *in vitro* por parte de dos grupos independientes liderados por Edward Mills Purcell [21] y Félix Bloch [22]. En la década de los 70 se describió por primera vez una de las aplicaciones más conocidas de la RMN, la imagen de RMN (IRM) de la mano de Lauterbour [23] y Mansfield [24].

1.2.1 Conceptos básicos

La resonancia magnética nuclear es una técnica que se basa en la propiedad de ciertos núcleos atómicos, como el protón (núcleo de hidrógeno) llamada espín, que poseen aquellos núcleos cuyo número cuántico de espín es distinto de cero ($I \neq 0$) [25, 26]. Esta propiedad confiere a dichos núcleos un momento magnético, que permite adoptar diferentes orientaciones (M_I) cuando se somete una muestra de esos núcleos a un campo magnético estable (B_0). En el caso del núcleo de ^1H , en el que se han centrado los experimentos realizados en esta tesis, $I=1/2$, se pueden encontrar dos orientaciones: $M_I=1/2$ y $M_I=-1/2$ (figura 1.3.) con estados energéticos diferentes. La alineación “paralela” corresponderá al estado de menor energía y la alineación “antiparalela” estará asociada a un estado de mayor energía.

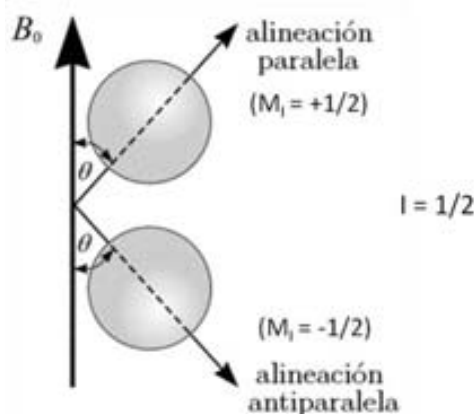


Figura 1.3. Efecto en la orientación del momento magnético de un núcleo atómico con un número cuántico (I) de $1/2$ sometido a un campo magnético (B_0). Los núcleos se dividirán en dos grupos: unos que se alinean de forma “paralela” a B_0 y otros que adquieren una alineación “antiparalela”. Imagen tomada de [26].

En un estado de equilibrio, los núcleos se distribuirán de forma que habrá un exceso poblacional en el estado menos energético. La intensidad del campo magnético B_0 afectará, por tanto, de forma directa a la diferencia energética entre ambas poblaciones, aumentando la separación entre ambas (figura 1.4).

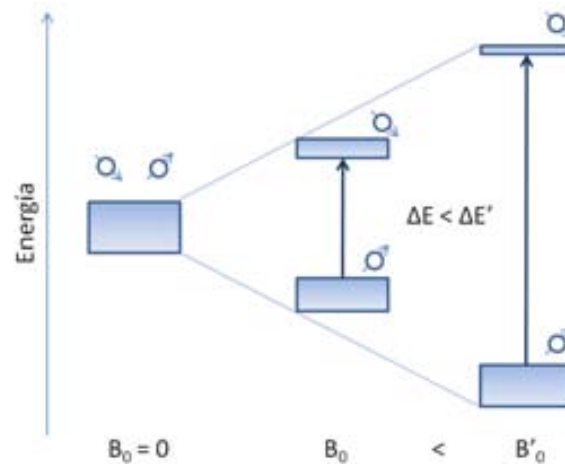


Figura 1.4. Efecto de la intensidad del campo magnético sobre las poblaciones de núcleos investigados. Cuanto mayor sea la intensidad del campo magnético a la que sea sometida una muestra con momento magnético, mayor será la diferencia energética y de población entre las orientaciones “paralela” y “antiparalela”.

La existencia de este exceso en la población con orientación “paralela” al campo magnético da lugar a que podamos decir que la muestra tiene una magnetización neta M_0 , que en estado de equilibrio tendrá el mismo sentido que B_0 .

Debe tenerse en cuenta que B_0 , aparte de orientar los momentos magnéticos de los núcleos de una muestra sensible al B_0 , también lleva al momento magnético de dichos núcleos a realizar un movimiento de giro alrededor de ese B_0 conocido como precesión de Larmor. La frecuencia (ν) o velocidad angular (ω) a la que se produce este movimiento de rotación se describe según la fórmula:

$$\omega_0 = -\gamma B_0 \quad \text{Ec1.1}$$

Donde la frecuencia de precesión (ν) o velocidad angular ($\omega_0=2\pi\nu$) a la que se produce la precesión de Larmor, está relacionada de forma directa con la constante giromagnética (γ) que viene definida por el tipo de núcleo y por el campo magnético B_0 .

Si a una muestra sometida a un campo magnético se le aplica un pulso de radiofrecuencia a la frecuencia adecuada (la frecuencia de Larmor o de resonancia), se inducirán tránsitos espectroscópicos entre las dos poblaciones de núcleos, de forma que la magnetización neta de la muestra pasará a tener una dirección y sentido diferentes a B_0 (figura 1.5). Esta radiofrecuencia supone una perturbación en el sistema, de forma que deja de estar en equilibrio al desplazarse M_0 , lo que conlleva la aparición de una componente transversal $M_{xy}=M_0 \cdot \text{sen}\theta$, donde θ es el ángulo de desviación de M_0 respecto al eje Z.

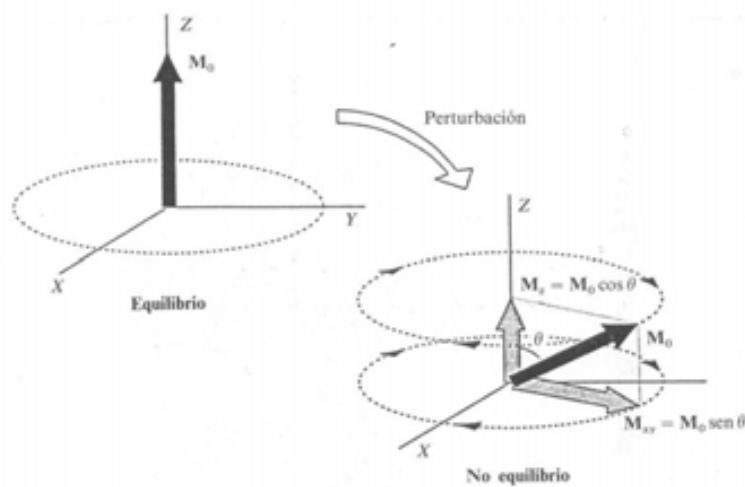


Figura 1.5. Efecto de un pulso de radiofrecuencia (perturbación) sobre el estado de equilibrio de una muestra sometida a un B_0 (orientado en dirección Z). Esta perturbación en el sistema produce el desplazamiento de la M_0 de la muestra, de forma que vendrá definida por una componente transversal ($M_{xy}=M_0 \cdot \text{sen}\theta$) y una componente longitudinal ($M_z=M_0 \cdot \text{cos}\theta$). Imagen tomada de [26].

Es esta componente transversal (M_{xy}) que gira en torno a B_0 a la frecuencia aproximada de Larmor de la muestra, la que induce una corriente alterna, que contiene todas las frecuencias individuales de los núcleos de la muestra que han absorbido energía a dicha frecuencia de resonancia de Larmor, en una bobina de detección ubicada en el plano XY. A lo largo del tiempo, la M_0 volverá progresivamente a su estado de equilibrio por lo que la intensidad de la señal se irá reduciendo (figura 1.6).

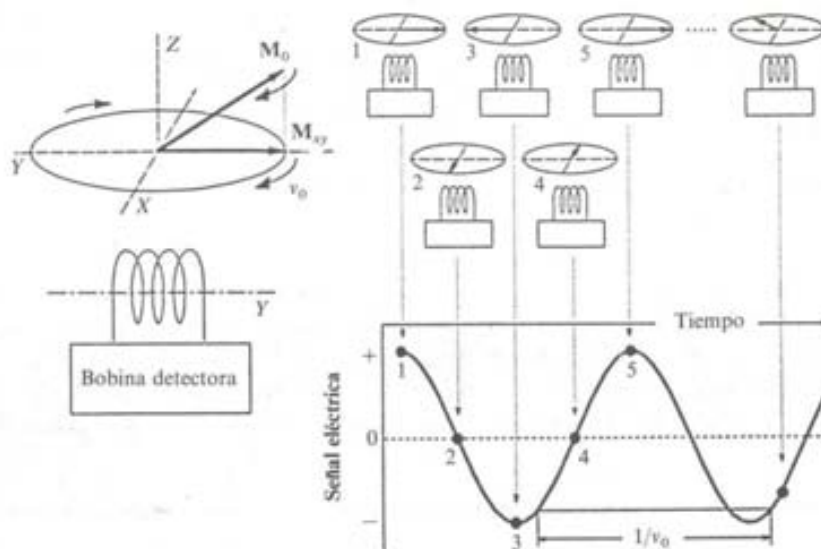


Figura 1.6. Detección de la señal de RMN. La precesión de la componente transversal de la magnetización neta induce una corriente eléctrica en una bobina situada en el plano XY, que es la señal de RMN. Imagen tomada de [26]

La intensidad de la señal generada decrece exponencialmente con el tiempo y se conoce como FID (*free induction decay*). Esta señal en el dominio del tiempo, se procesa con un método matemático denominado Transformada de Fourier (ecuación 1.2), para obtener un espectro de señales en el dominio de las frecuencias de resonancia (figura 1.7).

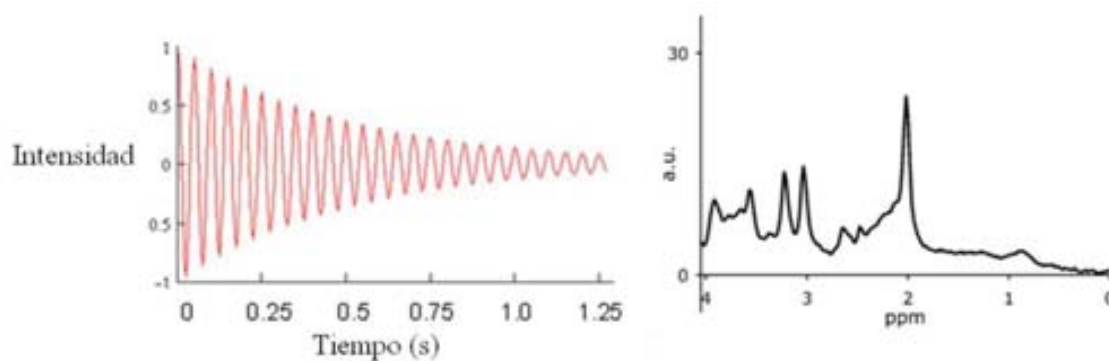


Figura 1.7. A la izquierda se muestra la señal en forma de FID y a la derecha el espectro de señales en el dominio de las frecuencias de resonancia tras aplicar la Transformada de Fourier.

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{i\omega t} dt \tag{Ec1.2}$$

Donde $F(\omega)$ es la señal de RMN en el dominio de la frecuencia y $e^{i\omega t} = \cos(\omega t) + i \cdot \sin(\omega t)$, siendo i el número imaginario $\sqrt{-1}$.

Dicho espectro contiene valiosa información química o metabólica de la muestra que se esté estudiando.

1.2.2 Parámetros espectrales

Los parámetros esenciales para interpretar la información contenida en un espectro de RMN obtenido como se ha descrito anteriormente son los siguientes:

- Desplazamiento químico

El desplazamiento químico (δ) nos permite usar la RMN no sólo para distinguir diferentes moléculas, sino también para distinguir átomos individuales dentro de una misma molécula. Cada núcleo tiene una frecuencia de resonancia característica que depende del campo magnético al que se realiza el experimento y, sobre todo, de su entorno electrónico en la molécula considerada, que determina su posición en el espectro. Para hacer comparables espectros obtenidos a diferentes campos magnéticos, el δ se expresa en partes por millón (ppm), que se calculan como se describe en la ecuación 1.3,

$$\delta = \frac{v_s - v_R}{v_R} \times 10^6 \quad \text{Ec 1.3}$$

Siendo V_s la frecuencia de resonancia del núcleo de interés (Hz) y V_R es la frecuencia del núcleo elegido como referencia.

El cálculo de la escala en ppm permite que los espectros de una misma muestra sean comparables entre sí independientemente del campo magnético del aparato donde hayan sido adquiridos. El δ depende de varios factores, pero principalmente depende del tipo de núcleo, del entorno químico en el que se encuentre dicho núcleo, del medio en que se encuentra y de los centros paramagnéticos cercanos al núcleo. En la figura 1.8 se muestran las regiones en las que suelen resonar algunos grupos químicos de un espectro de protón. En esencia, cuanto más “apantallado” esté un núcleo por los electrones que lo rodean, más bajos serán sus valores de ppm en las gráficas habituales.

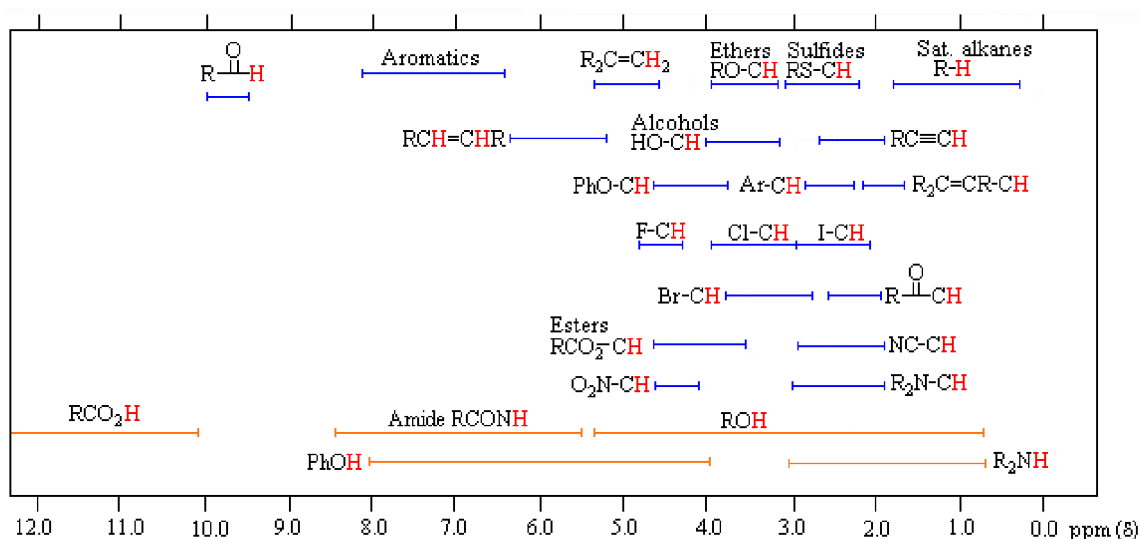


Figura 1.8. Principales desplazamientos químicos para el protón asociado a diferentes grupos funcionales (tomado del departamento de química de la Universidad de Michigan [27]).

- Área y anchura de la resonancia

El área de la resonancia se puede medir por integración, aunque a veces se sustituye por aproximaciones relativas mediante mediciones de las alturas de las resonancias de interés. Ambas están relacionadas directamente con la concentración de núcleos que originan dicha resonancia, sin embargo no es correcto comparar variaciones de alturas de resonancias distintas caso de que su anchura no sea comparable. Dicha anchura de la resonancia a la mitad de su altura depende tanto de las condiciones instrumentales de la adquisición del espectro como de las características intrínsecas de la molécula detectada y su entorno concreto (ver el apartado de la relajación transversal más adelante). Así, cuanto más estrecha la resonancia, mejor es la calidad de la adquisición. Este parámetro se puede optimizar experimentalmente, pero existen factores como la temperatura, el campo magnético y la relajación transversal, que provocan que distintas resonancias procedentes de la misma muestra puedan tener anchuras de banda distintas. En el caso de experimentos en los que la anchura de la resonancia puede considerarse constante, cambios en la altura de las resonancias pueden considerarse proporcionales a cambios de área y, por tanto, de concentración.

- Multiplicidad de la resonancia

Es el resultado de la interacción de un núcleo con los núcleos vecinos a través del enlace covalente. Esta interacción produce un desdoblamiento de la resonancia

principal que da lugar a un patrón característico. Los factores que determinan la multiplicidad de una resonancia son los siguientes:

-Acoplamiento con núcleos del mismo tipo (homonuclear): cuando en la molécula existe un núcleo con momento magnético nuclear que interacciona con otro núcleo vecino (normalmente a 1-3 enlaces de distancia) que también posea momento magnético nuclear, las resonancias de RMN que se obtienen de uno y otro suelen aparecer desdobladas como consecuencia de la interacción espín-espín. Se define como constante de acoplamiento (J) la distancia que separa en Hz las resonancias desdobladas en cada una de las resonancias acopladas (figura 1.9).

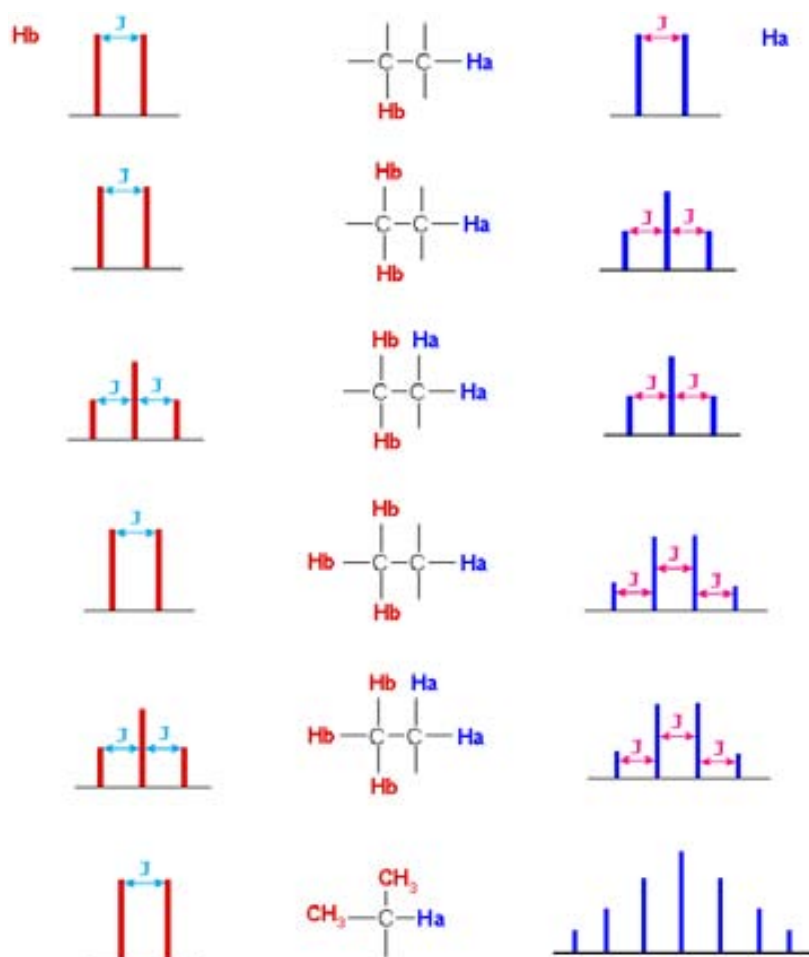


Figura 1.9. Multiplicidades características de los grupos alquilo más comunes. En la columna central se muestran diferentes grupos alquilo, donde se marcan en azul (Hb) o rojo (Ha) los protones unidos a diferentes carbonos pero que por proximidad (3 enlaces) van a dar lugar a multiplicidades. En la columna de la izquierda se muestran las señales que corresponderían a los protones Hb (rojo) y en la columna de la derecha se muestran las resonancias que corresponderían a los protones Hz (azul), siendo J la distancia (en Hz) entre las resonancias

Introducción

desdobladas. Los protones magnéticamente equivalentes (que resuenan a la misma frecuencia) no se acoplan entre sí. Tomado de [28].

-Acoplamiento de diferentes núcleos (heteronuclear): El mismo efecto que tiene lugar debido a núcleos del mismo tipo puede producirse por el acoplamiento a un núcleo de otro tipo, como por ejemplo el acoplamiento del ^1H con ^{13}C .

-Desacoplamiento: en algunos casos puede resultar interesante eliminar algunas resonancias del espectro acoplado para simplificarlo. Esto se consigue saturando una resonancia, es decir, irradiando selectivamente un núcleo de manera que se evita que se vea afectado en su equilibrio poblacional por el pulso de excitación posterior. Además, se pierde la interacción de los núcleos que generan esta señal con los núcleos que estén entrelazados covalentemente al mismo y, por tanto, se eliminan sus acoplamientos a través del enlace (o escalares).

-Simetría: la simetría de una molécula puede hacer que aparezcan en el espectro menos resonancias de las esperadas *a priori*, ya que algún elemento de simetría puede relacionar átomos diferentes dentro de la misma molécula, convirtiéndolos en químicamente y magnéticamente equivalentes y hacer desaparecer por tanto la multiplicidad debida a su acoplamiento.

- Tiempos de relajación T_1 y T_2

La señal detectable de RMN después de un pulso de excitación disminuye conforme el sistema va recuperando su estado de equilibrio mediante el proceso de relajación transversal caracterizado por la constante de tiempo de relajación longitudinal o T_1 y relajación transversal o T_2 .

La relajación longitudinal por otra parte hace referencia al aumento paulatino de la magnetización longitudinal detectable (M_2) después de un pulso de excitación (Ec1.4) y está caracterizada por la constante de tiempo T_1 , que mide el tiempo que tarda el sistema en recuperar el 63,2 % de la magnetización longitudinal inicial (M_0) tras la aplicación de un pulso de 90° o el 26,4 % de ese valor tras la aplicación de un pulso de 180° . La relajación longitudinal está relacionada con el intercambio de energía entre los espines nucleares y su entorno molecular.

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad \text{Ec1.4}$$

Es importante tener presente el parámetro T_1 en el diseño experimental, ya que si se vuelve a adquirir un espectro sin permitir la recuperación total de la magnetización, se produce una atenuación artefactual de la señal. Por lo tanto, es necesario esperar entre dos pulsos un tiempo mínimo de $3 \times T_1$, cosa que permite la recuperación del 95 % de M_z o bien aplicar correcciones adecuadas teniendo en cuenta los valores de T_1 de los núcleos considerados.

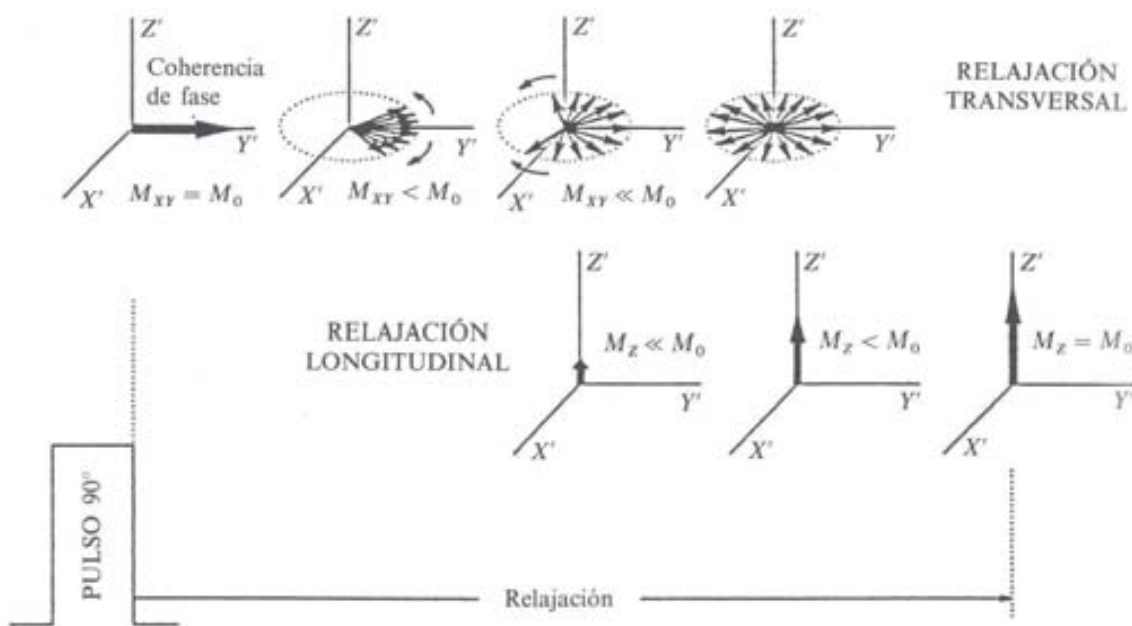


Figura 1.10. Relajación transversal (T_2) y longitudinal (T_1). La componente del vector de magnetización M que es perpendicular al campo magnético principal B_0 es llamada magnetización transversal (M_{xy}). El conjunto de procesos mediante los que decae hasta prácticamente cero, por ejemplo tras un giro de 90° en el que su valor se hace máximo, es llamado relajación transversal o relajación espín-espín, y se caracteriza por una constante de tiempo T_2 . La componente del vector de magnetización M que es paralela al campo magnético principal B_0 es llamada magnetización longitudinal (M_z). El conjunto de procesos mediante los que se recupera a la magnetización en equilibrio térmico M_0 , es llamado relajación longitudinal o relajación espín-red, y se caracteriza por una constante de tiempo T_1 . Imagen tomada de [26]

La relajación transversal es el proceso que describe la pérdida de coherencia de fase de la componente transversal (M_{xy}) de la magnetización M_0 , siendo T_2 la

constante que indica el tiempo que tarda el sistema en perder el 63,2 % de la magnetización transversal inicial y es característico de cada sistema de espín (Ec1.5).

$$\frac{dM_{xy}}{dt} = -\frac{M_{xy}}{T_2} \quad \text{Ec1.5}$$

El T_2 está relacionado con la anchura de las resonancias de un espectro, de forma que cuanto menor sea la anchura de una resonancia, mayor será la constante de tiempo T_2 del componente de espín representado por esa anchura de dicha resonancia. Este proceso de pérdida de la coherencia de fase y, por tanto, de intensidad de la resonancia, se produce principalmente por las interacciones entre espines vecinos (relajación espín-espín). Las inhomogeneidades en el campo magnético B_0 también contribuyen a la pérdida de magnetización transversal, definiéndose otra constante que engloba las interacciones entre espines y la contribución de la falta de homogeneidad en B_0 : T_2^* . Ambos mecanismos de relajación se dan simultáneamente, sin embargo siempre $T_2 \leq T_1$ (figura 1.10).

En el estudio por RMN de sistemas biológicos es importante insistir en que no sólo las características moleculares intrínsecas de las sustancias de interés, sino también su entorno, deben ser considerados a la hora de analizar los resultados, ya que estos afectarán a los procesos de relajación. No todos los procesos que ocasionan relajación transversal generan paralelamente relajación longitudinal, aunque sí que todos los procesos responsables de relajación longitudinal lo son, a su vez, de la relajación transversal.

El proceso de relajación también se ve afectado por la movilidad molecular, ya que al moverse las moléculas también lo harán los momentos magnéticos de los núcleos en ellas contenidos afectando a las interacciones que posibilitem tanto la relajación longitudinal como la transversal. La movilidad molecular asimismo, puede verse afectada por factores diversos como: viscosidad, asimetría de la molécula, temperatura, etc.

Las características de la relajación espín-espín, implican que la movilidad de los núcleos en observación afectará a la anchura de los picos obtenidos. Así, una reducción de dicha movilidad se traducirá en una anchura de resonancia mayor.

- Cociente señal ruido

El cociente señal/ruido (SNR, *signal to noise ratio*) es el cociente entre la altura máxima de una resonancia y la diferencia de alturas extremas del ruido del espectro

en una zona sin resonancias. Normalmente la intensidad correspondiente a los núcleos de interés presente en una sola FID es muy débil, de manera que después de la transformada de Fourier la intensidad de las señales es muy pequeña comparada con la intensidad del ruido. Una manera de elevar el cociente señal/ruido es sumar diferentes registros de una misma muestra, de manera que las señales presentes irán aumentando de manera proporcional al número de registros, mientras que el ruido por ser de naturaleza aleatoria no se adicionará de manera coherente y su contribución no aumentará tanto como la de las señales de interés. Teniendo en cuenta que la intensidad del ruido aumenta proporcionalmente a la raíz cuadrada del número de registros, vemos que el cociente señal/ruido (S/N) mejorará con el número de registros (n) (Ec 1.6):

$$\frac{S}{N} \propto \frac{n}{\sqrt{n}} \propto \sqrt{n} \quad \text{Ec1.6}$$

Por lo tanto, a modo de ejemplo, para aumentar 10 veces el cociente señal/ruido será necesario adquirir 100 veces más registros.

1.2.3 Espectroscopía de RMN de alta resolución por giro de ángulo mágico: *High resolution magic angle spinning* (HR-MAS) de muestras biológicas

La espectroscopía de alta resolución con giro de ángulo mágico o HR-MAS se ha utilizado para estudiar muestras de tejido intacto *ex vivo* desde 1996. Los primeros estudios que la aplicaron al estudio de cáncer en humanos fueron el de Cheng y colaboradores [29] y el de Millis y colaboradores [30] un año después (figura 1.11). Dicha técnica posee un alto grado de reproducibilidad y su naturaleza no destructiva permite el posterior estudio por microscopía de las muestras analizadas previamente por HR-MAS. Este análisis morfológico *a posteriori* se puede realizar siempre y cuando la velocidad de giro no sea demasiado elevada, lo que puede afectar a la integridad celular [31, 32]. Por tanto, el HR-MAS permite la comparación de datos espectroscópicos y morfológicos [33].

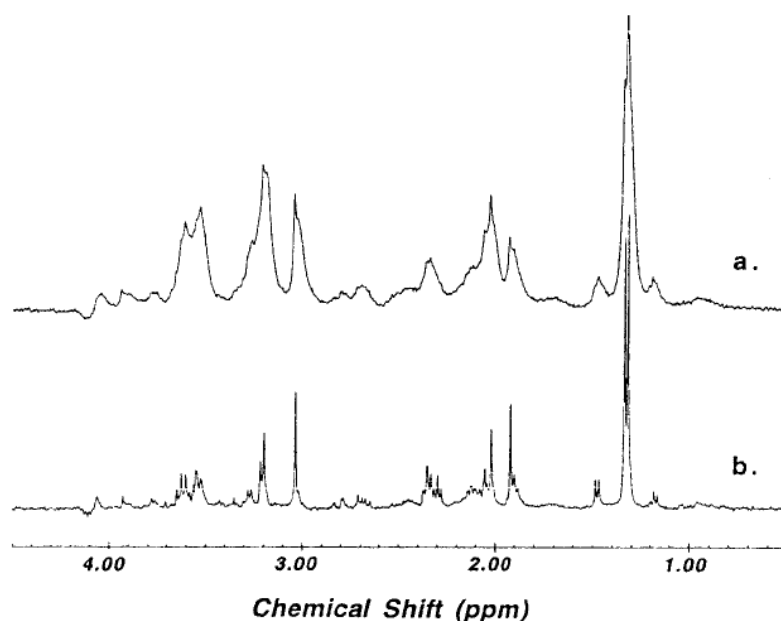


Figura 1.11. Espectro de de RMN de ¹H (400 MHz) de tejido de cerebro de mono a 20 °C. En el espectro (a) la muestra se encuentra en el espectrómetro sin girar, mientras que en la (b) la muestra gira al “ángulo mágico” para HR-MAS a una frecuencia de 2,5 kHz [29].

Previamente, Newing [34] y Lowe [35] habían descrito de manera independiente que la adquisición de espectros de RMN de una muestra sólida girando rápidamente (normalmente entre 4 y 6 kHz) en un ángulo de 54,7° (ángulo mágico) relativo al campo magnético principal (B_0), reduce la anchura de las resonancias detectadas en el espectro originada mayormente por interacciones dipolares y diferencias de susceptibilidad magnética entre distintas partes de la muestra (figura 1.12 y ecuación 1.7). El giro de ángulo mágico evita por tanto, la pérdida de información causada por la superposición de resonancias individuales en condiciones clásicas de adquisición. Ello es debido en muchos casos a la heterogeneidad de la muestra y parámetros residuales anisotrópicos que no pueden ser promediados por el movimiento Browniano en muestras sólidas a diferencia de la resolución clásica en disoluciones.

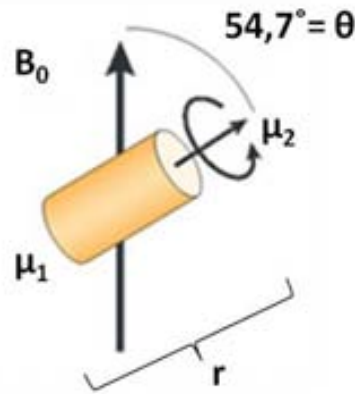


Figura 1.12. Ejemplo de un rotor girando en ángulo mágico de 54,7° respecto al campo magnético B_0 . Cuando $\theta=54,7^\circ$, $3\cos^2\theta=1$ y las interacciones dipolares ($B_{1\rightarrow 2}$) desaparecen.

$$B_{1\rightarrow 2} = \left(\mu_1 \cdot \frac{\mu_0}{4\pi} \right) \cdot (3 \cos^2 \theta - 1) / r^3 \quad \text{Ec1.7}$$

Siendo $B_{1\rightarrow 2}$ el campo magnético efectivo ejercido por el núcleo 1 sobre el 2, μ_1 el momento magnético del núcleo 1, μ_0 la permeabilidad del vacío y r la distancia entre los núcleos considerados.

La principal ventaja del HR-MAS respecto a otras técnicas de RMN de alta resolución, es que permite el estudio directo de muestras de tejido intacto, evitando el paso de extracción de los metabolitos (por ejemplo, extractos con ácido perclórico para metabolitos hidrosolubles [36]) y a pesar de ello con resolución espectral comparable. Las secuencias de pulsos de adquisición espectral más comunes pueden aplicarse en estos casos para estudiar cambios en el metaboloma de las muestras estudiadas intactas

Una velocidad de giro moderada (entorno a 3-4 KHz) es suficiente para evitar efectos de ensanchamiento de señales y obtener espectros de alta resolución [37]. Sin embargo, velocidades demasiado bajas (500 Hz o inferiores) pueden producir *sidebands* (señales artificiales del análisis espectroscópico que no se deben confundir con impurezas) de intensidad considerable en el rango de desplazamiento químico de interés que pueden enmascarar las señales de los metabolitos de interés (figura 1.13). Por ello existen estudios que han evaluado como velocidad óptima de giro (cosa que depende del campo magnético externo) 3.000 Hz para un B_0 de 9,4 T para evitar el problema de dichas *sidebands* [37].

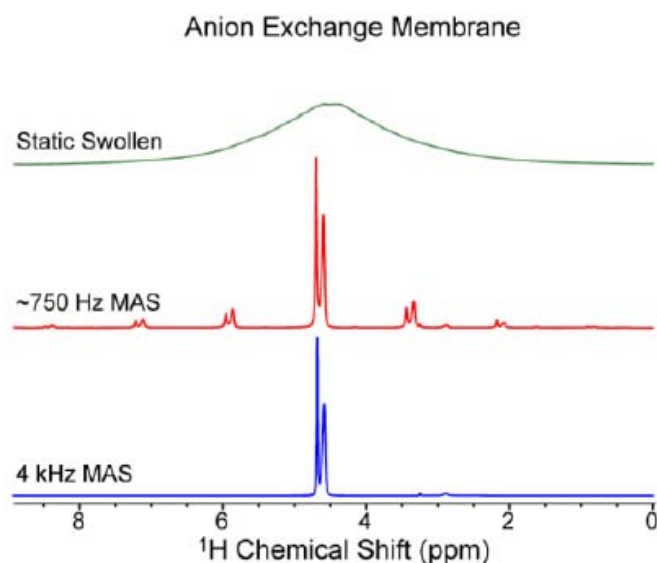


Figura 1.13. Membrana de intercambio de aniones en solución de metanol donde se muestra el efecto de la velocidad de giro en HR-MAS sobre dicha muestra. En el espectro superior (verde) la muestra no está girando, en el espectro central (rojo) la muestra está girando a 750 Hz, velocidad a la que aparecen *sidebands* para esta muestra y en el espectro inferior (azul) la muestra está girando a 4.000 Hz. Imagen extraída de [38].

1.2.4. Espectroscopía de RMN (ERM) *in vivo* de tumores cerebrales

Una metodología analítica no invasiva prometedora para el diagnóstico de tumores cerebrales es la ERM de protón (^1H -ERM), que está considerada como un complemento muy útil de la IRM y que actualmente se utiliza de manera rutinaria en los estudios de tumores cerebrales en diversos centros clínicos del mundo, requiriendo solamente unos pocos minutos para la adquisición de espectros de vóxel único (*single voxel*, SV) en imanes de 1,5 T [39]. Los espectros de volumen único se obtienen normalmente de regiones cúbicas de la muestra conocidos como *voxels*, de aproximadamente $1\text{-}8\text{ cm}^3$ y contienen información sobre metabolitos cerebrales importantes, como por ejemplo colina, creatina, mioinositol, glutamato, N-acetil aspartato (NAA), lactato y lípidos móviles (figura 1.14). El NAA se considera como un marcador de viabilidad neuronal que suele ver disminuida su concentración en el caso de los tumores cerebrales, reflejando la pérdida o ausencia de neuronas y axones en el tumor. La resonancia de la colina (colina total) procede de un grupo de moléculas involucradas en la degradación y síntesis de membrana celular, principalmente de fosfocolina, glicerofosfocolina y colina libre, por lo que se considera como un marcador de proliferación. La creatina total (creatina + fosfocreatina) hace referencia a

compuestos involucrados en el metabolismo energético de tejidos con demanda fluctuante de energía y se ve disminuida en los tumores cerebrales con respecto a parénquima cerebral. La creatina total baja en algunos tumores respecto a tejido sano circundante (por ejemplo tumores cerebrales), pero aumenta en otros (por ejemplo, hepatomas primarios). El lactato, en condiciones normales presenta valores muy bajos o no detectables en el parénquima cerebral normal, pero en el caso de lesiones tumorales su concentración suele elevarse asociándose a regiones de alta actividad glicolítica. La función del mioinositol no es bien conocida aunque se considera un marcador glial, así, se sabe que la intensidad relativa de su resonancia se altera en determinadas patologías cerebrales. Las resonancias correspondientes a los ML aumentan en algunos tipos de tumores, especialmente en los de alto grado, y cuando constituyen las resonancias más intensas son un indicador de necrosis (muerte celular). El glutamato es un importante neurotransmisor excitador en el SNC y se ve elevado en los ODG. La alanina suele ser detectable en los meningiomas aunque no está muy claro cuál es el significado funcional de dicho aumento [40-42] (tabla 1.1).

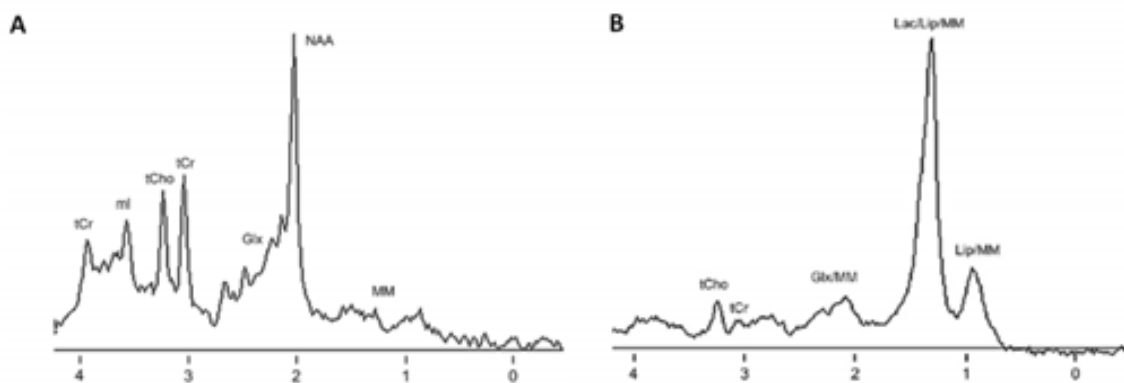


Figura 1.14. A) Espectro de ^1H (TE=30ms; TR= 2000ms) de materia blanca de un voluntario sano a 1,5 T. B) Espectro adquirido con los mismos parámetros que en A) de un GBM. Los principales metabolitos están marcados sobre sus resonancias correspondientes: creatina total (tCr) a 3,03 y 3,94 ppm; colina total (tCho) a 3,22 ppm; NAA a 2,01 ppm; mioinositol (mI) a 3,56 ppm; glutamato y glutamina (Glx) entre 2 y 2,4 ppm; lípidos (Lip) y macromoléculas (MM) a 0,9 y 1,3 ppm y lactato (Lac) a 1,3 ppm (figura adaptada de Sibtain y colaboradores [43]).

Metabolito	ppm	Multiplicidad
Lípidos neutros visibles por ERM (lípidos móviles)	Varias resonancias desde 0,5 hasta 5,40, pero las mejor detectables <i>in vivo</i> a 0,9, 1,3 and 2,0	Aparentes singletes
Lactato	1,33	Doblete
Alanina	1,47	Doblete
Acetato	1,92	Singlete
N-aceti aspartato	2,02	Singlete
Glutamato	2,10	Multiplete
Glutamina	2,14	Multiplete
Glutamato	2,35	Triplete
Succinato	2,42	Singlete
Glutamina	2,46	Triplete
N-acetil aspartato, Glutamato, Glutamina	2,61	Cuadruplete
Creatina	3,03	Singlete
Sustancias que contienen grupo trimetilamina (Colina, fosfocolina, Glicerofosfocolina y otros), generalmente etiquetados como "colina"	3,21	Singlete
Scilo-Inositol	3,35	Singlete
Taurina, Glucosa	3,43	Triplete
Mio-Inositol	3,55	Multiplete
Glicina	3,56	Singlete
Glutamato	3,77	Triplete
Glutamina	3,78	Triplete
Alanina	3,79	Cuadruplete
Glucosa	3,80	Multiplete
Creatina	3,93	Singlete

Tabla 1.1. Principales resonancias de metabolitos detectables por ERM de ^1H *in vivo* a 1,5 T en parénquima cerebral humano normal y/o patológico.

Los radiólogos pueden así correlacionar la información anatómica obtenida con la IRM con la información metabólica obtenida mediante la ^1H ERM. Los espectros aportan información bioquímica que, una vez caracterizada para cada tipo de tumor y utilizando el sistema de ayuda informática adecuado, pueden ayudar a la clasificación no invasiva de este tipo de tumores, aportando un complemento adicional al actual sistema de diagnóstico [44]. Con la debida experiencia, los patrones de niveles relativos a metabolitos se pueden interpretar visualmente para llegar a una orientación

radiológica, pero el resultado más robusto se obtiene a partir de un análisis cuantitativo de los espectros y la utilización de métodos de reconocimiento de patrones. Sin embargo, dichos métodos no se incluyen en el *software* estándar de los sistemas de escáner de RM de los centros clínicos.

1.2.5 Imagen de resonancia magnética (IRM)

La IRM se basa en los principios de la RMN para obtener señales de resonancia localizadas espacialmente mediante el uso de gradientes de campo magnético para formar una imagen. El hidrógeno es el núcleo más utilizado por su abundancia en el cuerpo humano y el gran momento magnético que posee. Las imágenes se obtienen a partir de la señal de los ^1H presentes en el tejido, dependiendo de su concentración y movilidad. La mayoría de la señal procede del agua y en una proporción mucho menor de la grasa corporal. El resto de metabolitos con ^1H visibles por RMN no contribuyen significativamente a la obtención de las imágenes debido a que se encuentran en una proporción mucho menor a la de la grasa y el agua. El contraste obtenido en las imágenes de IRM se consigue fundamentalmente gracias a las diferencias en densidad protónica (de hidrógenos) entre los tejidos de la muestra en estudio, así como a sus tiempos característicos de T_1 y T_2 . En general se definen tres tipos de imágenes según el parámetro en el que se basa la generación de contraste durante su adquisición: ponderadas en T_1 , T_2 o densidad protónica.

En resumen, para la adquisición de imágenes por IRM, la muestra o el paciente en estudios clínicos, son estudiados en presencia de un elevado campo magnético que permite la orientación preferencial de los momentos magnéticos de los hidrógenos de sus moléculas de agua en la dirección del campo B_0 . Se aplican gradientes en tres direcciones ortogonales en el espacio durante breves períodos de tiempo durante la adquisición de las secuencias, para determinar el volumen y la región de la muestra que se debe excitar y codificar para obtener la imagen correspondiente. El primer gradiente se denomina gradiente de selección de corte (*slice-selection*), que determina la orientación del plano en el que se desea obtener la imagen bidimensional. Las dos dimensiones de este plano son codificadas en frecuencias y fases. La codificación en frecuencia se lleva a cabo mediante la aplicación de un gradiente de lectura (*readout gradient*) durante la adquisición de la señal de RMN. Entre los gradientes de selección de corte y de lectura se aplica un tercer gradiente para la codificación en fase (*phase*

encoding). Como resultado de la aplicación de los tres gradientes se obtiene una matriz de datos en la que cada punto tiene una frecuencia y una fase únicas. La imagen obtenida consiste en un conjunto de elementos digitales de imagen (pixels) que representan elementos de volumen del tejido original (vóxeles) (figura 1.15)

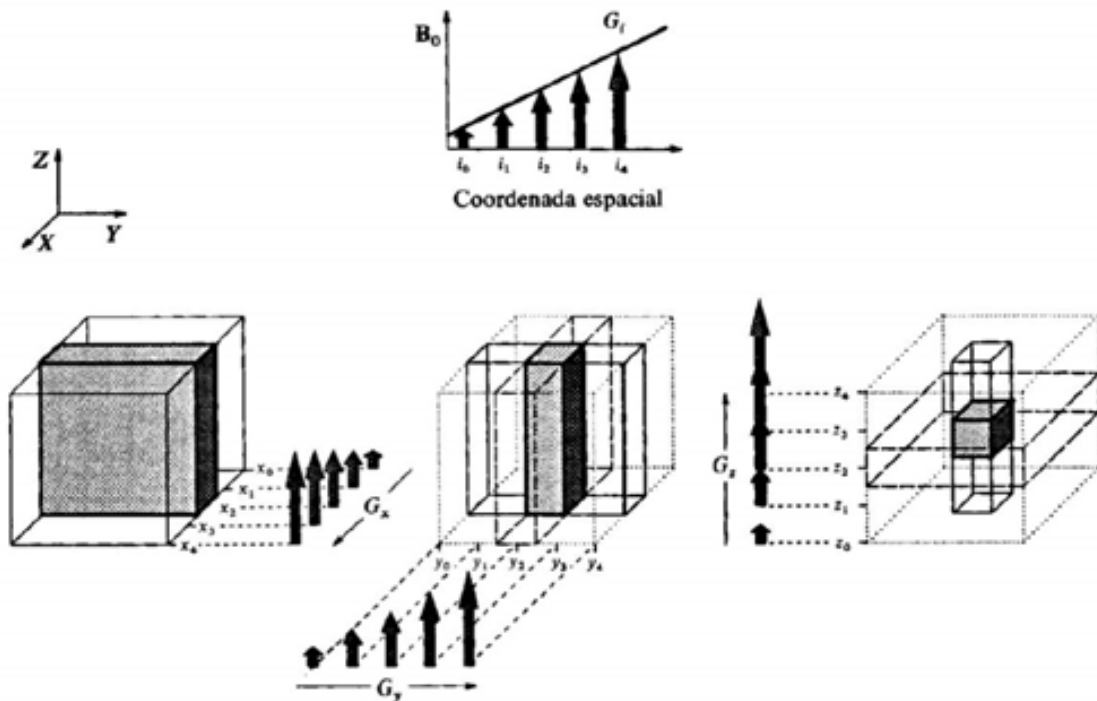


Figura 1.15. Diagrama de una de las estrategias de selección de un vóxel de excitación determinado dentro del tejido explorado por RMN, mediante el uso de tres gradientes ortogonales en el espacio. Imagen tomada de [26].

Existe una gran variedad de secuencias de pulsos para IRM que combinan de diferentes maneras los pulsos de RF, variando el tiempo de reciclaje (TR) (tiempo transcurrido entre pulsos de excitación de RF) y el tiempo de eco (TE) (tiempo transcurrido desde la aplicación del pulso de excitación hasta la obtención de la señal de RMN (FID). De esta manera se obtiene contraste (diferencia de intensidad en la imagen entre dos regiones contiguas) y se puede seleccionar el parámetro en el que se va a ponderar la imagen obtenida, por ejemplo una imagen ponderada en T_1 , que es más sensible a los detalles anatómicos estándar, o ponderada en T_2 , que es más sensible al contenido de agua y a la presencia de patología [45]. En general, para que una imagen esté ponderada en T_1 se utilizan TR y TE cortos en su adquisición y por el

contrario, para que esté ponderada en T_2 se emplean TR y TE largos. En el caso de la densidad protónica, se aplican TR largos y TE cortos (figura 1.16).

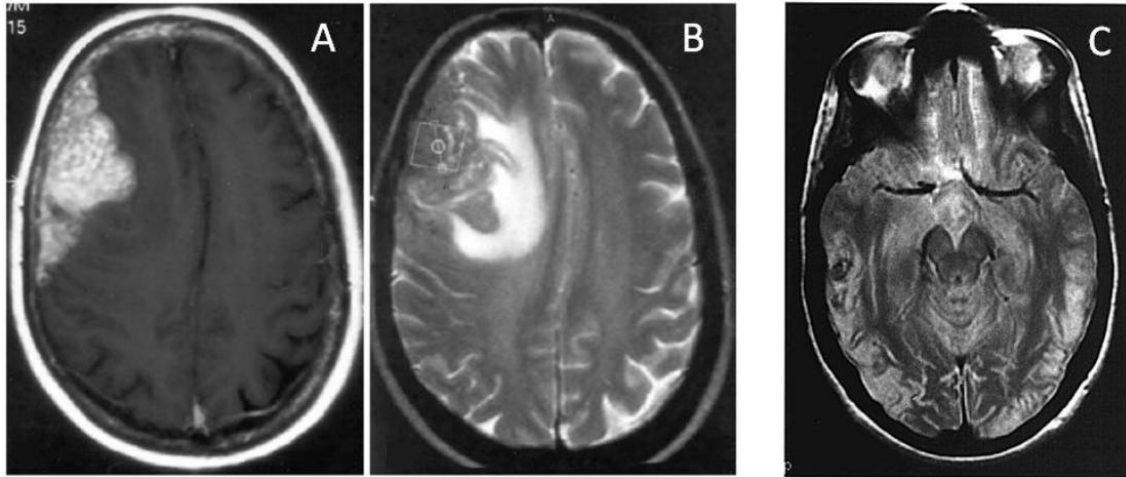


Figura 1.16. Las imágenes A y B, obtenidas a 1,5 T, muestran un corte en el plano axial del encéfalo de un paciente afectado por una metástasis en el lóbulo frontal derecho. La imagen ponderada en T_1 (A) muestra un contraste intenso (más blanco) en la lesión, relativamente heterogéneo, mientras que la imagen ponderada en T_2 (B) muestra edema (blanco) y efecto de masa en el tejido circundante [44]. La figura C muestra un corte en el plano axial a un nivel inferior que A y B de un encéfalo normal ponderado en densidad protónica [46].

1.2.6 Imagen espectroscópica de resonancia magnética (IERM)

La IERM es una técnica que permite la adquisición de múltiples espectros de ERM localizados de manera simultánea [47, 48]. Se aplica principalmente al estudio de cerebro, próstata y mama y puede ser mono, bi o tridimensional, según el modo de obtención de la señal: de columnas (o filas) en un plano, de filas y columnas en un plano o de filas y columnas en un volumen respectivamente. En el caso del cerebro, se preselecciona el volumen de interés (VOI) previamente para suprimir la señal procedente de la grasa subcutánea, situada fuera de dicha zona. Esto puede complementarse con la aplicación de múltiples bandas de saturación en el exterior del VOI. La principal ventaja de la IERM es que permite obtener en una misma exploración espectros de zonas patológicas y normales (figura 1.17). Sin embargo, la adquisición de las secuencias de IERM es mucho más compleja que la de los espectros *single voxel*, debido a las numerosas inhomogeneidades de campo magnético presentes en toda la muestra, a la contaminación de los espectros individuales debida a los vóxeles

vecinos, a los largos tiempos de adquisición y a la mayor complejidad del procesamiento de datos multidimensionales. En lo referente a la corrección de los efectos de las inhomogeneidades de campo, se han desarrollado métodos que automatizan el proceso y permiten obtener excelentes resultados en tiempos muy reducidos [49]. En cuanto a las contaminaciones de los vóxeles por parte de sus vecinos, se han investigado métodos basados en la codificación de la información registrada que mejoran sustancialmente este problema sin perjuicio de la sensibilidad o resolución espacial [50].

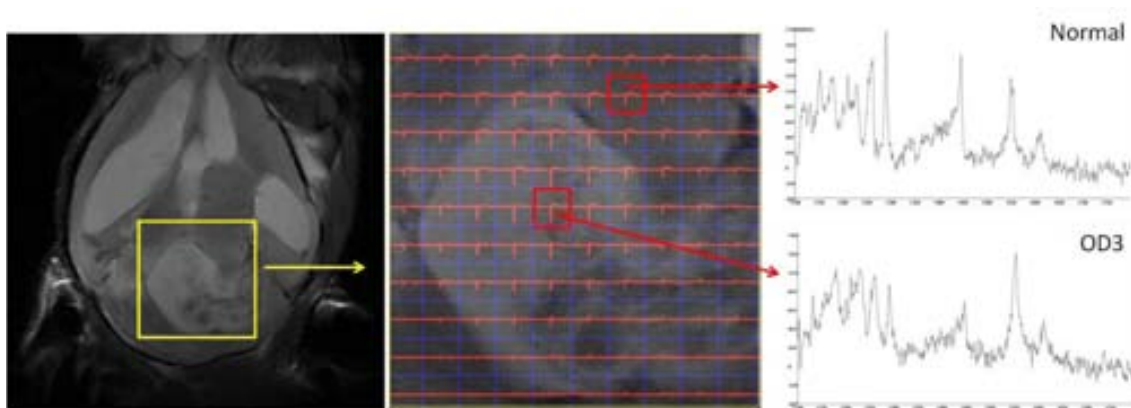


Figura 1.17. A la izquierda se muestra una imagen de RMN *in vivo* de un ratón con un oligodendroglioma de grado III, sobre la que se fija la zona (cuadrado amarillo) en la que se va a adquirir la rejilla del multivóxel. En el centro se muestra una ampliación de la región donde se ha adquirido el multivóxel y por último, en la columna de la derecha se muestran dos espectros correspondientes a una región tumoral de oligodendroglioma de grado III (OD3) y una región correspondiente a parénquima normal (normal).

Las matrices de espectros obtenidas por IERM pueden post-procesarse para obtener mapas de concentraciones absolutas o relativas de metabolitos concretos o imágenes nosológicas derivadas de los datos espectroscópicos [51].

La mayor parte de las aplicaciones *in vivo* de la imagen espectroscópica de resonancia magnética (IERM) se desarrollan para protón (^1H), aunque se pueden estudiar otros núcleos metabólicamente relevantes. La mayoría de trabajos recientes de ^1H -IERM en modelos animales de tumor cerebral están concentrados en modelos murinos (ratones y ratas) y centrados en obtener mapas de diferentes metabolitos y otras sustancias. Los tipos de tumor más estudiados son los modelos alográficos estereotácticos y los *xenografts* de tumores humanos en animales inmunodeprimidos,

aunque últimamente, está aumentando el uso de ratones modificados genéticamente que desarrollan espontáneamente tumores (*genetically engineered mice*, GEM) [52]. Trabajos pioneros de grupos de investigación de Grenoble [53] y Würzburg [54] produjeron imágenes del contenido de un “metabolito” en gliomas de alto grado C6 de rata basados en imágenes de correlación espectral de resonancias 2D. Gracias al desarrollo de esta técnica, se pudo demostrar en dichos trabajos el aumento relativo dentro del área tumoral, respecto a cerebro no infiltrado, de ciertos metabolitos como lactato, alanina, hipotaurina y fosfoetanolamina. Además, el N-acetilaspártato y la glucosa no se detectaron en el tejido tumoral, mientras que se detectaban claramente en cerebro sano. Trabajos posteriores produjeron imágenes de pH usando sondas exógenas y comparándolas con los mapas de lactato de glioma C6 de cerebro de rata [55, 56].

Otro grupo ubicado en Kuopio llevó a cabo un enfoque algo diferente [57], ya que adquirió IERM de TEC (5 ms) de lípidos móviles (ML) y colina total detectando que el aumento en los ML correlacionaba con la inducción de apoptosis con terapia de ganciclovir en gliomas BT6C de rata (inducidos mediante células transformadas con el gen de la timidina kinasa del herpes simplex).

Sin embargo, el desarrollo de mejoras en el *hardware* (bobinas de gradiente de campo magnético más potentes y sistemas de refrigeración eficientes) y nuevos métodos de *shimming* han permitido realizar estudios de IERM incluso en cerebro de ratón, [58-62], con aplicaciones al estudio de tumores cerebrales [63, 64]. Además, un desarrollo metodológico reciente se ha aplicado en la monitorización de la respuesta de tumores cerebrales en modelos preclínicos [65]. Esencialmente, se basa en el uso de mapas de ^{13}C IERM obtenidos tras inyectar piruvato 1- ^{13}C hiperpolarizado y lactato o una determinada proporción de lactato/piruvato. El cociente piruvato/lactato mostró una disminución bajo terapia, posiblemente debido a una disminución de la actividad lactato deshidrogenasa en respuesta a terapia en una masa tumoral.

En resumen, se espera que los IERM preclínicos generen información de interés para diferenciar tipos tumorales o incluso subtipos moleculares de ellos, permitiendo que la progresión tumoral sea monitorizada, diferenciando tumores de masas cerebrales anómalas no tumorales y/o evaluando la respuesta a terapia.

1.3. Lípidos “móviles”, detección mediante RMN y localización subcelular

Cuando se habla de lípidos móviles (ML, en la abreviatura clásica anglosajona) visibles por espectroscopía de RMN, se hace referencia básicamente a las resonancias provenientes de las cadenas de ácidos grasos de lípidos neutros en triacilgliceroles, apareciendo las más características a 0,9, 1,3, 2,0 y 5,3 ppm [66] (figura 1.18). El interés por entender el origen celular de estas resonancias proviene de su aparición en numerosas muestras biológicas, tanto asociadas con malignidad y muerte celular como con procesos benignos como diferenciación [67] y variación de la velocidad de proliferación [68].

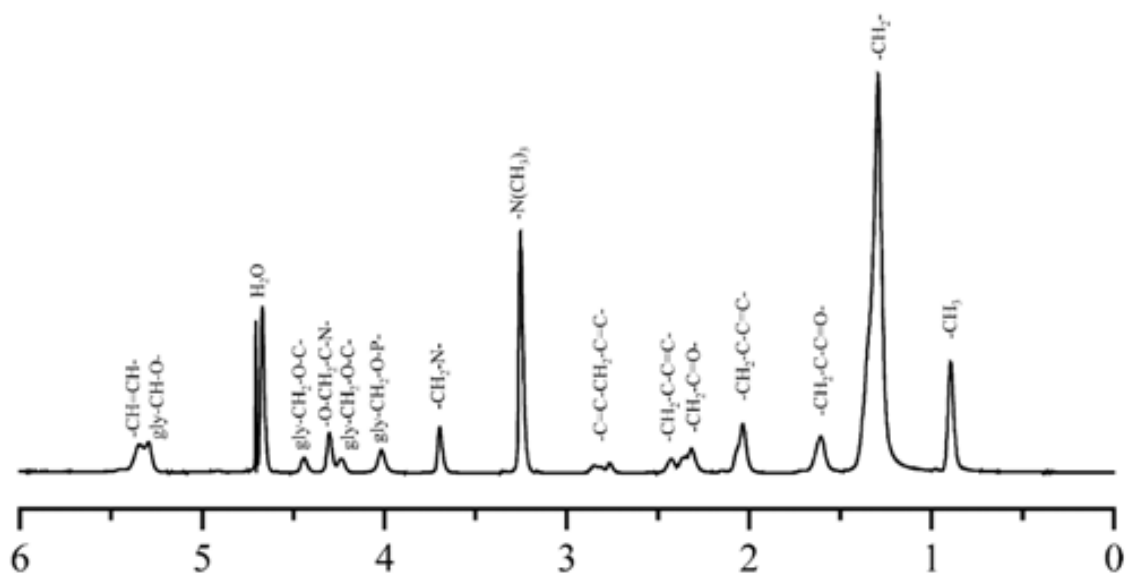


Figura 1.18. Espectro de modelo de membrana usando fosfatidilcolina de huevo adquirido por HR-MAS girando a 10 KHz en un campo de 800 MHz, donde se muestran las principales resonancias de los “lípidos móviles” en cuanto a las cadenas de ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos en las bicelas de la referencia [69] o de los triacilgliceroles contenidos en las gotículas lipídicas de la referencia [70]. En esta figura gly hace referencia al esqueleto de carbono del glicerol de la fosfatidilcolina.

Los primeros trabajos en los que se estudió el origen de las resonancias de los lípidos móviles detectados por espectroscopía de RMN fueron realizados por el grupo de Mountford en 1982 [71] utilizando cultivos de células tumorales y linfocitos estimulados (figura 1.19). Sugerirían sus resultados que las resonancias provenían de lípidos de membrana organizados en microdominios (con un tamaño estimado de 25-

28 nm) y podrían emplearse como marcadores de malignidad tumoral. Las evidencias por RMN que parecían sustentar este modelo eran:

(a) las similitudes de los espectros mono y bi dimensionales entre lipoproteínas, preparaciones de membrana y suspensiones celulares, aunque dichos autores no tuvieron en cuenta que las preparaciones de membrana podrían estar contaminadas con gotículas lipídicas que no necesariamente formasen parte de esta.

(b) las propiedades de relajación diferencial de las resonancias, al no detectar diferencias en contenido y distribución de las gotículas lipídicas de dos líneas celulares diferentes por microscopía electrónica y de fluorescencia, mientras que sí se observaban diferencias en las señales de ML de los espectros de protón.

(c) La sensibilidad de las resonancias al ion paramagnético gadolinio (Gd^{3+}), que se consideraba que podría interaccionar con la membrana plasmática por su parte extracelular y produce un ensanchamiento en la resonancia lipídica, lo que indicaría que los lípidos neutros estarían asociados a membrana [72]. Hay que tener en cuenta que aún no se conocía entonces que un porcentaje de gadolinio puede entrar dentro de las células de manera no selectiva [73].

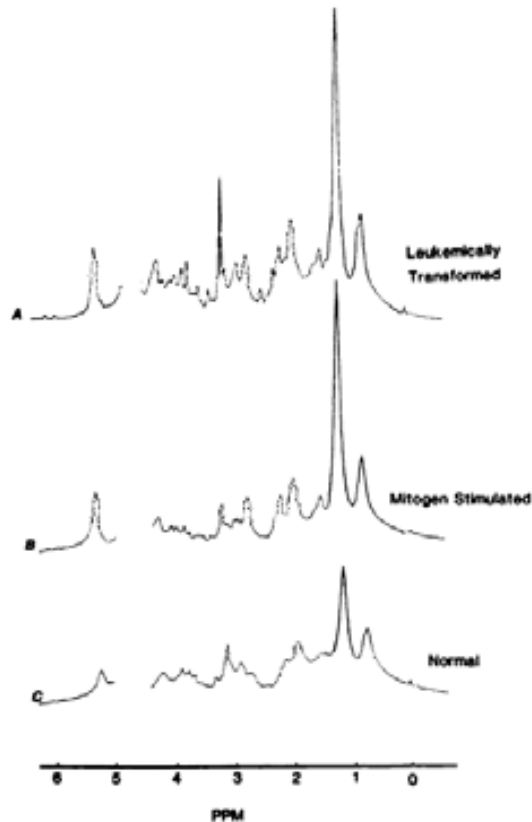


Figura 1.19. Imagen del artículo de Mountford y colaboradores de 1982 [71] en el que se muestra el patrón espectral de ^1H una línea celular de leucemia (espectro superior), de linfocitos estimulados con agentes pro-mitóticos (espectro central) y de linfocitos sin estimular (espectro inferior). En este experimento se describe por primera vez la detección de los lípidos móviles visibles por RMN.

También se han podido encontrar evidencias de la presencia de microdominios de membrana de unos 60 nm de diámetro en células tumorales que podían justificar este modelo [74]. Sin embargo, el volumen correspondiente a estos microdominios de membrana en fibroblastos 3T3 sólo supone el 2-5 % del volumen contenido en gotículas lipídicas intracelulares. También se han descrito dominios estructuralmente similares en las membranas del retículo endoplásmico, lo que resulta muy interesante, ya que participan en la formación de las gotículas lipídicas intracelulares [75]. Sin embargo, no se ha cuantificado la contribución de estos dominios intramembrana al espectro de RMN de protón de células intactas.

A partir de 1993 empieza a proponerse la posibilidad de que las señales de los ML provengan de gotículas lipídicas intracelulares [68, 76, 77], siendo hoy en día la hipótesis más aceptada que los ML parecen tener su origen en las cadenas de ácidos

grasos en moléculas de triacilglicerol (TAG) contenidas en gotículas lipídicas citosólicas. Estas gotículas lipídicas se han descrito en numerosas ocasiones por microscopía electrónica [77] y por microscopía óptica [68, 78] en diversos sistemas celulares. Barba y colaboradores [68] describieron la presencia de gotículas lipídicas citosólicas en células C6 de glioma de rata en fase de post-confluencia de la curva de crecimiento mediante tinción con el colorante *Nile Red*. La aparición de las gotículas correlacionaba con una mayor intensidad de las señales de ML a 0,9 y 1,29 ppm del espectro de ^1H de RMN. Por otra parte, las células en fase exponencial de crecimiento no presentaban prácticamente gotículas citosólicas visibles por tinción con *Nile Red* y las señales de ML no eran visibles. Posteriormente Pérez y colaboradores [79] midieron por RMN de difusión las dimensiones del compartimento subcelular que contenía los ML en células C6 y determinaron que su diámetro efectivo (1-2 μm) no difería significativamente de lo medido de las gotículas citosólicas presentes en estas células, detectado por tinción con *Nile Red* y visualización por microscopía óptica. Posteriormente Quintero y colaboradores [80] cuantificaron el contenido lipídico de las células C6 realizando un extracto químico de las células para después analizarlo por cromatografía en capa fina. Este análisis se realizó en las células C6 en fase de crecimiento exponencial, en fase post-confluente y en tratamiento con ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*), que induce la parada de la proliferación celular y se describió que la ralentización de la proliferación induce un aumento de las resonancias de ML en las células C6 tanto medida por ^1H -RMN como por la cantidad de gotículas detectadas por microscopía óptica con tinción *Nile Red* (figura 1.20). Este estudio reveló que a pesar de los cambios en los ML y las gotículas detectados a lo largo de las distintas fases de crecimiento o tras el tratamiento con ACSF, el contenido total de lípidos neutros medido mediante extracción se mantenía constante. Por lo tanto, una parte del contenido total de lípidos neutros en fase exponencial de cultivo no era visible por ^1H -RMN o mediante detección por epifluorescencia. La detección de este *pool* de lípidos “invisible” por resonancia o microscopía óptica, condujo a considerar como uno de los objetivos de esta tesis (ver sección 2) el análisis de las células C6 por HR-MAS para ver el posible efecto de la velocidad de giro en la muestra, partiendo de la base de que se conoce que la velocidad de giro en el ángulo mágico puede afectar a la visibilidad de las resonancias de sustancias sólidas en los experimentos con CP-MAS [81].

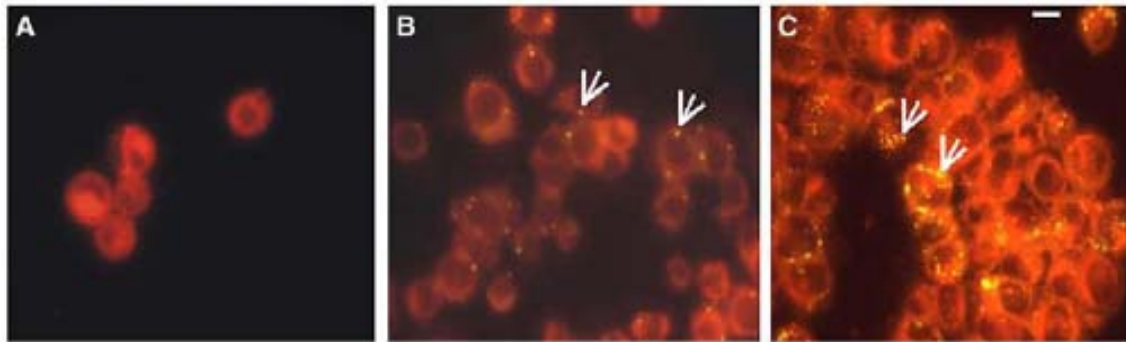


Figura 1.20. Células C6 con tinción *Nile Red* observadas por microscopía epifluorescente. (A) células de día 4 (fase exponencial), (B) células de día 7 (fase postconfluente) y (C) células de día 7 tratadas con ACSF. Las flechas apuntan a algunas de las gotículas de lípidos móviles detectadas. La barra blanca de la figura C mide 10 μm [80]

Para entender el fenómeno de la posible visibilidad restringida de las cadenas de ácidos grasos de los TAG, deben considerarse los siguientes hechos. Es importante tener en cuenta que debe existir una movilidad molecular (rotacional y traslacional) suficiente causada por el entorno químico inmediato de una molécula determinada para que ésta sea visualizable por RMN. Es decir, que las resonancias de ML siempre provendrían de moléculas con movilidad poco restringida. Los experimentos con células C6 muestran que tienen durante toda la curva de cultivo celular el mismo contenido lipídico de TAG pero por RMN se pueden llegar a detectar cambios en el contenido lipídico aparente (ML) de hasta 29 veces [80]. Este hecho sugiere que una posible modificación biofísica del tamaño o del compartimento subcelular de los TAG podría estar afectando a la detección de estas señales de ML [80, 82], aunque también podría ser explicado por la interacción de los compartimentos subcelulares conteniendo los TAG con el citoesqueleto, lo que podría afectar a la movilidad global de dichas moléculas (por restricción de su capacidad rotacional) y, por tanto, a su visibilidad por RMN.

1.3.1 Papel del citoesqueleto en la dinámica de gotículas lipídicas citoplasmáticas

Ferretti y colaboradores observaron que los fibroblastos 3T3 transformados con el oncogen *ras* no acumulaban ML y lo atribuyeron a que las células transformadas experimentaban alteraciones morfogénicas y de arquitectura tanto a nivel de citoesqueleto como de membrana [74]. De hecho, en trabajos previos, ya se había observado que en la formación y el mantenimiento de las gotículas lipídicas

citoplasmáticas podrían estar implicados los componentes del citoesqueleto [83, 84]. Franke y colaboradores [83] encontraron que el proceso de diferenciación de las células 3T3-L1 hacia adipocitos, durante el cual se acumulan gotículas lipídicas en el citoplasma, iba acompañado por un cambio en la organización de los filamentos intermedios de vimentina, que pasaban de estar dispuestos en forma de haces en el citoplasma a estar asociados con las gotículas lipídicas formando anillos con una disposición regular alrededor de éstas. Esta reordenación de la vimentina podría tener un papel en la formación y crecimiento de las gotículas, impidiendo la coalescencia prematura de las mismas y la hidrólisis de los TAG por parte de las lipasas.

Posteriormente Boström y colaboradores [85] demostraron en células NIH 3T3 que gotículas lipídicas de pequeño tamaño pueden aumentar de tamaño por fusión entre ellas y que esta fusión es dependiente del transporte activo asociado a microtúbulos. Marcinkiewicz y colaboradores [86] demostraron que el proceso contrario también tiene lugar, es decir, que la fosforilación de la proteína perilipina en preadipocitos 3T3-L1 produce fragmentación y dispersión de las gotículas lipídicas. Targett-Adams y colaboradores [87] demostraron que se producía el transporte activo de gotículas lipídicas, a una velocidad de 2-2,5 $\mu\text{m/s}$, asociado a una red de transporte celular en células HuH-7 derivadas de hepatoma humano. Estos trabajos indican la existencia de un transporte activo de gotículas que contienen TAG en células intactas que estaría asociado al citoesqueleto (en el caso de las HuH-7, a microtúbulos) y que las gotículas pueden fusionarse entre ellas para cambiar de tamaño.

También un trabajo del grupo de Oloffson [88] describen el papel de PLD1 (fosfolipasa D1), PLD2 (fosfolipasa D2), ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase 2*, también llamada MAPK1 o MAPK2 –*mitogen-activated protein kinase*-) y la dineína en la formación de las gotículas lipídicas (figura 1.21.). En este trabajo describen a las gotículas lipídicas como orgánulos dinámicos, que pueden ser activamente transportados por proteínas motoras como la dineína a lo largo de los microtúbulos y que pueden participar en procesos de fusión y fisión cambiando su diámetro en procesos regulados por proteínas como ERK.

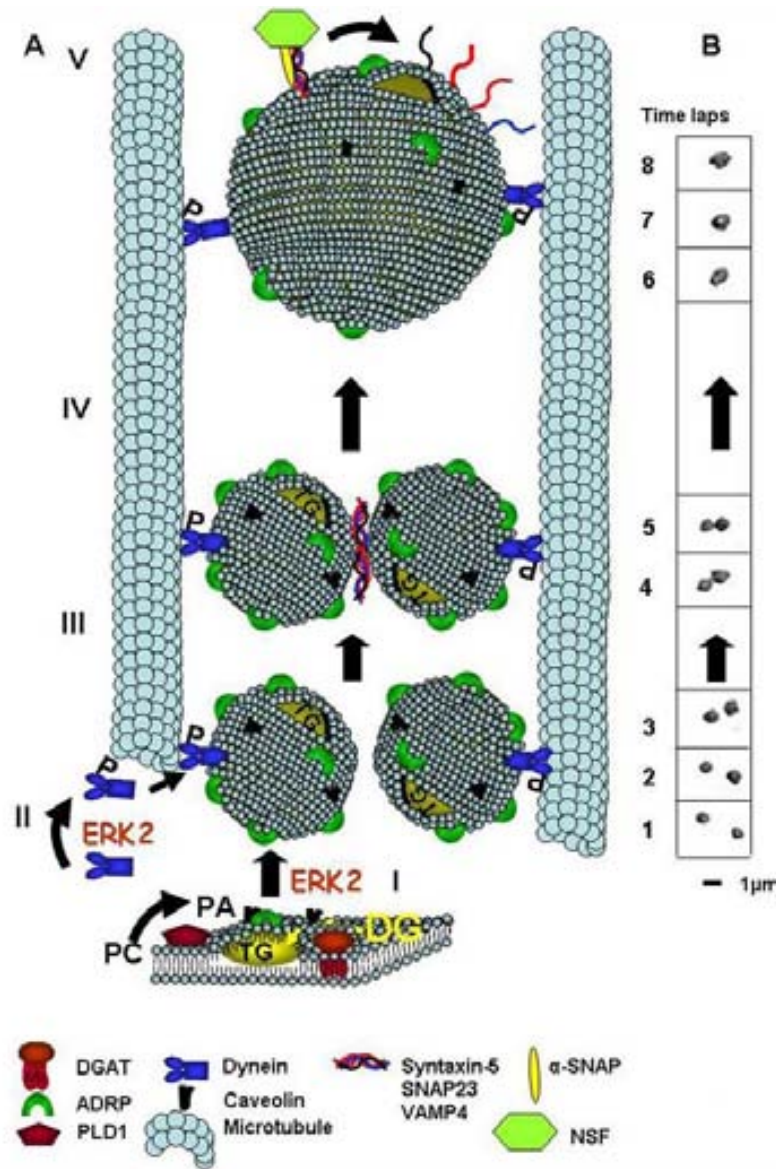


Figura 1.21. Imagen por cortesía de Sven-Olof Olofsson, Wallenberg Laboratory, Sweden. En esta figura se esquematiza la interacción entre las gotículas lipídicas y los microtúbulos según lo descrito por el grupo de Olofsson [85]. En A se esquematizan los diferentes pasos que llevan a la asociación de las gotículas lipídicas a los microtúbulos. En B se muestra cómo el proceso de fusión va cambiando el diámetro de las gotículas.

1.3.2 Origen metabólico de los lípidos que originan las señales de ML

Existe una gran controversia sobre el origen bioquímico de las resonancias de ML. Se ha observado que una gran variedad de procesos como necrosis, neoplasia, parada de la proliferación celular, apoptosis y procesos inflamatorios están relacionados con la alteración de los niveles de ML visibles por RMN. Desde hace tiempo se intenta determinar qué mecanismos o procesos metabólicos conducen a la

acumulación de dichos lípidos neutros. Según Hakumaki & Kauppinen [66], la acumulación de lípidos móviles puede estar originada por alteraciones en el tráfico de ácidos grasos y TAG que a su vez podría estar causada por una liberación excesiva de ácidos grasos de las reservas celulares (fosfolípidos de membrana) o bien por una disminución de la secreción celular de TAG o por un aumento de la absorción de ácidos grasos del exterior de la célula. El aporte externo de ácidos grasos sería un mecanismo relevante en los estudios *in vivo*, pero en el caso de los estudios con células *in vitro* la acumulación de TAG estaría asociada mayoritariamente a procesos metabólicos intracelulares.

Varios trabajos describen la acumulación intracelular de lípidos neutros y/o ML en células que presentan una ralentización de la proliferación celular [68, 89-93]. Hirakawa y colaboradores [89] observaron que fibroblastos embrionarios de rata transformados con el gen H-ras y con un antígeno T grande SV40 sensible a la temperatura acumulaban lípidos neutros cuando se inducía una ralentización en la proliferación celular al trabajar a 39 °C, aunque no hicieron estudios sobre la visibilidad de estos lípidos por RMN. Dichos lípidos, mayoritariamente triglicéridos y ésteres de colesterol, se acumulaban en el citosol en forma de “vacuolas citoplasmáticas”, observación hecha por tinción de las células con el colorante *Oil Red*.

Roman y colaboradores [92] mostraron que al tratar células mamarias humanas transformadas no malignas HBL-100 con el compuesto citoestático cloruro de tetrafenilfosfonio (TPP), se producía un aumento significativo de la señal de lípidos móviles en el espectro de RMN de protón, aumento que dependía de las dosis de TPP y del tiempo de incubación. Experimentos más recientes realizados por Quintero y colaboradores [80] también demuestran que estos resultados se reproducen en células C6 de glioma de rata cuando se induce la ralentización de la proliferación celular mediante cultivo en ausencia de factores de crecimiento presentes en el suero fetal (cultivo con ACSF). Delikatny y colaboradores [91] investigaron si la alteración de las condiciones de cultivo de células L de fibroblastos murinos transformados, que inicialmente no presentaban señal de lípidos móviles en el espectro de RMN, inducía la presencia de estas señales lipídicas. Estas alteraciones consistieron en atenuar la proliferación celular mediante la disminución del pH del medio hasta valores ácidos, la eliminación del suero del medio de cultivo o la llegada a la confluencia. Observaron un aumento de la señal de ML en células confluentes o cultivadas a pH=6,1, efecto que se amplificaba si a las condiciones anteriores se le añadía la eliminación del suero del medio de cultivo. No obstante, dichos investigadores no encontraron una relación entre la presencia de ML y la fase del ciclo celular. También adquirieron espectros

bidimensionales, observando que en condiciones de pH bajo o confluencia, la aparición de las resonancias de lípidos se encontraban asociados a un aumento de la resonancia de glicerofosfolina (GPC) y que esto podría estar asociado a la hidrólisis de la fosfatidilcolina (PtdCho) de la membrana plasmática a GPC, liberándose ácidos grasos que podrían reesterificarse para formar TAG. Barba y colaboradores [94] también observaron resonancias de ML en el espectro a ^1H de tiempo de eco de 136 ms en células C6 de glioma de rata cultivadas en medio ácido, que correlacionaron con la acumulación de gotículas lipídicas citoplasmáticas (observadas mediante tinción con el colorante *Nile Red*). También comprobaron que células C6 en fase exponencial no presentaban resonancias lipídicas ni acumulaban gotículas lipídicas.

Según Jackowski, tanto el metabolismo de los fosfolípidos como el ciclo celular se encuentran coordinados [95]. La fase G1 estaría caracterizada por procesos rápidos de degradación y resíntesis de PtdCho pero con predominancia de estos últimos, de forma que durante esta fase se doblaría la cantidad de fosfolípidos (PL) presentes en la célula debido a que continuaría su síntesis pero se reduciría drásticamente la degradación de la fosfatidilcolina de la membrana, conduciendo a una acumulación neta de PL. Las fases G2 y M estarían caracterizadas por una parada del metabolismo fosfolipídico (tanto en los procesos de síntesis como de degradación). También observó que la parada del ciclo celular en una línea celular de macrófagos en fase G1 por tratamiento con dibutilil-cAMP reducía la síntesis de fosfolípidos, de forma que el diacilglicerol (DAG) se desviaba hacia la síntesis de triacilglicerol (TAG) [96] (figura 1.21).

Esto probablemente era debido a que la parada del crecimiento celular hacía que no fuera necesaria la síntesis de membrana nueva, por lo que el DAG se derivaría hacia la síntesis de TAG. Según Jackowski, estos resultados indicaban que la síntesis de fosfolípidos estaba asociada a la proliferación celular. La enzima CCT (CTP:fosfolina citidiltransferasa) es la enzima que limita la velocidad de la biosíntesis de la fosfatidilcolina [97, 98], y se han observado fluctuaciones en su actividad dependientes del ciclo celular [96]. Por tanto, estos resultados mostrarían que una de las causas que podría explicar la acumulación de TAG en células sometidas a una ralentización de la proliferación sería la desregulación en la síntesis de la PtdCho.

En un trabajo posterior, Jackowski y colaboradores [99] comprobaron que la síntesis de ácidos grasos, necesaria para la síntesis de DAG, no era un proceso regulado por el ciclo celular pero sí por la presencia de factores de crecimiento (que

aumentaban los niveles de expresión de las enzimas ACC (acetilCoA carboxilasa) y FAS (*fatty acid synthase*), como se esquematiza en la figura 1.22). También observaron que la velocidad de conversión de DAG a TAG era inversamente proporcional a la actividad de la CCT, ya que la inhibición específica de CCT se traduciría en una acumulación de TAG. Por tanto, la enzima CCT constituiría un punto importante de control, ya que en función de su actividad dirigiría el DAG hacia la síntesis de PL o permitiría que se redireccionara para la síntesis de TAG. La acumulación de TAG también podría estar originada por una producción excesiva de ácidos grasos (AG) y glicerol-3-fosfato (G3P), debido a una desregulación de la glucólisis y de la actividad de la enzima FAS.

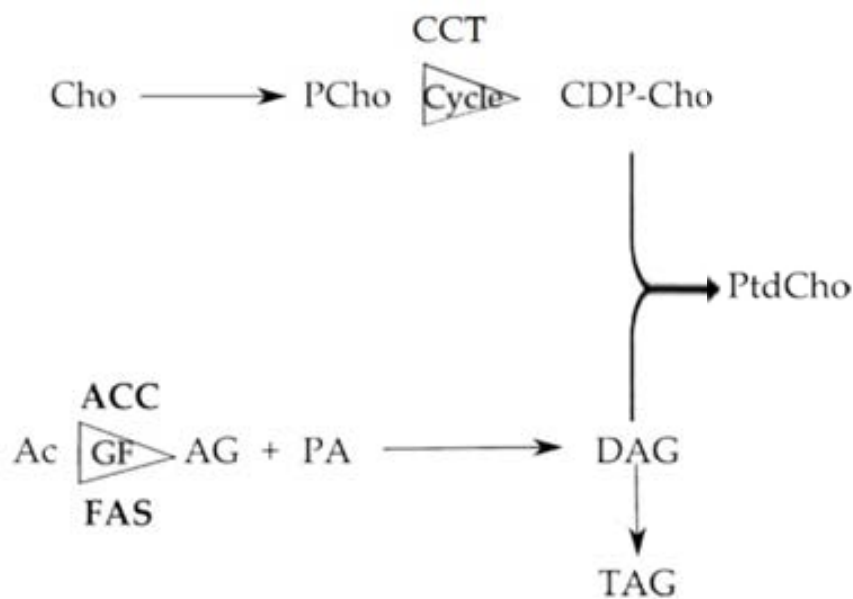


Figura 1.22. Figura modificada a partir de la publicada por Jackowski y colaboradores [99]. La actividad de la enzima CCT (CTP:fosfocolina citidiltransferasa) controlaría el suministro de CDP-colina (CDP-Cho), que junto con el DAG se utiliza para la síntesis de la PtdCho, mientras que la de las enzimas ACC (acetilCoA carboxilasa) y FAS (*fatty acid synthase*) controlaría la producción de DAG. Cuando el DAG no es requerido para la síntesis de membrana, podría convertirse en TAG y acumularse. Cuando la síntesis de PtdCho aumenta la demanda de DAG, se produciría menos cantidad de TAG. La velocidad en la producción de ácidos grasos podría regularse por factores de crecimiento (GF), pero sería independiente del ciclo celular, mientras que la actividad de la CCT sí dependería del ciclo celular (*cycle*).

También se ha investigado la relación existente entre la activación de la hidrólisis de la fosfatidilcolina y la aparición de resonancias de ML en células tumorales y embrionarias [100, 101], en células activadas para proliferar [102] y en células

transformadas [74, 103]. Veale y colaboradores [102] observaron que en timocitos en los que se había inducido la acumulación de lípidos móviles por estimulación con forbol miristato acetato y ionomicina, el tratamiento con un inhibidor específico de la fosfolipasa C específica para PtdCho (PC-plc) inhibía dicha acumulación, lo que indicaba que el catabolismo de la PtdCho contribuía en parte a la acumulación de lípidos neutros y a la observación de resonancias de ML en el espectro de ^1H . En contraste con los resultados obtenidos para los timocitos, también observaron que la intensidad de las resonancias de ML generadas en esplenocitos estimulados no disminuía con la inhibición de la PC-plc, lo que podría indicar que en el caso de los esplenocitos otras enzimas (como la fosfolipasa A2 (pla2) y la fosfolipasa D (pld)) podrían estar implicadas en el catabolismo de la PtdCho en dichas células.

En un estudio de Ferreti y colaboradores de 1999 [74] se investigó la naturaleza y la localización subcelular de los ML en fibroblastos NIH-3T3 y sus transformados H-*ras*. En experimentos anteriores del mismo grupo de investigación [103] se había obtenido el resultado inesperado de que los fibroblastos transformados con el oncogen *ras* presentaban señales menos intensas de ML que los fibroblastos no transformados. Uno de los aspectos que estudiaron fue si la hidrólisis de la PtdCho se asociaba a la formación de ML mediante experimentos de inhibición selectiva de la fosfolipasa C o adición de fosfolipasa C exógena de origen bacteriano. La inhibición de la PC-plc daba lugar a una disminución del $20 \pm 10\%$ en el contenido de ML tanto de las células 3T3 como 3T3^{ras}, mientras que la adición de PC-plc aumentaba el contenido de ML de ambas líneas celulares. Según estos investigadores, sus resultados probaban la contribución de la hidrólisis de la PtdCho por la fosfolipasa C en la formación de ML y sugerían que los DAG eran unos posibles precursores o constituyentes de los ML. El grupo de Podo [104, 105] ya había sugerido previamente que estos DAG bien podrían ser utilizados por la célula como precursores de fosfolípidos o bien convertidos en TAG que se acumularían en gotículas tanto a nivel de membrana plasmática como de citoplasma, constituyendo una reserva de nutrientes para su uso en condiciones de oxigenación y perfusión sanguíneas bajas. Esta hipótesis estaría sustentada por los trabajos con técnicas histoquímicas y de microscopía electrónica de Freitas y colaboradores [106, 107], que observaron la presencia de gotículas lipídicas intracelulares mediante tinción con *Nile Red* en células hipóxicas (que se encontraban en el borde de la zona necrótica y a $130\ \mu\text{m}$ de un vaso sanguíneo) y en células necróticas de tumores inducidos en ratón (carcinoma de Ehrlich). También observaron un progresivo desplazamiento de la fluorescencia desde rojo hacia al amarillo para las membranas de las células pertenecientes al tumor. En

células teñidas con Nile Red, la fluorescencia amarilla se atribuye a lípidos neutros mientras que la fluorescencia roja proviene de fosfolípidos y otros lípidos anfipáticos [108], lo que interpretaron como la presencia poco corriente de dominios de lípidos neutros insertados en la bicapa lipídica. Los estudios por microscopía electrónica mostraron que las gotículas lipídicas citoplasmáticas se encontraban asociadas a mitocondrias en fase degenerativa, a partir de lo cual concluyeron que la aparición de gotículas lipídicas se asociaba a daño mitocondrial asociado a un proceso de isquemia. El proceso de hipoxia produciría una activación de las fosfolipasas de la membrana mitocondrial, con la consiguiente degradación de los fosfolípidos de dichas membranas, dando lugar a una liberación de ácidos grasos que se acumularían en forma de TAG.

Otros autores también han estudiado la relación entre hipoxia y acumulación de gotículas lipídicas intracelulares. El grupo de Bilheimer y colaboradores [109] detectó la presencia de gotículas lipídicas en la zona del miocardio en la que se había inducido isquemia por oclusión coronaria.

El trabajo de Kotitschke y colaboradores [110] reveló la presencia de resonancias de lípidos móviles en el espectro de ^1H de esferoides de tumores. Los esferoides son agregados de células que pueden llegar a tener diámetros de 1 mm o más, de forma que a una cierta distancia de la superficie las células empiezan a estar en condiciones de hipoxia, mientras que el área central del esferoide es necrótica. Por tanto, los ML visibles en el espectro de los esferoides podrían estar originados por los TAG acumulados en la zona hipóxica debido a la inhibición de la β -oxidación por falta de oxígeno y por las gotículas lipídicas que pudieran haber en la zona necrótica [110].

En la figura 1.23 se han esquematizado las vías de síntesis y catabolismo de los PL y lípidos neutros, mostrándose la relación que existe entre las diferentes vías metabólicas.

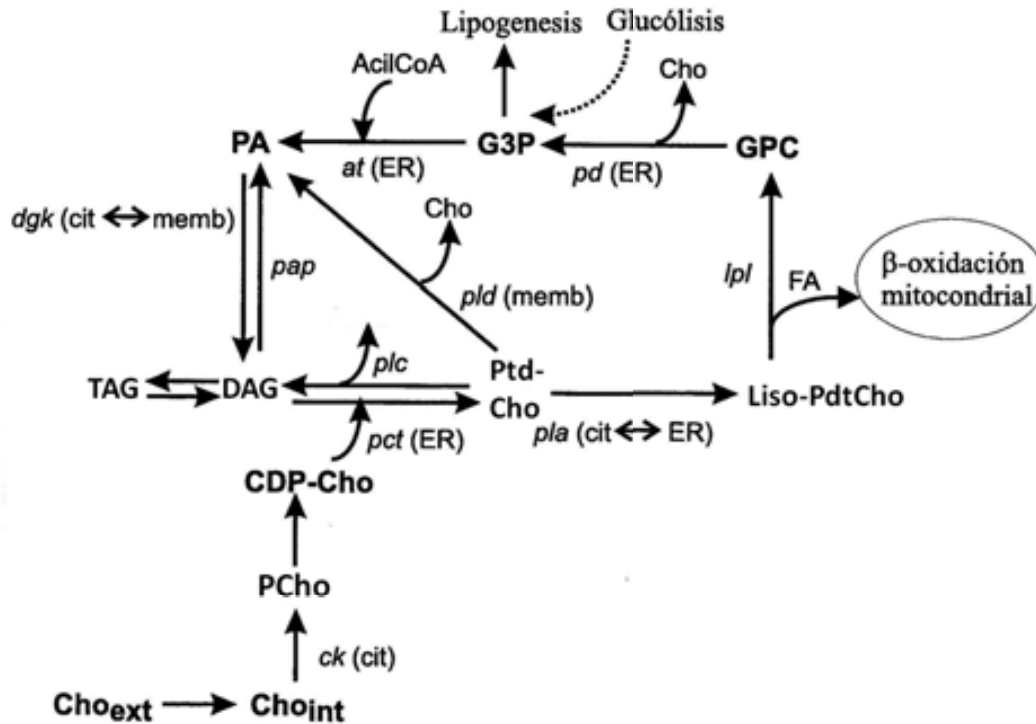


Figura 1.23. Representación de las vías metabólicas de síntesis y de catabolismo de fosfolípidos y lípidos neutros modificado de [[50, 111, 112]. AG, ácido graso; DAG, diacilglicerol; Cho, colina; G3P, glicerol-3-fosfato; GPC, glicerofosfocolina; Liso-PtdCho, lisofosfatidilcolina; PA, ácido fosfatídico; PtdCho, fosfatidilcolina, Pcho, fosfocolina, TAG, triacilglicéridos. Enzimas: ck, colina quinasa; ct, CTP fosfocolina citidiltransferasa; pct, fosfocolina transferasa; dgk ATP 1,2 diacilglicerol 3-fosfotransferasa; pap, fosfatidato fosfohidrolasa, plc, fosfolipasa C; pld, fosfolipasa D; pla, fosfolipasa A₁ y/o A₂; pd, fosfodiesterasa; at, glicerol-3-fosfato aciltransferasa; lpl, lisofosfolipasa; dkg, diacilglicerol transferasa. Localización: membrana celular (memb), ER (retículo endoplasmático), cit (citoplasma).

También se ha observado la acumulación de gotículas lipídicas en células a las que se les había inducido apoptosis [113-115]. En el trabajo realizado por Blankenberg y colaboradores [113] se describió que la inducción de apoptosis en células Jurkat-T mediante un agente quimioterapéutico iba acompañada por el aumento de la intensidad de la resonancia del grupo metileno a 1,26 ppm observada en el espectro de ¹H. Posteriormente Sathasivam y colaboradores [115] observaron que al tratar células humanas de mama HBL-100 con cloruro de tetrafenil fosfonio (TPP) se inducía apoptosis y un aumento de las resonancias de ML en el espectro de ¹H de estas células. Si las mismas células se trataban con clorpromazina, que inhibe la aparición

de TAG por inhibición de las fosfolipasas lisosomales y la fosfohidrolasa del ácido fosfatídico, se observaba una disminución de las resonancias de ML, lo que parecía inducir que estas enzimas estarían implicadas en la acumulación de lípidos neutros que tenía lugar durante el proceso de apoptosis. Hakumaki y colaboradores [114] detectaron la aparición de resonancias de ácidos grasos poliinsaturados y la acumulación de gotículas lipídicas citoplasmáticas durante un tratamiento de terapia génica de un glioma de rata con el que se inducía apoptosis, proponiendo que los ácidos grasos podían proceder de la degradación de la fosfatidilcolina de la membrana vía la enzima fosfolipasa A₂.

Además de todos los mecanismos citados anteriormente, Podo y colaboradores [104, 105] y Nadal y colaboradores [116] proponen otro posible mecanismo que podría contribuir a la desregulación de la síntesis de lípidos y colesterol en células de origen neoplásico. Concretamente, es un hecho conocido que en células tumorales, el ciclo del ácido tricarboxílico está truncado después de la síntesis de citrato [117]. La mayor parte del citrato es extruído desde la mitocondria al citosol, donde puede ser utilizado en la síntesis de ácidos grasos y colesterol [118]. Sin embargo, todavía no se ha estudiado si los ácidos grasos sintetizados a través de esta vía se acumulan en las células en forma de TAG (figura 1.24).

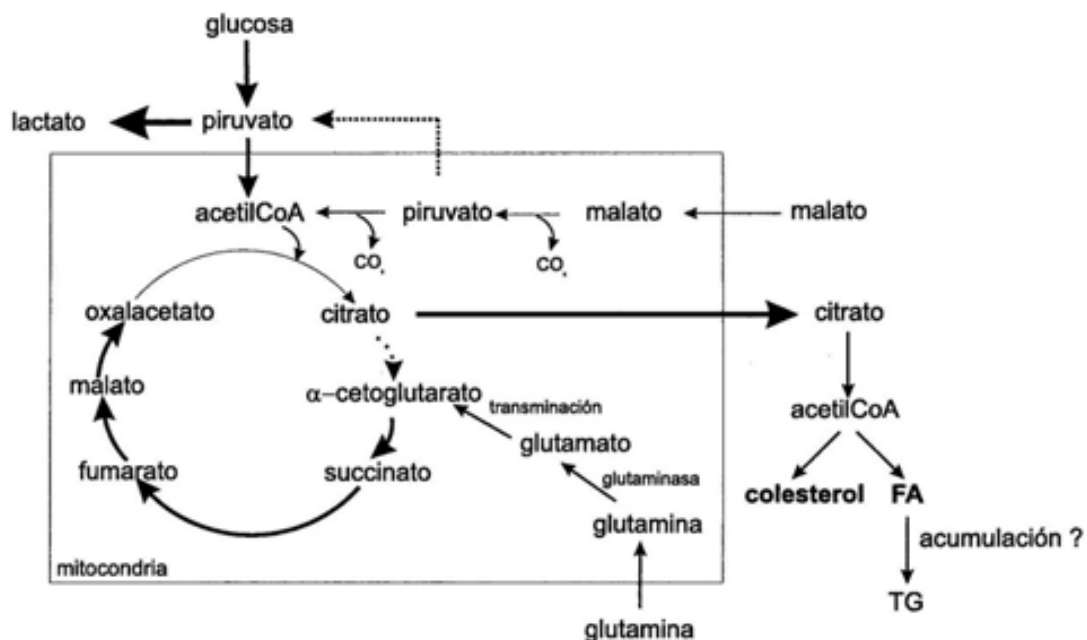


Figura 1.24. Ciclo del ácido tricarboxílico en células tumorales. Las flechas más gruesas indican vías preferenciales. Figura modificada de Nadal [116], Podo y Certaines [104].

En resumen, podrían existir varios posibles orígenes para los ácidos grasos que utilizan las células para la acumulación de ML:

-Origen anabólico: la parada de la proliferación celular podría provocar que los ácidos grasos fueran desviados hacia la síntesis de TAG y no de PL.

-Origen catabólico: procedentes de la degradación de los fosfolípidos de membrana por acción de las fosfolipasas C, D, A₁ y A₂, asociada a procesos de activación, transformación, apoptosis y necrosis.

Como ya se ha comentado anteriormente, las gotículas lipídicas citoplasmáticas pueden estar constituidas, además de por TAG, por ésteres de colesterol. Existen células y tejidos en los que sí se ha comprobado la presencia de ésteres de colesterol (detectados en la mayor parte de los casos mediante análisis químico de los extractos lipídicos) formando parte de las gotículas lipídicas citoplasmáticas, mientras que en otros casos no se ha detectado su presencia.

En un trabajo realizado por el grupo de Finstad [93] se investigaron los efectos de la exposición de células U937 (derivadas de la línea celular U937-GTB, que es una línea celular de linfoma) al ácido eicosapentanoico (*eicosapentanoic acid*, EPA). Una concentración de EPA de 60 μM disminuía la proliferación celular, sin afectar a la viabilidad celular. No obstante, a concentraciones mayores de EPA (120 μM) sí se detectaba apoptosis. En las células tratadas con EPA 60 μM se observó mediante microscopía electrónica la acumulación de gotículas lipídicas citoplasmáticas. Esta acumulación era reversible, ya que cuando las células eran reincubadas con medio sin EPA de forma que las células proliferaban a la velocidad normal, se producía la desaparición de las gotículas acumuladas en el citoplasma. También determinaron el contenido en TAG y colesterol del extracto lipídico total de células tratadas con EPA y de células sin tratar, observando que después de tres días de incubación con EPA la cantidad de TAG pasó de 5 nmoles TAG/mg de proteína a 78 nmoles de TAG/mg de proteína, mientras que la cantidad de colesterol era similar, lo que según ellos indicaba que las gotículas lipídicas estaban constituidas mayoritariamente por TAG.

En contraste con el resultado anterior, en el trabajo de Hirakawa y colaboradores [89], observaron que, en células a las que se les había transferido el gen *ras* y un gen sensible a la temperatura (SV40 T antígeno) y que presentaban inhibición del crecimiento celular cuando se trabajaba a una temperatura en la que el antígeno T no era estable, esta inhibición iba acompañada por acumulación de gotículas en el citoplasma (observadas mediante tinción con *Oil Red*). El análisis

mediante TLC de extractos lipídicos de células mantenidas a 39 °C mostraba la acumulación de TAG y ésteres de colesterol. También observaron que células cultivadas con suero humano deficiente en lipoproteínas no acumulaban ésteres de colesterol, mientras que la acumulación de TAG no se veía afectada. Otros autores también han observado la presencia de ésteres de colesterol formando parte de las gotículas lipídicas [119, 120]

Nygren y colaboradores [121] encontraron que la cantidad de ésteres de colesterol en gliomas humanos y en las zonas circundantes era 100 veces mayor (0,1-10 $\mu\text{mol/g}$) que en tejido sano ($<0,1 \mu\text{mol/g}$), mientras que la concentración de colesterol era menor en tumores que en tejido sano, aunque no comprobaron si estos ésteres de colesterol estaban presentes en forma de gotículas lipídicas citoplasmáticas.

Diversos autores describieron que el metabolismo del colesterol se encuentra alterado en procesos tumorales [121, 122]. Asimismo, también se observó en células tumorales un aumento de la biosíntesis del colesterol debido a una desregulación de la actividad de la enzima hidrometilglutaril CoA sintetasa (figura 1.25) (pérdida del control negativo por parte de la concentración de colesterol [123]) o un aumento de 6 a 14 veces de su actividad [124]. En otros estudios también se han observado alteraciones en el transporte intracelular debido a la pérdida de las proteínas transportadoras del grupo esterol SCP-2 [125] (figura 1.25).

Desde hace tiempo se han encontrado alteraciones en los niveles de lipoproteínas en plasma en pacientes con tumores [126]. Así se observa una disminución de la cantidad de HDL y LDL en plasma, debido a una mayor acumulación de ésteres de colesterol en el interior de las células y a una mayor necesidad de colesterol para la síntesis de nuevas membranas.

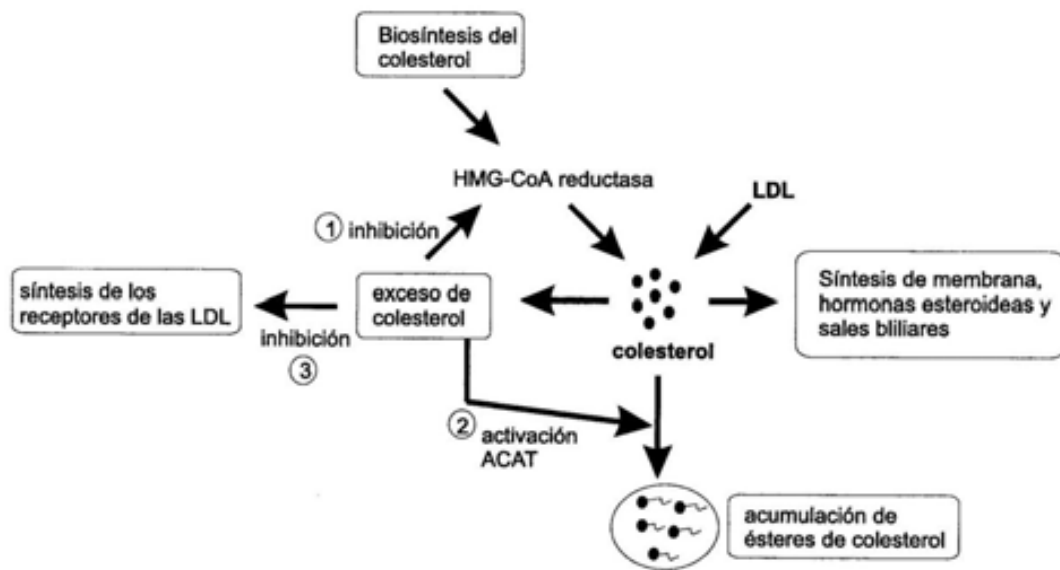


Figura 1.25. Acumulación de ésteres de colesterol en células tumorales. Figura modificada a partir de las publicadas por Campbell y colaboradores [127] y Cantafora y colaboradores [126]. En células normales las LDL del plasma son absorbidas por las células y degradadas. Las LDL (lipoproteínas de baja densidad) se unen a sus receptores en la membrana plasmática a través de las apolipoproteínas y se internalizan en forma de vesículas que después se funden con los lisosomas. En los lisosomas los ésteres de colesterol son hidrolizados a colesterol y ácidos grasos, mientras que las apolipoproteínas, los fosfolípidos y los triacilgliceroles son degradados. La acumulación de ésteres de colesterol en tejidos tumorales está asociado a una pérdida en el control metabólico de las etapas 1 y 3 indicadas en el esquema (el exceso de ésteres de colesterol no inhibe dichas etapas). En el caso de la etapa 2, se ha encontrado que en tejidos tumorales la enzima ACAT (colesterol aciltransferasa) presenta mayores niveles de expresión [128].

Dessi y colaboradores [122] observaron, en pacientes con neoplasmas malignos de pulmón, una acumulación de ésteres de colesterol y una disminución de los niveles de HDL en plasma. Estudios previos [129] aportaban una posible explicación para estas observaciones: un aumento en la actividad de la enzima ACAT y una reducción de la liberación del colesterol libre por parte de las células para la formación de HDL, indicaría que el colesterol procedente tanto de la síntesis intracelular como de la absorción por dieta es mayoritariamente almacenado en forma de ésteres de colesterol. Otros autores observaron [121] un aumento en el número de receptores de LDL en las células de tejidos tumorales.

En el caso de cultivos celulares *in vitro*, el colesterol almacenado en las gotículas podría proceder tanto de las lipoproteínas del suero con el que se cultivan como tener un origen anabólico. En la figura 1.26 se ha representado un esquema del transporte de ácidos grasos a/en/desde las células [130].

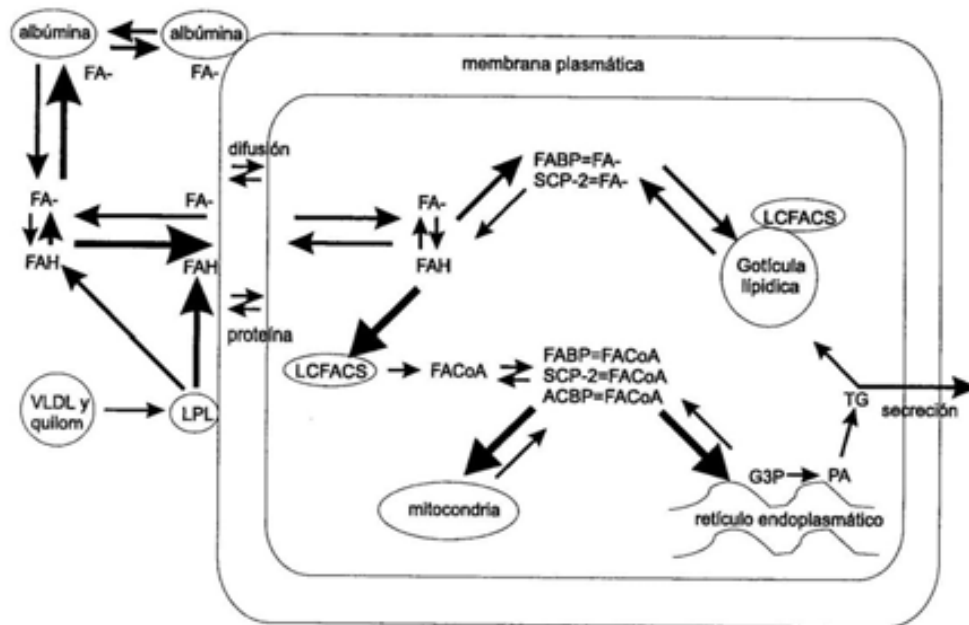


Figura 1.26. Tráfico de ácidos grasos a nivel celular adaptado de [130]. ACBP proteína de unión a los grupos acil-CoA (long chain acyl CoA binding protein); LCFACS acil-CoA sintetasa (long chain fatty acyl CoA sinthetase); SCP proteína transportadora de los grupos esterol (sterol carrier transporter); FABP proteínas de unión de los ácidos grasos (fatty acid binding protein); LPL fosfolipasa; quilom, quilomicrones; G3P glicerol-3-fosfato; PA ácido fosfatídico.

1.3.3 Las células C6 como modelo de estudio para los ML

La línea celular C6 derivada de tumor glial de cerebro de rata fue obtenida por primera vez en 1968 por Benda y colaboradores [131] y Schmidk y colaboradores [132]. Las células C6 están catalogadas actualmente por la *American Type Culture Collection* (ATCC#CCL-107) como células de tumor glial y son mutantes para el *locus p16/Cdkn2a/Ink4a* [133], caracterizándose por no expresar mRNA de *p16* y *p19ARF* y por ser *wild type* para *p53* [134]. Caracterizaciones moleculares más recientes han permitido revelar que los cambios en la expresión génica observados en las células de la línea C6 son muy similares a los descritos en tumores cerebrales humanos [135], lo que junto al gran conocimiento que se tiene de la cinética de desarrollo de los tumores

inducidos mediante inyección esterotáctica de células C6 como modelo preclínico de glioblastomas de dicha línea celular [136], ha llevado al uso de las células C6 como modelo de estudio en diversas líneas de investigación relacionadas con la neuro-oncología.

Asimismo, una de las principales razones por la que nos interesa esta línea celular como modelo de estudio de cáncer cerebral es su amplia caracterización previa en el grupo de investigación donde se ha realizado esta tesis. Las células C6 pueden mostrar señales de lípidos móviles de intensidad variable en función de sus condiciones de cultivo, habiéndose podido correlacionar la aparición de gotículas lipídicas con las señales de lípidos móviles en los espectros de tumores inducidos por estas células [137, 138]. También se ha podido demostrar dicha correlación directamente con las células C6 en cultivo [68, 79, 80, 94] observándose un aumento en la intensidad aparente de los ML entre la fase log y la fase post-confluente de la curva de crecimiento. Además, cuando se cultivan estas células con *artificial cerebrospinal fluid* (ACSF) y en ausencia de suero fetal para inducir la parada del crecimiento celular, se ha descrito un aumento incluso mayor, de hasta 21 veces respecto a la fase log para la resonancia de ML a 1.28 ppm [80]. Además, los estudios con microscopía de fluorescencia usando la tinción *Nile Red*, han demostrado un aumento en el volumen de las gotículas lipídicas citosólicas que correlaciona cuantitativamente con los resultados obtenidos por RMN. Sin embargo, cuando el contenido de lípidos neutros de estas células es cuantificado por cromatografía en capa fina en un extracto de lípidos totales de células C6, no se detecta un cambio significativo en el contenido de lípidos neutros en diferentes momentos temporales de la curva de crecimiento de las susodichas células [80]. Teniendo en cuenta estos resultados, parece que hubiera en las células C6 un pool “invisible” por RMN de lípidos neutros que se ha propuesto que podrían provenir de pequeñas gotículas lipídicas (de diámetro inferior a 100-200 nm) asociadas al citoesqueleto celular [80].

1.3.4 Las AOB como modelo de estudio para los ML

Todas las células tanto procariontas como eucariotas almacenan y movilizan lípidos en respuesta a necesidades específicas de las células o el organismo. La mayor parte de los tipos celulares contienen unos orgánulos citoplásmicos llamados cuerpos lipídicos que almacenan transitoriamente los llamados lípidos neutros (principalmente triacilglicerol). Como se expone en el apartado 1.2.1, diversos estudios realizados hasta el momento llevan a pensar que las señales de los ML

detectadas por RMN en células tumorales provienen en gran parte de estos cuerpos lipídicos contenidos en el citoplasma. Para profundizar en el origen subcelular y la dinámica de estas señales pueden emplearse gotículas lipídicas artificiales (*artificial oil bodies*, AOB) para modelar el patrón espectral de dichos lípidos neutros. Así, existen trabajos que describen la reconstitución de gotículas lipídicas artificiales estables de dos diámetros diferentes (500-2.000 nm y 50-200 nm) [139-141], en donde se simulan los cuerpos lipídicos de células vegetales, concretamente de semillas. Dichos cuerpos lipídicos son orgánulos de almacenamiento de entre 0,5 y 2 μm de diámetro y que están formadas por una matriz de triacilglicéridos recubiertos de una monocapa de fosfolípidos y proteínas. Dichas proteínas permiten reconstituir in vitro AOBs estables en cuanto a diámetro característico que permiten modelar las gotículas lipídicas naturales de otras células eucarióticas desde el punto de vista de las propiedades espectroscópicas de su contenido en triacilglicerol. Entre las proteínas asociadas a cuerpos lipídicos de semilla encontraremos la oleosina y la caleosina. La oleosina es una proteína constituida por tres dominios estructurales: un dominio anfipático N-terminal (4 kDa), un dominio de anclaje a membrana hidrofóbico central (8 kDa) y un dominio α -helicoidal anfipático C-terminal [142]. Por otro lado, la caleosina también tiene tres dominios estructurales: uno N-terminal hidrofílico con capacidad de quelación de calcio (4 kDa), un dominio de anclaje a membrana hidrofóbico central (4 kDa) y un dominio fosforilable hidrofílico C-terminal (12 kDa) [143]. En comparación con los cuerpos lipídicos nativos, las gotículas lipídicas artificiales constituidas con 10 veces más oleosina, fueron 2-3 veces más pequeñas que las formas nativas (con un diámetro promedio de 0,85 μm) y se caracterizan por poseer una mayor termostabilidad, hasta 60 °C. Al reconstituir artificialmente gotículas con caleosina se obtuvieron AOB 10 veces más pequeños y con mayor termostabilidad (hasta 70 °C) que los constituidos con oleosina [139]. Tanto oleosina como caleosina aportan un impedimento estérico y de repulsión electronegativa que hacen muy estables los cuerpos lipídicos, tanto en la célula como en preparaciones aisladas de AOBs.

Un modelo de este tipo, AOB básicamente conformados por triacilglicéridos en su interior y una monocapa de fosfolípidos (PL) y proteínas (caleosina y oleosina) en superficie (figura 1.27) permiten producir preparaciones estables de gotículas lipídicas modelo de diámetro controlado.

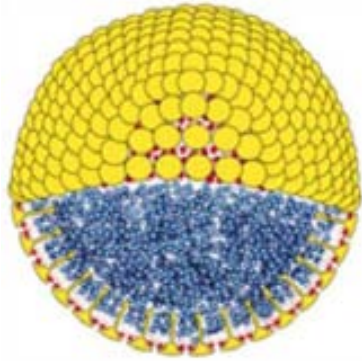


Figura 1.27. Imagen con un esquema de la estructura de los AOBs descritos en los estudios del grupo de Tzen [139-143]. El interior correspondería a los triacilglicéridos, (en azul) y en la cubierta habrían fosfolípidos (rojo) y proteínas (oleosina o caleosina en amarillo).

1.3.5 Modelos murinos de tumores cerebrales preclínicos

Aparte de los modelos celulares para el estudio o la simulación de los cambios que se producen en el metaboloma tumoral visibles por ERM, por ejemplo en su patrón de ML, es conveniente analizar otros modelos más cercanos a lo observable in vivo, es decir, en modelos animales preclínicos.

Actualmente se dispone de muchos modelos animales que desarrollan tumores cerebrales de manera parecida al ser humano y que, por tanto, permiten desarrollar estudios sobre la evolución de los tumores cerebrales o la respuesta a tratamientos. Así, para el estudio de los glioblastomas tenemos entre los modelos más usados los que se obtienen por inyección estereotáctica de células de glioma en el parénquima cerebral, bien de líneas celulares de ratón (modelos *allograft*) o de muestras obtenidas de biopsias de tumores humanos (modelos *xenograft*) en ratones inmunológicamente desprotegidos. Hoy en día la mayor parte de los modelos preclínicos de tumor cerebral estudiado son en ratones por tres razones fundamentales: reflejan bastante bien la fisiología humana, tienen ciclos de vida cortos y son fáciles de mantener a un coste relativamente bajo. En este sentido, la línea GL261 de glioma de ratón es una de las más utilizadas para el estudio de GBM y se inocular normalmente en animales de la cepa singénica C57BL/6 dando lugar a tumores con características invasivas e infiltrativas similares a las de los GBMs humanos [144].

Hay que tener en cuenta sin embargo que los modelos inducidos mediante inyección estereotáctica, a pesar de tener la ventaja de presentar un crecimiento rápido del tumor y de ser muy reproducibles no representan perfectamente algunas de las

características de los tumores cerebrales humanos: por ejemplo, capacidad angiogénica e invasividad. Por ello, se han desarrollado modelos de animales modificados genéticamente (*genetically engineered mice*, GEM) en los cuales los tumores aparecen de manera espontánea a lo largo de la vida de los animales, emulando mejor la progresión de la enfermedad en humanos, reproduciendo la progresión *in vivo* entre grados, lo que puede hacer conveniente la monitorización de dicha progresión *in vivo* mediante IRM/ERM. Estos modelos se basan en la expresión de transgenes o el silenciamiento *knock-out* de determinados genes involucrados en el desarrollo de tumores cerebrales humanos primarios [145, 146], por lo que son capaces de reproducir de manera más controlada algunos de sus patrones de progresión [147], aunque la capacidad de penetrancia con respecto a los modelos inducidos por inyección estereotáctica es más reducida.

1.4. Metodologías matemáticas de reconocimiento de patrones

Cuando se adquieren datos de espectroscopía de resonancia magnética, y concretamente para el objeto de esta tesis, de IERM, se obtienen numerosos espectros que contienen resonancias provenientes de diferentes metabolitos (como creatina, colina, alanina, lactato, lípidos móviles o N-acetilaspártato, en cerebro). Dichas señales pueden variar simultáneamente en función de que correspondan, por ejemplo, a tejido sano o patológico. Es por ello que desde hace más de veinte años, se propuso la conveniencia de realizar un análisis multivariante de la información espectroscópica [148].

En este sentido, se conoce como métodos de reconocimiento de patrones al conjunto de métodos estadísticos de análisis multivariante que permiten analizar varias resonancias (midiendo áreas o alturas) a la vez y ponderar su contribución relativa a un valor predictivo de clasificación [149]. También se denominan con el vocablo inglés *chemometrics* [150]. El reconocimiento de patrones pues, tiene como objetivo asignar de una manera objetiva valores por ejemplo, tipo de tejido, estado patológico asociados a determinadas variables, por ejemplo, las resonancias de los espectros de resonancia magnética [52, 151, 152].

En términos generales, los métodos de reconocimiento de patrones pueden dividirse en supervisados y no supervisados. Los métodos supervisados elaboran una o varias funciones matemáticas a partir de datos de entrenamiento previamente etiquetados. En este contexto, denominamos etiquetar a asignar una clase a un

espectro de resonancia magnética (caso de entrenamiento). El objetivo del aprendizaje supervisado es el de obtener una función capaz de predecir la clase de un espectro nuevo, no etiquetado, después de haber desarrollado una o más funciones predictivas con un grupo de casos (de espectros) de entrenamiento para los que sí conocemos la clase a la que pertenecen.

En el caso de los métodos no supervisados, los algoritmos no disponen de casos etiquetados (es decir, se desconocen los tipos o grados tumorales, en el caso de los datos de esta tesis) y se usan técnicas de agrupamiento o *clustering*, principalmente basados en el cálculo de distancias entre casos, que precisamente lo que pretenden es producir dichas etiquetas *a posteriori*. Este sistema de agrupamiento tiene como finalidad catalogar los objetos en conjuntos tales que los que estén en el mismo sean muy semejantes entre sí, mientras que el grado de semejanza entre grupos diferentes sea bajo. Los métodos no supervisados son una buena elección para realizar un análisis inicial de los datos por ejemplo, pero no son adecuados para realizar estimaciones predictivas en nuevos conjuntos de datos.

Los métodos no supervisados, como por ejemplo el análisis de componentes Principales (PCA), son aún ampliamente usados [153, 154], pero por las razones antes expuestas las aproximaciones usando métodos supervisados, como el Análisis Lineal Discriminante (ALD, o *Linear Discriminant Analysis*) [155], permiten una predicción más cómoda en casos nuevos[156].

Dentro de los métodos supervisados, uno de los más frecuentemente utilizados en el área de neuro-oncología es el ALD, como se acaba de mencionar. El ALD de Fisher es una variante del ALD, y en ambos casos, el ALD lo que hace es proyectar las variables en un subespacio dimensional menor, maximizando el ratio de varianzas inter-clase vs. intra-clase en el grupo de entrenamiento. En la figura 1.28 se muestra visualmente el fundamento del método. Normalmente, al graficar las variables (p.e. en la figura 1.28 las variables v_1 y v_2 , que podrían ser por ejemplo colina y creatina) se produce una mezcla de los casos; en la figura 1.28 las redondas azules pertenecerían a una clase de espectros mientras que las cruces rojas pertenecerían a otra clase. Sin embargo, si asumimos que v_1 y v_2 son variables de un espacio vectorial, será posible encontrar una proyección (sobre un vector w , en la figura 1.28) por la que las muestras se separen claramente [149].

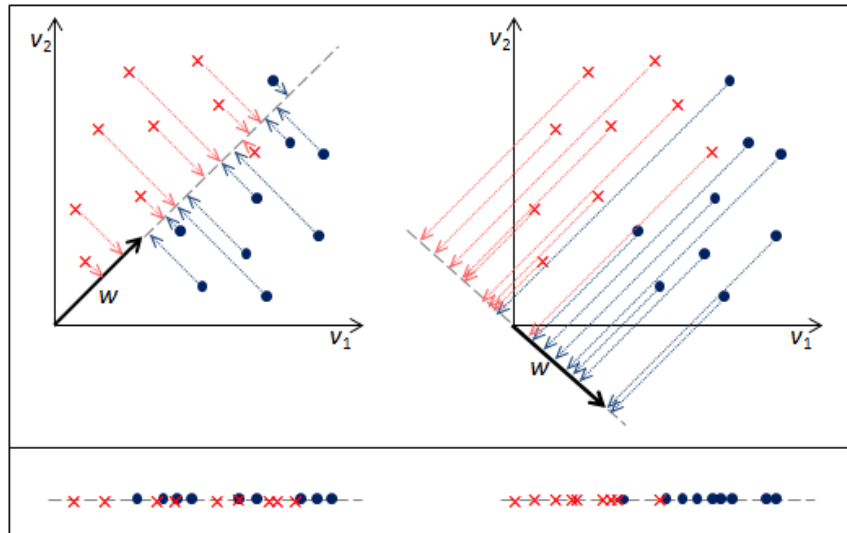


Figura 1.28. Efecto de elegir dos valores diferentes de w , donde w es un vector propio, para un ejemplo 2D. En la parte superior de la imagen, los casos de dos clases distintas (cruces rojas y círculos azules) se proyectan sobre un vector w . En la parte inferior se representa la proyección de las muestras de acuerdo al nuevo vector w . El ejemplo de la derecha muestra una mejor separación entre los puntos rojos y azules proyectados. Imagen tomada de la tesis de Sandra Ortega [157].

Una vez desarrollado un clasificador, es necesario aplicar métodos de evaluación para estimar la precisión del modelo. Algunos de los métodos para evaluar clasificadores basados en ERM se detallan a continuación:

- Porcentaje de error o *accuracy*. El porcentaje de casos correctamente clasificados con respecto al total de casos.
- Porcentaje de error ponderado o *Balanced error rate* (BER): Es el porcentaje de error de cada una de las clases, promediado. En un clasificador binario de la clase A frente a la clase B, BER es la media del porcentaje de error para cada una de las clases. n_A sería el número de casos de la clase A y e_A el número de casos mal clasificados. n_B sería el número de casos de la clase B y e_B el número de casos mal clasificados. Mientras la ratio de error vendría definida como $(e_A + e_B)/(n_A + n_B)$, BER viene definida como $\frac{1}{2}(e_A/n_A + e_B/n_B)$. BER es una herramienta muy útil cuando una clase poco representada se compara con otra clase con un mayor número de representantes [158].

- Matriz de confusión: representa el recuento de las predicciones de clase del clasificador respecto a los resultados reales. Cada fila de la matriz representa los miembros en una clase predicha, mientras que cada columna representa el número de casos de la clase original. Permite evaluar sensibilidad y especificidad del clasificador.
- Validación cruzada o *cross-validation*: es una técnica utilizada para evaluar los resultados de un análisis estadístico y garantizar que son independientes de la partición entre datos de entrenamiento y prueba. Consiste en repetir y calcular la media aritmética obtenida de las medidas de evaluación sobre diferentes particiones. Por ejemplo, una k-cross-validation resultaría de promediar los porcentajes de acierto, cuando se divide el conjunto de casos en k particiones.
- *Leave-One-Out (LOO)*: es un tipo de validación cruzada en el que se usa un caso del conjunto de entrenamiento para testear (*leave-one-out* significa literalmente “dejar uno fuera”) y el resto de casos se usan para entrenar. Este proceso se repite n veces para los n casos del clasificador, de forma que cada caso es usado como test una vez.
- *Bootstrapping*: este método se usa frecuentemente para aproximar el sesgo o la varianza de un análisis estadístico, así como para construir intervalos de confianza o realizar contrastes de hipótesis sobre parámetros de interés, ya que se trata básicamente de una serie elevada (típicamente entre 1.000 y 10.000 veces) de muestreos con reemplazo. El *bootstrapping* se considera mejor en términos generales, que la validación cruzada a la hora de estimar las estimaciones de error de clasificación [159].
- Curva *Receiver Operating Characteristic (ROC)* o “curva ROC”: es un gráfico en el que se representa la sensibilidad (proporción de verdaderos positivos) frente a 1-especificidad (proporción de falsos negativos) para un sistema de clasificación binario según se varía el umbral de discriminación [160]. Se complementa numéricamente con el área bajo la curva (AUC, *Area Under the Curve*), donde un test de eficacia máxima presentaría un valor AUC=1 y un test al azar se define con AUC=0,5 [161].
- Grupo de test independiente: está consensuado que uno de los métodos más robustos para validar la “corrección” de un modelo es usando un grupo de casos de test completamente independientes del grupo de entrenamiento. Este método permite evaluar qué tan extrapolables a una nueva población son los resultados obtenidos con un clasificador desarrollado, aportando información sobre la validez del modelo a la hora de generalizar [162]. Todas las medidas

anteriores pueden aplicarse al grupo de test independiente si los casos están etiquetados.

Con respecto al potencial translacional del análisis de datos de MRSI en tumores cerebrales, además de los ya mencionados trabajos clásicos de Preul y de Edelenyi [151, 152], enfocados al diagnóstico preoperatorio, recientemente se están explorando otros conceptos:

El grado de infiltración en tumores gliales, por ejemplo, con implicaciones en la planificación de la cirugía y/o radioterapia. En un trabajo reciente de Wijnen y colaboradores [163] se estudiaron los niveles de metabolitos en edema peritumoral y en cerebro aparentemente normal alrededor de regiones de glioblastoma, metástasis y meningioma en humanos con ^1H -MRSI y obtuvieron biomarcadores que permitieron discriminar glioblastomas de metástasis y meningioma y caracterizar el crecimiento tumoral infiltrativo, característico de glioblastoma donde la invasión de células tumorales se extiende a través de la región peritumoral aparentemente normal.

Otro aspecto es la evaluación del potencial de la progresión tumoral de gliomas de grado II y grado III según la Organización Mundial de la Salud, como por ejemplo en el trabajo de Hattingen y colaboradores [164] quienes encontraron que la proporción de concentraciones de creatina/fosfocreatina tenía un valor pronóstico para la supervivencia libre de progresión en pacientes con dichas patologías.

En estos dos aspectos radica la importancia de desarrollar modelos preclínicos predictivos que posteriormente puedan extrapolarse al estudio de los tumores cerebrales en humanos. El papel de las técnicas de reconocimiento de patrones redundan no sólo en una mejorada capacidad de discriminación al usar toda la información útil que existe en todo el espectro y no sólo una variable predictiva, sino también en la automatización del análisis de este tipo de datos, que ha sido tradicionalmente reconocido como dificultoso para los neuroradiólogos [39].

La IERM se viene usando desde hace más de 20 años para monitorizar la heterogeneidad metabólica de los tumores cerebrales humanos [48]. Desde entonces muchos esfuerzos se han centrado en la aplicación de técnicas estadísticas de reconocimiento de patrones [149] para mejorar la interpretación de datos de IERM de sujetos individuales. Esta aproximación se ha desarrollado básicamente dirigida al estudio de tumores cerebrales humanos tanto mediante ERM como IERM [151, 152, 156, 165-167], pero se han realizado menos estudios en modelos preclínicos [168].

Un ejemplo de la aplicación de este tipo de análisis estadístico basado en el reconocimiento de patrones espectrales es el software de soporte a la decisión, o su término inglés, *Decision Support System* (DSS) [169] inicialmente desarrollado bajo el proyecto europeo INTERPRET [39]. El objetivo de dicho proyecto fue desarrollar un software que permitiese automatizar la clasificación de tumores cerebrales humanos utilizando datos de ERM de vóxel único a 1,5 T y por ende, servir de ayuda a los radiólogos que no fueran expertos en espectroscopía o bioquímica, para la interpretación de los datos de ERM. En dicha DS, se incluyó un clasificador ALD diseñado para distinguir entre tres tipos principales de tumores cerebrales: meningiomas (grados I y II de la WHO); gliomas de bajo grado (astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas, todos de grado II) y tumores malignos de alto grado (GBM y metástasis) (figura 1.29).

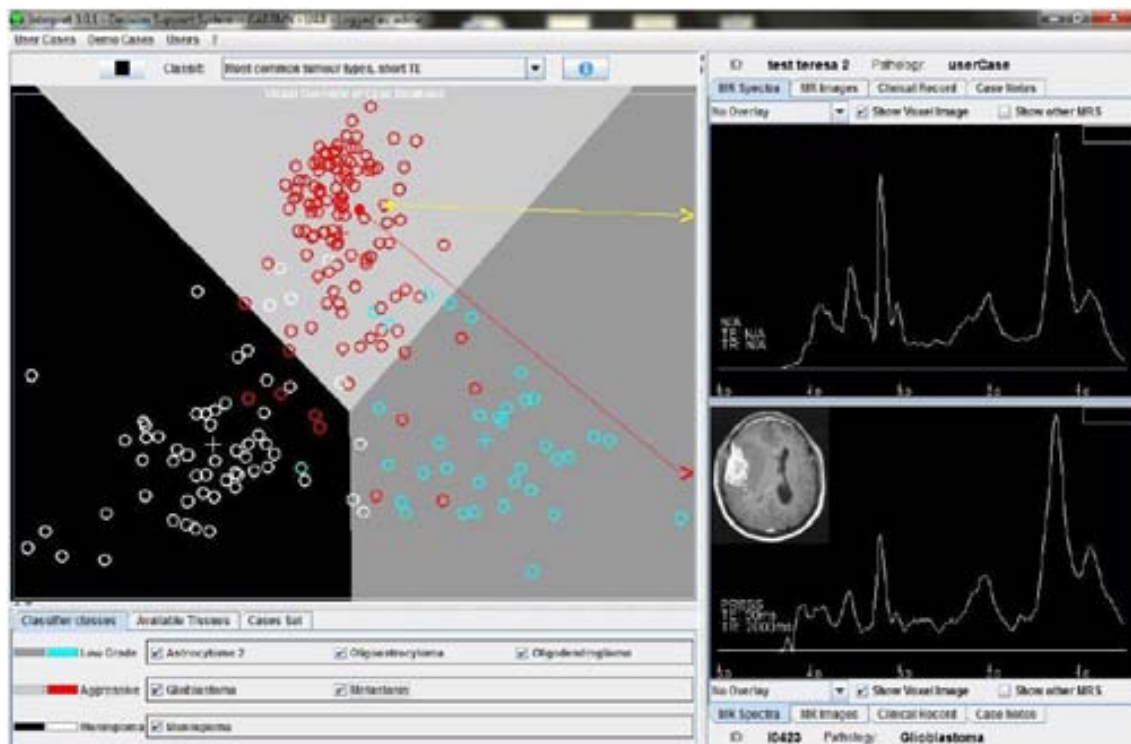


Figura 1.29. Pantalla del DSS v.3.0.1 de INTERPRET donde se muestra un ejemplo de clasificación de un espectro de glioblastoma. En el panel izquierdo se observa el espacio latente de Fisher en el cual se grafican los tres tipos tumorales principales de los que se obtuvieron casos en INTERPRET [170]. Se muestran en rojo los casos de GBM, en blanco los meningiomas y en azul claro los tumores gliales de bajo grado. El caso en amarillo es un caso problema o caso de test, de un paciente real, de patología desconocida. A la derecha, en el panel superior se muestra el espectro en estudio y en el panel inferior, un espectro de GBM vecino (con la imagen del vóxel a partir del que se obtuvo) [171].

Otro *software* desarrollado con el fin de obtener clasificadores de datos basados en el análisis de reconocimiento de patrones, pero en este caso centrado en el estudio de datos ERM e IERM es *Spectra Classifier* [172], que como se verá, ha sido empleado en esta tesis como herramienta para desarrollar los clasificadores estudiados. Este programa es una aplicación Java que permite a los usuarios crear clasificadores basados en ADL, utilizando diferentes tipos de datos pre-procesados de ERM o IERM y representando la información de una manera sencilla de interpretar mediante sus herramientas de visualización. Este *software* permite desarrollar clasificadores que contengan hasta cuatro clases diferentes. En la figura 1.30 se muestra una imagen de la pestaña que permite visualizar la posición de cada caso incluido en los grupos de entrenamiento y de test en la proyección espacial tras ADL de Fisher.

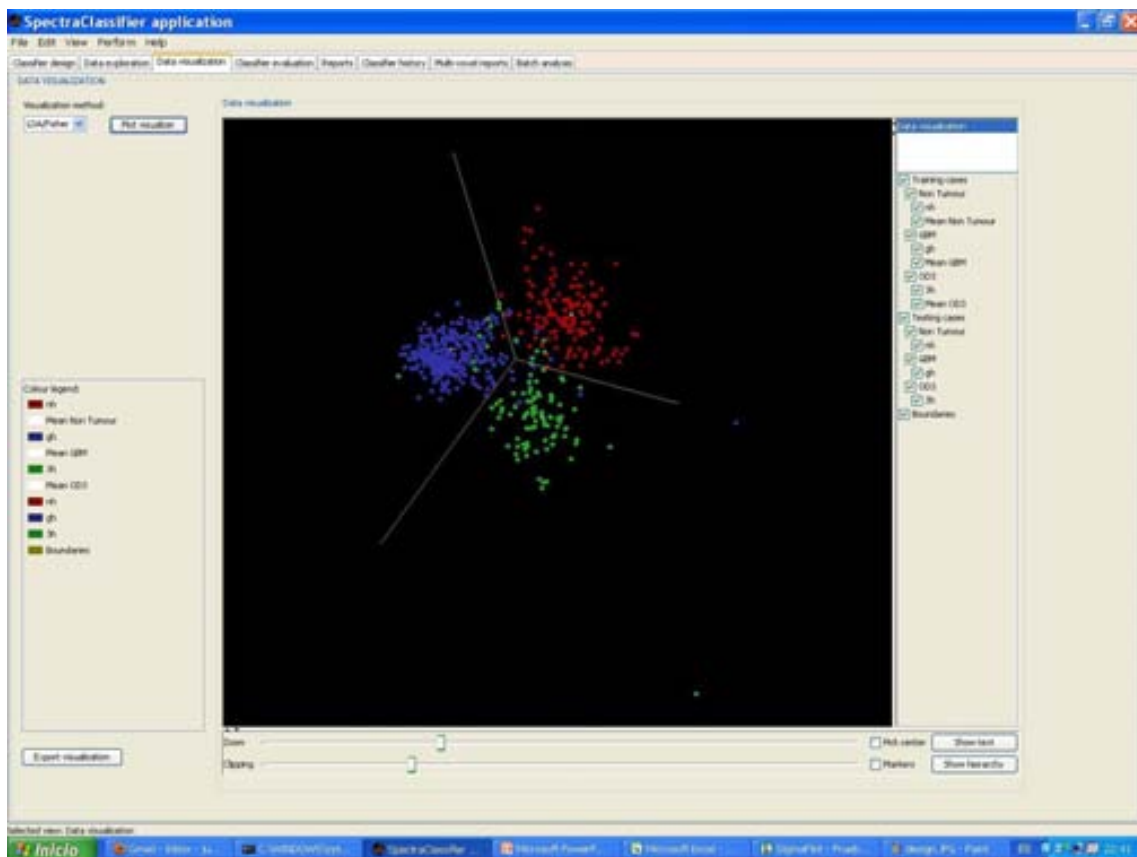


Figura 1.30. Pestaña de visualización de datos. En esta pestaña de *Spectra Classifier* se muestra la proyección espacial de un clasificador ADL de Fisher para muestras de parénquima cerebral sano, glioblastoma y oligodendroglioma de grado III.

Spectra Classifier V3.0 – la versión en distribución en el momento de escritura de esta tesis - contiene una pestaña que permite evaluar la precisión del clasificador desarrollado mediante los métodos de evaluación previamente descritos (figura 1.31). Entre los métodos de evaluación disponibles pueden encontrarse la matriz de confusión y curva ROC, para los grupos de entrenamiento y de test, y el *Balanced error rate*, *fold-crossvalidation*, *leave-one-out* y *bootstrapping* para el grupo de entrenamiento, entre otros.

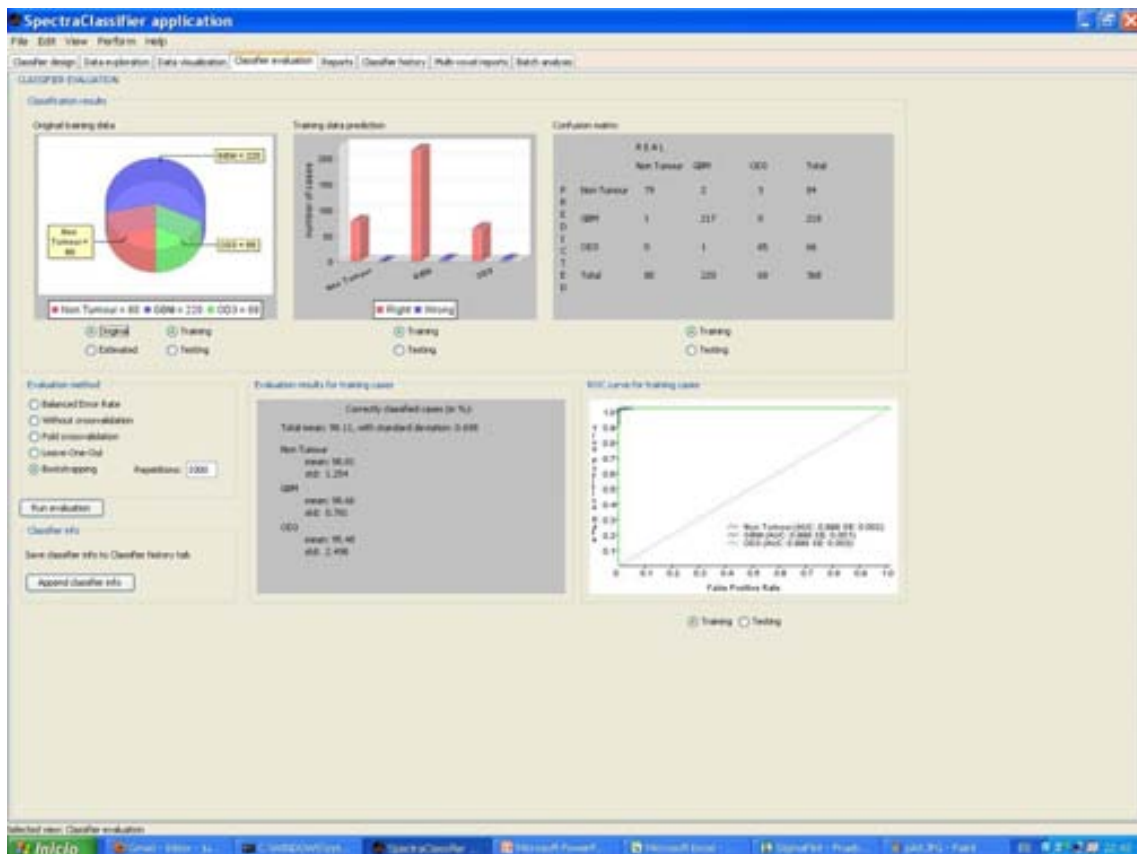


Figura 1.31. Pestaña para la evaluación del clasificador desarrollado con *Spectra Classifier*. Esta función permite estimar cómo funcionará el clasificador desarrollado con datos nuevos, adquiridos en condiciones similares, en el futuro.

2. OBJETIVOS

Los objetivos que se definieron en esta tesis, fueron los siguientes:

- Producir gotículas artificiales basadas en el uso de proteínas de oleosina y caleosina recombinantes, como modelo de gotículas lipídicas celulares de distinto diámetro promedio.
- Evaluar el efecto de “visibilización” de las resonancias de los “lípidos móviles” mediante espectroscopía de giro en ángulo mágico (HR-MAS), en células C6 de glioma de rata y en gotículas lipídicas artificiales.
- Evaluar el efecto de la asociación a una matriz sólida de gotículas lipídicas artificiales en el patrón de “lípidos móviles” detectado mediante HR-MAS.
- Mejorar los clasificadores automatizados basados en reconocimiento de patrones ERM/IRM para la gradación de gliomas preclínicos.

Objetivos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivos celulares

Los experimentos *in vitro* realizados en este trabajo que han requerido el uso de células han sido realizados con células de glioma de rata de la línea C6 del repositorio americano (*American Type Culture Collection*, ATCC).

Asimismo también se empleó la línea celular de glioma murino GL261 para producir un modelo de ratón con glioblastoma por inyección estereotáctica (ver sección 3.4). Se cultivaron igual esencialmente que las células C6, variando el medio de cultivo (RPMI, medio *Roswell Park Memorial Institute*) y que al ser la curva de crecimiento diferente, se cambiaba el medio a día 3 y 5 y se subcultivaban a día 7 de cultivo.

3.1.1. Condiciones de cultivo

Las células C6 ATCC se cultivaron de forma rutinaria para el mantenimiento de la línea accesible en flascos de 75 cm² (TPP, Barcelona) o de 500 cm² (Nunc, Labclinics), en caso de necesitar mayor número de células para realizar los experimentos de RMN. Las condiciones iniciales de cultivo fueron de 8.000 células/cm² y 0,5 ml/cm² de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) F12-HAM (Sigma) ajustando el pH a 7,2. Para preparar el medio se disolvió el polvo comercial en 800 ml de H₂O milliQ, se le añadió de bicarbonato de sodio ajustado a una concentración final de 14 mM para tamponar, se ajusta el pH a 7,2 con ácido clorhídrico y se enrasó la solución a 890 ml. El resto de la preparación del medio se realizó en una campana de flujo laminar. A continuación se le añadió al medio 100 ml de suero fetal bovino (GIBCO, Invitrogen Corporation) y 10 ml de una solución antibiótica que contenía 10.000 unidades de penicilina y 10 mg/ml de estreptomina en 0,9 % de NaCl (Sigma). El medio se esterilizó por filtración a través de una membrana GR Espresso de 0,22 µm de Ø (Millipore) en una botella previamente esterilizada en autoclave. Para el mantenimiento rutinario de las células se cambió el medio el día 3 de cultivo y se subcultivó a día 5, cuando llegaban las células a confluencia. Para realizar los experimentos de resonancia, se emplearon las células a día 4 de cultivo (fase logarítmica de crecimiento) o a día 7 de cultivo (fase post-confluente). A las células de día 4 se les cambió el medio el día 3 y a las células de 7 días se les cambió el medio los días 3 y 5 de cultivo. En todos los casos, las células

fueron mantenidas en un incubador (Heraeus Heracell 150, Thermo Scientific, EEUU) a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

3.1.1.1. Recuperación de células sembradas en flascos de 75 cm²

El primer paso fue eliminar el medio de cultivo aspirándolo con una pipeta Pasteur acoplada a una bomba de vacío, para después lavar las células con 10 ml de PBS y así eliminar bien cualquier resto de medio DMEM, que al contener suero fetal bovino podría inactivar la tripsina que se añadirá a continuación. Así, se adicionaron los 2 ml de tripsina-EDTA (0,5 g de tripsina y 0,2 g de EDTA-4Na por litro de solución salina de Hanks con fenol rojo) que se añadió a continuación para romper las uniones de las células al flascón. A continuación se añadieron 8 ml de medio DMEM para inactivar la tripsina y se agitaron las células con la pipeta automática para disgregarlas bien. Una alícuota de control de células se tiñó con *Trypan Blue* como se explica en el punto 3.1.3. y se sembraron para subcultivarlas en un nuevo flascón de 75 ó 500 cm², a la concentración inicial de 8.000 células/cm² y 0,5 ml/cm² de medio de cultivo.

3.1.1.2. Recuperación de células sembradas en flascos de 500 cm²

Cuando se necesitó una cantidad elevada de células C6, como es el caso de los experimentos de RMN, se cultivaron las células en flascos de 500 cm². Las células se sembraron en la misma proporción que en los flascos de 75 cm², pero para el lavado con PBS se emplearon 50 ml y para separar las células del flascón se emplearon 12 ml de disolución de tripsina. Se añadieron 36 ml de medio DMEM, se separó una alícuota de 100 µl para contar las células y el resto de la suspensión se centrifugó 3 minutos a 500 g. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 5 ml de PBS para lavar las células y eliminar los restos de medio. Se volvió a centrifugar y se descartó el sobrenadante. Se repite este proceso de lavado con PBS una vez más y en el tercer y último lavado se emplearon 5 ml de una solución de agua deuterada salina 0,15 M NaCl. Este es el *pellet* que se introduce en los rotores de HR-MAS para realizar los experimentos de RMN.

3.1.2. Tinción con *Nile Red*

Para evaluar si las células en día 4 y día 7 de cultivo tenían el contenido de gotículas lipídicas esperado, se comprobó con una tinción *Nile Red* (9-dimetilamino-5H- α -fenoxacina-5-ona, Sigma) la presencia de las mismas antes, de los experimentos por RMN. Este compuesto se ha descrito anteriormente para la visualización de lípidos neutros dentro de la célula, ya que es un colorante lipófilo [173]. Una característica muy importante de este colorante, es que su máximo de fluorescencia varía dependiendo de la hidrofobicidad del entorno, de forma que si se trabaja a longitudes de onda de excitación entre 450-500 nm y de emisión de más de 528 nm, se observa una fluorescencia amarillo-dorada que corresponde a los lípidos neutros; mientras que si se trabaja a 515-560 nm de longitud de onda de excitación y a 590 nm de emisión se observa una fluorescencia roja que corresponde a los fosfolípidos, otros lípidos anfipáticos y a los dominios hidrofóbicos de las proteínas de las membranas celulares. Por lo tanto trabajando en las condiciones de detección de la fluorescencia amarillo-dorada se pudieron observar las gotículas lipídicas citosólicas.

Una alícuota de células, recuperadas de los flascos como se describe en el punto 3.1.1.2., se resuspendió en 1 ml de solución de *Nile Red* de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ en PBS (a partir de una solución *stock* de *Nile Red* a 10 mg/ml en acetona, conservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se incubó en la oscuridad durante 5 minutos. Pasado este tiempo la muestra se centrifugó 3 minutos a 500 g y se eliminó el sobrenadante. Este paso se repitió una vez más y el *pellet* final se resuspendió en 100 μl de PBS y 10 μl de esta suspensión se colocaron en un portaobjetos y se tapó con un cubreobjetos para observar la muestra por microscopía óptica. Para visualizar bien las gotículas se trabajó a 100X con aceite de inmersión. Los experimentos de microscopía óptica se han realizado en el *Laboratori d'Anàlisi i Fotodocumentació d'Electroforesis, Autoradiografies i Luminiscència* (LAFEAL) y actualmente Laboratori de Luminiscència i Espectroscòpia de Biomolècules (LLEB) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Se empleó un microscopio Leica Qwin 500 (Wetzlar, Germany) con cámara Leica DC200 y *software* Leica DCviewer versión 3.2.0.0 (Leica Microsystems, Alemania).

3.1.3. Estudio de la viabilidad celular pre y post HR-MAS

Para realizar el estudio de viabilidad, se hicieron contajes de las células antes y después de los experimentos tiñéndolas con *Trypan Blue*. Para el contaje de las células antes de los experimentos con HR-MAS se tomó una alícuota de 10-40 μl de

células tras tripsinizar y se mezcló con 50 μ l de *Trypan Blue* 0,5 % p/v y se añadió PBS hasta ajustar el volumen final a 200 μ l. En el caso de las células hubieran sido usadas para un experimento de HR-MAS, se recuperan del rotor resuspendiendo el *pellet* con PBS y se sigue el mismo proceso de tinción. Para realizar el recuento de células vivas o muertas se empleó una cámara de Neubauer y se contaron al menos 200 células en cada muestra.

También se evaluó la supervivencia y capacidad de proliferación celular tras los experimentos por HR-MAS mediante un ensayo clonogénico, recuperando las células de los rotores y sembrando de nuevo en un flascón de 75 cm² con 10 ml de medio DMEM.

3.2. Preparación de AOB y controles lipídicos

El aprendizaje de todos los experimentos descritos en las secciones 3.2.1, 3.2.2 y 3.2.3 fue realizado en la Universidad Nacional Chung-Hsin (Taiwán) bajo la supervisión del profesor Jason Tzen.

3.2.1. Sobreexpresión de oleosina y caleosina en *E. coli*

Existen dos maneras de obtener oleosina y caleosina: directamente de semillas de sésamo como se describe en el punto 3.2.2. o introduciendo en células competentes de *E. coli* un plásmido que permita sobreexpresar las proteínas.

3.2.1.1. Preparación de células competentes de *E. Coli*

Se pueden preparar células competentes *E. coli* de la cepa BL21 (Novagen, Merk Millipore) si el objetivo es sobreexpresar la proteína de interés o de la cepa TOP10 si lo que se quiere es amplificar el plásmido que la contiene clonada [174].

De la suspensión bacteriana comercial se cogieron 15 μ l que se resuspendieron en 1 ml de medio LB (2,5 % p/v de agua milliQ, esterilizado en autoclave) sin kanamicina, porque aún no tenían el plásmido que les conferiría resistencia al antibiótico, en un tubo de ensayo estéril. Las células se incubaron *overnight* a 37 °C y en agitación a 250 rpm en un incubador (New Brunswick Scientific,

Innova 43). Se cogió a continuación una alícuota de 500 µl de la suspensión bacteriana que se resuspendió en 25 ml de medio LB sin kanamicina y se incubó 1 hora y media a 37 °C con agitación. Pasado este tiempo se colocó el matraz en hielo y a partir de este momento se debe mantener la muestra en hielo. Se transfirió la suspensión a un tubo de 50 ml y se centrifugó 15 minutos a 3.024 g a 4 °C (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter). El sobrenadante se desechó y el *pellet* se resuspendió con suavidad usando una pipeta en 5 ml de una solución 0,1 M de CaCl₂. Se dejó la muestra en hielo 30 minutos antes de volver a centrifugar 15 minutos a 3.024 g a 4 °C. El sobrenadante se volvió a desechar y el *pellet* se resuspendió esta vez en 2 ml de una solución 0,1 M CaCl₂ 15 % Glicerol. A continuación se preparan alícuotas de 100 µl de células competentes listas para transformar y se almacenan a -80 °C.

3.2.1.2. Preparación de geles SDS-PAGE

Se prepararon geles SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis*) para controlar la eficacia de la transformación, para comprobar la eficacia de la sobreexpresión de oleosina o caleosina, para purificar las proteínas del resto de componentes bacterianos y para comprobar la concentración final a la que se encuentra la proteína tras eluirla del gel.

El gel SDS-PAGE consta de dos partes, una de separación en la parte inferior del gel que contendrá un 12,5 % de acrilamida y una de empaquetamiento que contendrá un 4,75 % de acrilamida y que estará en la parte superior del gel (ver tablas 3.1 y 3.2). Según el protocolo que se siguió, se prepararon en una cubeta Mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) los geles de 8,6 X 6,8 cm o en una cubeta Owl Scientific modelo JGC-2 los geles de 14 X 16 cm.

Gel de separación	2 GP	4 GP	2 GG	4 GG	6 GG	8 GG
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml	5 ml	12,5 ml	25 ml	37,5 ml	50 ml
Agua destilada	3,2 ml	6,4 ml	16 ml	32 ml	48 ml	64 ml
30% Acrylamide:Bis (29:1)	4,17 ml	8,34 ml	20,8 ml	41,7 ml	62,5 ml	83,4 ml
10% SDS	0,1 ml	0,2 ml	0,5 ml	1 ml	1,5 ml	2 ml
Volumen total	10 ml	20 ml	50 ml	100 ml	150 ml	200 ml
10 % APS	25 μ l	50 μ l	125 μ l	250 μ l	375 μ l	500 μ l
TEMED	2.5 μ l	5 μ l	12.5 μ l	25 μ l	37.5 μ l	50 μ l

Tabla 3.1. Composición del gel de separación al 12,5 % de acrilamida (para proteínas de entre 15-20 kDa) siendo GP gel pequeño y GG gel grande y 2, 4, 6 y 8 corresponde al número de geles que se obtendrían con las cantidades sugeridas de compuesto. SDS, *sodium dodecyl sulfate*; APS, *ammonium persulfate*; TEMED, Tetrametiletilenediamina.

Gel de empaquetamiento	2 GP	4 GP	2 GG	4 GG	6 GG	8 GG
0,5 M Tris, pH 6,8	1 ml	1 ml	3 ml	6 ml	9 ml	12 ml
Agua destilada	2,3 ml	2,3 ml	6,9 ml	13,8 ml	20,7 ml	27,6 ml
30% Acrylamide:Bis (29:1)	0,63 ml	0,63 ml	1,9 ml	3,8 ml	5,7 ml	7,6 ml
10% SDS	40 μ l	40 μ l	120 μ l	240 μ l	360 μ l	480 μ l
Volumen total	4 ml	4 ml	12 ml	24 ml	36 ml	48 ml
10 % APS	25 μ l	25 μ l	75 μ l	150 μ l	225 μ l	300 μ l
TEMED	2,5 μ l	2,5 μ l	7,5 μ l	15 μ l	22,5 μ l	30 μ l

Tabla 3.2. Composición del gel de empaquetamiento al 4,75 % de acrilamida, siendo GP gel pequeño y GG gel grande y 2, 4, 6 y 8 corresponde al número de geles que se

obtendrían con las cantidades sugeridas de compuesto. SDS, *sodium dodecyl sulfate*; APS, *ammonium persulfate*; TEMED, Tetrametiletilediamina.

Las muestras se mezclaron con el tampón de carga (*stock* a una concentración 4x) para que dicho tampón quedara a una concentración final de 62,5 mM Tris-HCl pH=6,8, 2 % SDS, 5 % 2-β-mercaptoetanol, 0,004 % azul de bromofenol y glicerol al 10 %, y se mantuvieron a 100 °C durante 3-5 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular (Protein Marker II, Applichem) en el gel. Las muestras se corrieron a 200 V y 200 mA durante 45 minutos y se tiñeron durante 1 h en un agitador orbital en una solución de *Coomassie blue* al 0,125 % en 50 % de metanol y 10 % de ácido acético. Pasado este tiempo se destiñeron en agitación en una solución al 50 % de metanol y el 10 % de ácido acético y por último se pasaron a una solución al 5 % de metanol y el 7 % de ácido acético hasta que el fondo del gel quedó transparente y sólo quedaron teñidas las bandas que contenían proteínas.

3.2.1.3. Transformación bacteriana

Para realizar la transformación bacteriana se usó una de las alícuotas preparadas en la sección 3.2.1.1. (de la cepa BL21 o TOP10 según queramos sobreexpresar las proteínas contenidas en los plásmidos o multiplicar los plásmidos, respectivamente) y los plásmidos que contendrán la oleosina o la caleosina (ver anexo 7.2). La transformación se llevó a cabo por choque térmico, mezclando 2 µl de plásmido con la suspensión de células competentes que tenemos en *stock* y enfriando en hielo esta mezcla durante 20 minutos antes de introducir la suspensión en un baño de agua a 42 °C durante un minuto. A continuación la muestra se enfrió en hielo 5 minutos y se le añadió 1 ml de medio LB sin kanamicina y se incubó 1 h con agitación a temperatura ambiente.

Se prepararon placas de Petri con medio LB con kanamicina para poder seleccionar las bacterias que hubieran incorporado el plásmido. Para preparar las placas de Petri se elaboró medio LB a una concentración de 25 g/l y se añadieron 15 g/l de agar bacteriológico. Se autoclavó la solución a 121 °C durante 15 minutos y se añadió 1 ml del antibiótico (kanamicina 50 mg/ml). A continuación se rellenó cada placa de 100 mm de diámetro con unos 30 ml de medio, que se dejó solidificar hasta el día siguiente. Para sembrar las bacterias se utilizó una alícuota de 100 µl de esta

suspensión bacteriana con el plásmido incorporado que se extendió en una placa de Petri con un asa de siembra y se incubó *overnight* a 37 °C. Al día siguiente se seleccionó una colonia y se resuspendió en un tubo de ensayo con un 1 ml de medio LB con kanamicina (0,1 % v/v de una solución 50 mg/ml) y se incubó 8 h en agitación a 37 °C.

Del mililitro de suspensión bacteriana, 100 µl se reservaron para testear la eficacia de la transformación y el resto de las *E. coli* transformadas se guardaron para más adelante sobreexpresar la proteína añadiendo una solución de glicerol a 80 % para que quedaran a una concentración final del 15 % de glicerol y se almacenaron congeladas a -80 °C. A continuación, si para la transformación se han empleado células de la cepa TOP10, seguiríamos con el paso de amplificación del plásmido (3.2.1.3.) y si hemos usado la cepa BL21 seguiríamos con el paso de sobreexpresión de la proteína de interés (3.2.1.5.).

Para testear la eficacia de la sobreexpresión se tomaron 100 µl de esta suspensión y se resuspendieron en 3 ml de medio LB con kanamicina para incubarlos 2 h en agitación a 37 °C. A las 2 h se cogió una alícuota de 200 µl que se centrifugó 3 minutos a 16.000 g (Spectrafuge 24D, Labnet International, EEUU), se eliminó el *pellet* y se reservó. Al resto de la muestra se le añadió IPTG (isopropyl-β-D-Thiogalactoside) 0,5 M para que quede en una proporción 1:1000, para inducir la expresión de la proteína, e incubamos 3 h más. Pasado este tiempo, se cogió una alícuota de 200 µl que se centrifugó para eliminar el *pellet*. Estas dos muestras se analizaron en un gel SDS-PAGE, como se explicó en la sección 3.2.1.2.

3.2.1.4. Amplificación del plásmido

Para amplificar el plásmido para poder seguir transformando las bacterias, se empleó *E. coli* de la cepa TOP10 conteniendo el plásmido con oleosina o caleosina. Se resuspendió una alícuota de 15 µl de células transformadas en 3 ml de medio LB con kanamicina y se incubó 8 h con agitación a 250 rpm y a 37 °C. Pasado este tiempo se centrifugó 1 ml de la muestra en un eppendorf a 16.000 g 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Se volvió a añadir otro mililitro de medio y se volvió a centrifugar, con el objetivo de tener todas las bacterias de los 3 ml en el mismo *eppendorf*. A continuación para la purificación del plásmido se usó un kit comercial Gene-SpinTM-V³ (Protech Technology, China). Los plásmidos una vez purificados se conservaron a -20 °C.

3.2.1.5. Sobreexpresión de las proteínas

Para el protocolo de sobreexpresión [174] se usaron 20 μ l de *E. coli* BL21 ya transformadas con el plásmido que contenga oleosina o caleosina, según la proteína que queramos sobreexpresar y se los resuspendieron en 1 ml de medio LB con kanamicina y se incubó 8 h en agitación a 37 °C. Se cogieron 200 μ l que se resuspendieron en 25 ml de medio LB con kanamicina y se agitó a 37 °C *overnight*. Al día siguiente 10 ml de esta suspensión se pasaron a un matraz que contenía 390 ml de medio y se agitó la muestra a 37 °C. A las 2 h, se recogió una muestra de 200 μ l que se centrifugó 3 minutos a 16.000 *g*. El sobrenadante se eliminó y se reservó el *pellet* refrigerado en la nevera para posteriormente testear la eficacia de la sobreexpresión. Al resto de la suspensión bacteriana se le añadieron 400 μ l de IPTG 0,5 M para inducir la sobreexpresión de la proteína de interés y se incubó 3 h más. Se recogió una muestra de 200 μ l que se volvió a centrifugar y a reservar en refrigeración y a partir de este momento se mantuvo todo el rato la suspensión bacteriana refrigerada, de forma que el matraz que contenía las bacterias se mantuvo en hielo. Se vertió la mitad del volumen en un tubo de ultracentrifuga de 250 ml y se centrifugó la muestra 10 minutos a 3.024 *g* a 4 °C (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter). El sobrenadante se eliminó y se añadió el resto del volumen de la suspensión bacteriana en el mismo tubo para volver a centrifugar y tener todo el *pellet* en el mismo recipiente. El *pellet* bacteriano obtenido se resuspendió mediante vórtex en 40 ml de tampón fosfato pH=7,5 (10 mM Na-Pi). La muestra una vez bien resuspendida se pasó a un tubo de 50 ml y se sonicó (Sonics, VCX750) durante 20 minutos con una amplitud del 25 % y Pulse on=02 Pulse off=02. Tras la sonicación, se centrifugó la muestra 20 minutos a 20.442 *g* y 4 °C. Del sobrenadante se guardaron 10 μ l refrigerados para testear la eficacia del protocolo de sobreexpresión y el resto se eliminó. El *pellet* se resuspendió en 10 ml de tampón fosfato pH=7,5, se guardó una muestra de 10 μ l para evaluar la bondad del proceso y el resto se guardó congelado para continuar con el protocolo de purificación de las proteínas.

Disponemos de 4 muestras para controlar la eficacia con la que se ha llevado a cabo el protocolo de sobreexpresión que se analizarán en un gel SDS-PAGE como se explicó en la sección 3.2.1.2. Gracias al marcador de peso molecular (Protein Marker II, Applichem) se identifican las proteínas, que pesan 27 KDa (caleosina) y 17 KDa (oleosina) (figura 3.1).

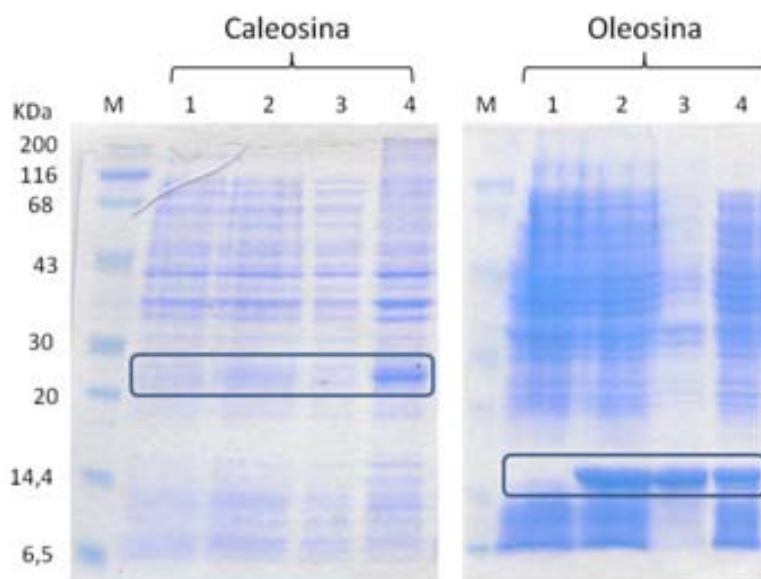


Figura 3.1. Control de la sobreexpresión de caleosina y oleosina en geles SDS-PAGE te idos con una solución de *coomasie blue*. Para ambas muestras la columna M corresponde a los marcadores de peso molecular, (1) es la muestra que se recoge a las 2h de cultivar *E. coli*, antes de aadir IPTG; (2) corresponde a la muestra que ha sido incubada 3h con IPTG, después se muestran las alícuotas tomadas tras sonicar las bacterias, siendo (3) la alícuota correspondiente al sobrenadante y (4) la del *pellet*.

3.2.1.6. Purificación de las proteínas de interés

En el *pellet* que se obtuvo tras sonicar las bacterias había una mezcla de componentes, por lo que se tuvo que purificar la proteína del resto de componentes que no interesan para este estudio. Se cogieron alícuotas de 1 ml del *pellet* y se mezclaron con 330 μ l del tampón de carga 4x que se calentaron 3-5 minutos a 100 °C. Se prepararon geles SDS-PAGE de 14 X 16 cm (para electroforesis preparativa) en una cubeta Owl Scientific modelo JGC-2 con gel de separación al 12,5 % de acrilamida y gel de empaquetamiento al 4,75 % de acrilamida. Se cargaron las muestras (aproximadamente 1 ml de muestra) en los geles SDS-PAGE y se corrieron 2 h a 200 V y 200 mA. Después se ti eron y se desti eron como se describe en el punto 3.2.1.7. Se identificaron las proteínas, que pesan 27 KDa (caleosina) y 17 KDa (oleosina) y se cortaron las bandas que las contienen (figura 3.2). Se guardaron a -80 °C y tras correr toda la muestra del *pellet* de caleosina u oleosina se eluyó la proteína te ida de interés del gel (sección 3.2.1.7.).

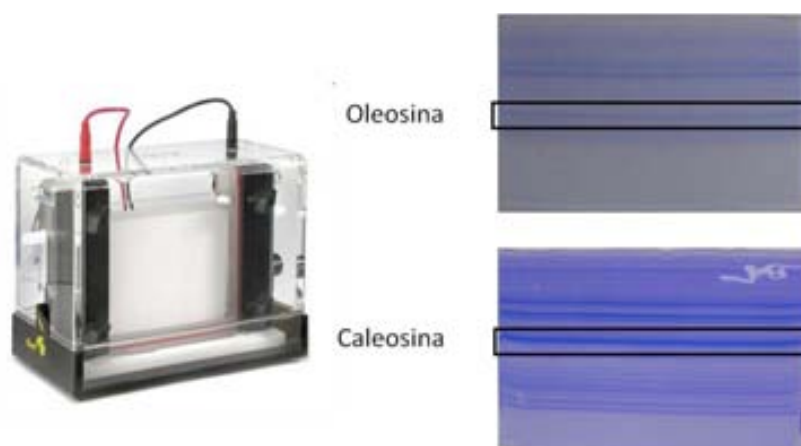


Figura 3.2. Selección de las bandas de oleosina y caleosina, tras correr las muestras en una cubeta grande, para cortarlas y posteriormente eluirlas del gel SDS-PAGE como se explica en la sección 3.2.1.6.

3.2.1.7. Elución de las proteínas de geles preparativos

Para eluir la proteína de interés del gel se colocaron las bandas del gel que hemos cortado previamente en un mortero con aproximadamente 4 ml de una solución 0,125 M Tris-HCl pH 8, 0,1 mM EDTA y 0,1 % SDS. La muestra se molió con fuerza hasta que quedó una pasta homogénea, adquirió un aspecto ligeramente espumoso y su color se aclaró. La muestra se pasó a un tubo y se centrifugó a 3.024 g durante 20 minutos (Heraeus Megafuge 1.0R, Thermo Scientific, EEUU). El sobrenadante se recuperó y se guardó, mientras que el gel se volvió a poner en el mortero y se volvió a moler y centrifugar dos veces más. Se combinaron los sobrenadantes resultantes de este proceso y se añadió acetona 1:1 previamente enfriada a -20 °C. Se mantuvo la muestra a -20 °C durante 15 minutos y se centrifugó a 3.024 g durante 20 minutos para precipitar la proteína. Se eliminó el sobrenadante y la muestra se resuspendió en tampón fosfato 10 mM Na-Pi pH=7,5.

A continuación se comprobó la concentración a la que estaba la proteína en el tampón fosfato. Para esto se preparó un gel de 8,6 X 6,8 cm de acrilamida con una escala de concentraciones entre 1 y 10 g de albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*, BSA) y en otro gel se puso una cantidad conocida de nuestra muestra. Los geles se tiñeron y destiñeron tal como se detalló en la sección 3.2.1.2. La concentración se calculó visualmente comparando la intensidad del color y la superficie de la banda con la escala de distintas cantidades de BSA (figura 3.3).

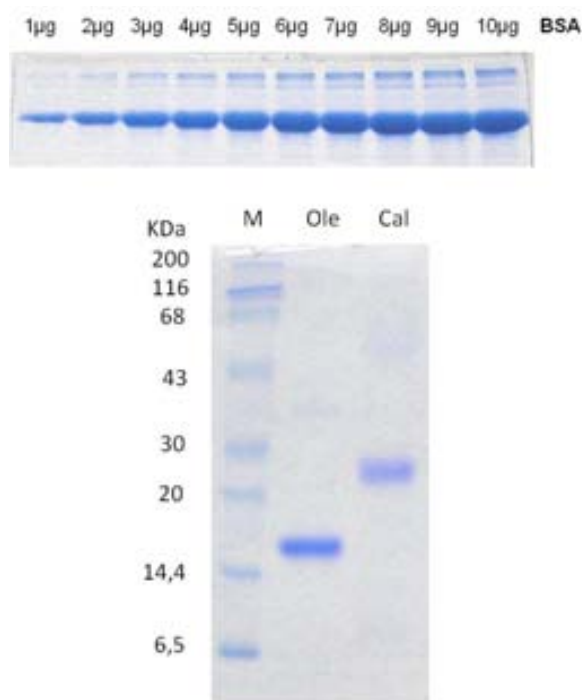


Figura 3.3. Ejemplo de cuantificación de las proteínas oleosina y caleosina en los geles SDS-PAGE teñidos con una solución de *coomassie blue*. En la parte superior de la figura se muestra una escala de concentraciones conocidas de BSA (*bovine serum albumin*) y en la inferior se muestran un ejemplo de SDS-PAGE de oleosina (ole) y de caleosina (cal) para ser cuantificadas realizando una estimación a partir de la escala superior, que en este ejemplo serían de aproximadamente 3 y 2 g/l, respectivamente.

3.2.2. Obtención de oleosina y caleosina de semillas de sésamo

Durante todo el proceso se mantuvo la muestra refrigerada en hielo, excepto en el tratamiento con urea, en que se trabajó a temperatura ambiente. Se usaron en este protocolo semillas de sésamo (*Sesamum indicum L.*, Tainan-1) obtenidas del *Crop Improvement Department, Tainan District Agricultural Improvement Station*, en Taiwán.

Se partió de 10 g de semillas de sésamo que se mezclaron con 50 ml de una solución 10 mM Na-Pi, pH=7,5 y 0,6 M de sacarosa y que se homogeneizó en una batidora. La mezcla se filtró a través de 3 capas de gasa. Se separó el filtrado en 3 tubos de 50 ml (quedaron aproximadamente 20 ml en cada uno) y se rellenó cada tubo con una solución 10 mM Na-Pi, pH=7,5 y 0,4 M de sacarosa (debería llegar aproximadamente a la marca de 42,5 ml del tubo) y se centrifugó la muestra a 3.024 g durante 20 minutos (Heraeus Megafuge 1.0R, Thermo Scientific, EEUU). Tras centrifugar la muestra, las gotículas lipídicas quedan formando una capa en la

superficie que se recolectó de los 3 tubos con una espátula y se colocó en un nuevo tubo que contenía 40 ml de una solución detergente 0,1 % Tween 20, 5 mM Na-Pi, pH=7,5 y 0,2 M de sacarosa y se mezcló bien la muestra con la solución detergente con un Polytron a 2.500 rpm 15 segundos hasta que se formó una suspensión homogénea. Después se le dio a la mezcla un minuto de vórtex y se dividió en 3 tubos de 50 ml (deberían quedar unos 20 ml de muestra en cada tubo). Se rellenaron los tubos con una solución 10 mM Na-Pi hasta la marca del tubo de 42,5 ml y se volvió a centrifugar la muestra a 3.024 g durante 20 minutos. Se volvió a recolectar la capa de gotículas lipídicas que se formó en la superficie tras centrifugar y se colocó en un tubo de 50 ml que contenía 40 ml de una solución 10 mM Na-Pi, pH=7,5, 2 M NaCl, y 0,6 M de sacarosa y se mezcló bien con el Polytron a 2.500 rpm durante 15 segundos. Una vez más, se dividió la muestra en dos tubos de 50 ml y se rellenaron los tubos hasta 42,5 ml con una solución 10 mM Na-Pi, pH=7,5, 2 M NaCl, y 0,25 M de sacarosa. Se centrifugó la muestra a 3.024 g durante 20 minutos. Se recolectó la capa de gotículas lipídicas y se pasó a un tubo que contenía esta vez 20 ml de urea 9 M. Se mezcló bien mediante vórtex y se dejó la muestra en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 15 minutos a 75 rpm. Se rellenó el tubo con tampón fosfato (10 mM Na-Pi) hasta 42,5 ml y se centrifugó la muestra a 3.024 g durante 20 minutos. La capa de gotículas lipídicas se pasó a un nuevo tubo con 20 ml de una solución 10 mM Na-Pi, pH=7,5 y 0,6 M de sacarosa y se rellenó el tubo hasta 42,5 ml con una solución 10 mM Na-Pi, pH=7,5 y 0,4 M sacarosa para después centrifugar a 3.024 g durante 20 minutos. Se recolectó la capa flotante de gotículas lipídicas y se mezcló con 4 ml de una solución 10 mM Na-Pi, pH=7,5 y 0,6 M sacarosa y se guardó la muestra congelada a -80 °C.

Con esta muestra se siguieron los protocolos descritos en los apartados 3.2.1.6. y 3.2.1.7. para purificar y eluir la proteína respectivamente para poder usar la caleosina o la oleosina en la preparación de AOB. En las semillas de sésamo la cantidad de caleosina y oleosina es elevada y se pueden purificar y eluir directamente, aunque es más eficiente sobreexpresar los plásmidos.

3.2.3. Preparación de AOB

Para preparar las AOB se necesitó usar 225 µg de caleosina u oleosina, según el tamaño de gotículas que quisiéramos sintetizar. Teniendo en cuenta la concentración de proteína que se obtuvo tras la elución a partir de geles preparativos (sección 3.2.1.2.) se cogió el volumen necesario y se centrifugó la muestra en un

ependorf a 16.000 g 3 minutos para eliminar el sobrenadante y sustituirlo por el mismo volumen de tampón fosfato 10 mM Na-Pi pH=7,5 deuterado (el tampón fosfato ha de ser previamente liofilizado y resuspendido en agua deuterada, necesaria para experimentos de RMN). Se realizaron 2 lavados con el tampón deuterado para reducir el máximo la presencia de agua normal y aumentar la de agua deuterada. A continuación, la proteína se mezcló con 150 µg de dioleoil fosfatidilcolina (PL) (Sigma). Para obtener los 150 µg de PL se diluyó una cantidad conocida de fosfolípido en polvo en cloroformo y se prepararon alícuotas en *ependorf* que contenían 150 µg de PL. Después se dejó evaporar el cloroformo *overnight* en una campana de extracción de gases y se guardaron las muestras congeladas a -20 °C. A continuación, se añadieron 20 µl de TAG procedentes de aceite de sésamo, 400 µl de una solución 100 mM de creatina en tampón fosfato 10 mM Na-Pi pH=7,5, deuterado, y se completó el volumen final a 1 ml con tampón fosfato deuterado. Se mezclaron bien todos los componentes mediante vórtex y se dio un pulso de centrifuga (Labnet International Inc., modelo C1201-230V/DW41-230) muy suave (de aproximadamente 3-5 segundos presionando el botón de centrifugar). Se sonicó la muestra 20 segundos al 30 % de amplitud y *pulse on=02 pulse off=02*. Se puso la muestra en hielo 5-10 minutos para que se enfriara y se volvió a sonicar y a enfriar dos veces más. Tras la última sonicación se comprobó el tamaño de las gotículas en un microscopio confocal en el caso de las gotículas de oleosina (diámetro aproximado 0,5-2 µm) con una lente 100X con aceite de inmersión o por crío microscopía electrónica de transmisión (JEM-2011, *Servei de Microscòpia*, UAB) en el caso de las gotículas de caleosina (diámetro aproximado 50-200 nm).

Para visualizar los AOBs de caleosina por criomicroscopía, se introdujo una alícuota de 3 µl de muestra en un *grid* Cooper de malla 400 con soporte de carbono agujereado. Cada muestra se secó quedando una capa muy fina que inmediatamente se sumergió en etano líquido en la crio-estación de trabajo del Leica CPC. El *grid* se observó en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 2011 trabajando a un voltaje de aceleración de 200 kV. El microscopio está equipado con un *cryoholder* Gatan y las muestras se mantuvieron a -177 °C durante la adquisición de las imágenes.

3.2.4. Preparación de controles lipídicos

El objetivo de los controles lipídicos fue tener una muestra con el mismo contenido lipídico que las AOB pero sin estructura de gotícula, por lo que se empleó la

misma cantidad de lípidos que se emplean en las gotículas (20 µl de TAG y 150 µg de fosfolípidos) disueltos en cloroformo deuterado ajustados a 1 ml de volumen final. También se introdujo tetrametilsilano (TMS) como estándar interno para que esté a una concentración final de 20 mM. La mezcla se homogeneizó mediante vórtex.

3.2.5. Inmovilización de los AOBs en una matriz sólida

Los cuerpos lipídicos en el interior de las células tienen dos tipos de movimientos: oscilatorios (de menos de 1 µm sin una dirección definida) y de largo rango dependientes de microtúbulos, suponiendo desplazamientos de varios micrómetros dentro de la célula [175]. Para intentar emular el efecto de la asociación descrita entre el citoesqueleto celular a las gotículas lipídicas del interior celular [85, 86] y su posible efecto en la “visibilidad” por RMN de los ML, se fijaron AOB modelo a una matriz sólida según lo descrito por Khaleque y colaboradores [176].

Para inmovilizar los AOBs, se empleó como matriz sólida Sephacryl S-1000 (GE Healthcare, España). El Sephacryl S-1000 es una matriz rígida con ciertas características hidrofóbicas constituida por alil-dextrano/N-N'-metilenbisacrilamida y preparada en esferas de unos 50 µm de diámetro y con un límite de exclusión de partículas de unos 400 nm [177]. Esta matriz se activó, siguiendo principalmente el protocolo descrito por M. Mitani y colaboradores [176]. Estos experimentos se llevaron a cabo en colaboración con el grupo del Profesor Fernando Albericio, de la Universidad de Barcelona y bajo la supervisión de Myriam Royo y Gerardo Acosta, para producir un “brazo” covalente capaz de unirse a los fosfolípidos de los AOB. Todos los reactivos utilizados en las secciones 3.2.5. y 3.2.6., si no se indica lo contrario, fueron adquiridos en Sigma. El proceso desde el comienzo de la activación hasta su reacción con los AOBs consta de los siguientes pasos:

- Reacción del Sephacryl S-1000 con 1,4-bis(epoxipropoxi)butano

Se emplearon 39 ml de la suspensión de Sephacryl S-1000 que se lavó sucesivamente con 200 ml de etanol al 50 %, etanol al 25% y agua destilada en un embudo Büchner esmerilado con placa filtrante (tamaño de poro 5-15 µm) unido a un kitasato conectado a una bomba de vacío que permitía succionar el líquido. El gel húmedo resultante se colocó en un balón de vidrio se le añadió 14,2 g de 1,4-bis(2,3-epoxipropoxi)butano y 42 mg de borohidruro de sodio disueltos en 15 ml de una

solución acuosa 0,6 M de hidróxido de sodio para obtener la matriz con un grupo epoxi unido (figura 3.4). Esta suspensión se agitó 24 h a temperatura ambiente y después el gel se lavó abundantemente con 900 ml de agua destilada.

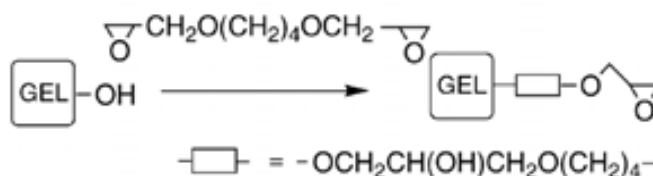


Figura 3.4. Esquema de la reacción que tiene lugar en el primer paso para la activación de la matriz sólida.

- Conversión a tiosulfato derivatizado (sal de Bunte)

El gel con el epoxi derivatizado se lavó (con 200 ml) de una solución de tampón fosfato 0,02 M (pH=6,86) y se suspendió ajustando a un volumen final de 42 ml con ese mismo tampón fosfato. A esta solución se le añadieron 20 ml de una solución acuosa 2 M de tiosulfato de sodio y la mezcla se agitó durante 36 h para formar la sal de Bunte (figura 3.5). El gel resultante se lavó con abundante agua destilada.

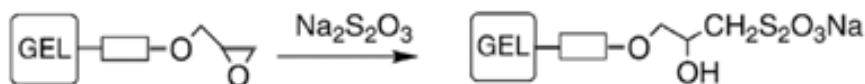


Figura 3.5. Formación de la sal Bunte.

- Reducción del tiosulfato derivatizado a grupo tiol

La sal de Bunte formada en el gel se colocó en un balón de reacción de 100 ml y se resuspendió en una solución acuosa 0,1 M de bicarbonato de sodio hasta que alcanzó un volumen final de 41 ml. A continuación se le añadieron 13 mg de ditioneol (DTT) disueltos en 9 ml de una solución 1 mM EDTA y se agitó durante 36 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. El gel resultante (figura 3.6) se lavó con 500 ml de una solución acuosa 0,1 M NaHCO_3 , que contenía 1 M de NaCl y 1 mM de EDTA y después se volvió a lavar con 100 ml de una solución 1 mM EDTA.



Figura 3.6. Esquema del resultado de la interacción de la sal de Bunte con el DTT para formar un gel con un grupo tiol.

- Bloqueo de los grupos mercapto con grupos tiopiridil

El gel con el grupo tiol se incubó con 38,8 mg de 2,2'-dipiridil disulfato disueltos en 200 ml de una solución acuosa 0,1 M de NaHCO₃ durante 24 h a temperatura ambiente, bajo atmósfera de nitrógeno. El gel resultante (figura 3.7) se lavó con 500 ml de agua destilada.

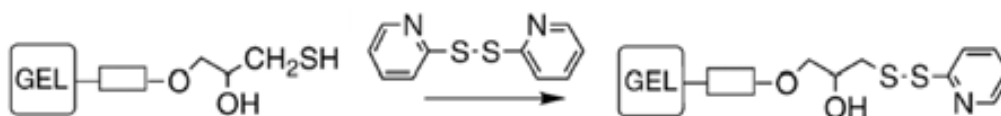


Figura 3.7. Proceso de bloqueo de los grupos mercapto con los grupos tiopiridil.

- Reacción del gel tiopiridil con octanetiol

En este último paso de la activación, se hizo reaccionar al gel con 40,2 μ l de 1-octanetiol disueltos previamente en 150 ml de etanol y 350 ml de solución HEPES, ajustando el pH a 7. Esta suspensión se agitó durante 48 h a temperatura ambiente, bajo atmósfera de nitrógeno. El progreso de la reacción fue monitorizado midiendo la absorbancia del sobrenadante a 343 nm tras pasar la muestra por HPLC (HPLC-MS Waters Alliance HT2795 con fotodiodo detector de UV-Visible modelo 1996, detector ELS 2420 y espectrómetro de masas Micromass ZQ; columna XBrige y XSelect de Waters con fase móvil de agua y acetonitrilo) y así comprobar también que el tamaño del compuesto coincide con el rango absorción de interés. El gel resultante se lavó con una solución acuosa al 30 % de etanol hasta que el olor a octanetiol desapareció. El gel activado se conservó a 4 °C (figura 3.8).

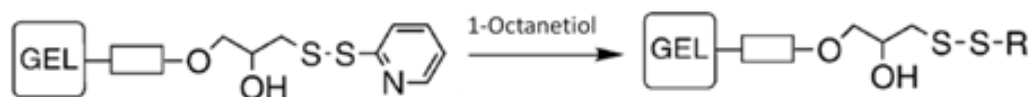


Figura 3.8. Esquema de la estructura del gel activado, listo para interactuar con las gotículas lipídicas.

- Interacción y reacción de los AOBs con el gel activado

Se pesaron 250 mg de matriz activada y se mezclaron con 500 μ l de solución de AOB (sección 3.2.3.). Esta suspensión se incubó 24 h a 37 $^{\circ}$ C en agitación (240 rpm). Pasado este tiempo, la muestra se centrifugó a 800 g durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con solución HEPES 0,1 M deuterado y 3 lavados con HEPES 0,1 M deuterado y 60 mM de fumarato como estándar interno (figura 3.9).

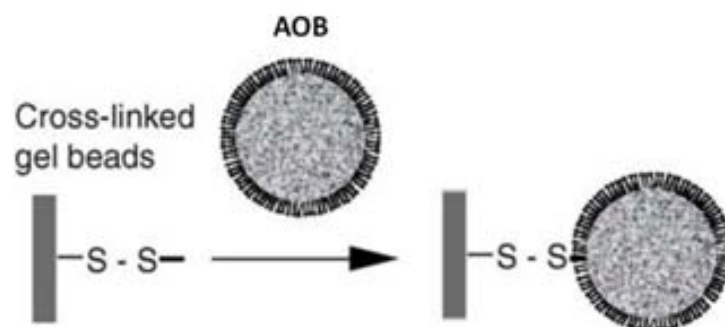


Figura 3.9. Reacción entre la matriz activada y los AOBs.

Para observar con microscopía electrónica de transmisión las muestras para valorar la unión de las gotículas a la matriz activada, las muestras se embebieron en una resina epoxi y fueron cortadas con un ultramicrotomo Leica EM UC6 empleando una hoja de diamante a 35 μ m (Diatome). Las secciones fueron teñidas con OsO₄ para realzar el contraste.

3.2.6. Liberación de las gotículas inmovilizadas

El gel de Sephacryl con los AOBs inmovilizados, se incubó con ditioneitol (DTT) en una concentración 0,1 M en HEPES pH 7,5 durante 24h en atmósfera reductora para favorecer la liberación de las AOB unidas a la matriz activada. La solución contenía 20 μ moles de DTT por μ mol de brazos de anclaje de octiltiol formados (cuyo

óptimo está estimado en 5,1 μ moles) [176]. La cantidad necesaria de la solución de DTT se introdujo en los rotores de HR-MAS (ver sección 3.3.) que contenían el gel de Sephacryl con gotículas AOB inmovilizadas de forma que el volumen máximo añadido de solución de DTT fuera de 3 μ l.

Tras la incubación de 24 h se adquirieron los espectros de las muestras por HR-MAS a diferentes velocidades como se describe en la sección 3.5.

3.3 Preparación de liposomas multilamelares

Para preparar liposomas multilamelares se emplean 0,8 ml de una solución de PL (fosfatidilcolina de soja) a una concentración 100 mg/ml en cloroformo. Dicha muestra se evapora en el rotavapor (Heidolph) a 30°C durante 20 minutos. Se hace pasar una corriente de nitrógeno durante 10 minutos para eliminar posibles restos de cloroformo. A continuación se añaden 2 ml de agua MilliQ y se agita en el rotavapor sellado con parafilm durante 3h a 150 rpm. Como estándar interno se le añadió creatina a una concentración final de 40 mM.

Para comprobar la formación de los liposomas y el tamaño de los mismos, se observó la muestra obtenida por microscopía confocal para poder observar la distribución de tamaños y con criomicroscopía para confirmar la multilamellaridad como se describe en la sección 3.2.3 para la observación de los AOBs.

3.4. Modelos preclínicos de tumores cerebrales

Para llevar a cabo los estudios de análisis del metaboloma tumoral mediante estrategias matemáticas de reconocimiento de patrones, se emplearon ratones aquejados de glioblastoma, oligodendroglioma (OD) grado II y ODIII. Para obtener el modelo con glioblastoma se implantaron células tumorales estereotácticamente, mientras que para obtener los modelos de oligodendroglioma se emplearon ratones transgénicos que desarrollan espontáneamente este tipo de tumores. Los ratones fueron mantenidos en el *Servei d'Estabulari* de la UAB de acuerdo a la legislación nacional y local (DOGC 07-08-97, Llei 214/1997; BOE 18-03-1988, RD 223/1988). Los estudios realizados con dichos animales se llevaron a cabo de acuerdo a los protocolos experimentales previamente aprobados por el comité de ética de la UAB de acuerdo con la legislación local y estatal (DMAH (*Departament de Medi Ambient i*

Habitatge)-4600; CEEAH (Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana)-1176; CEEAH-1391).

3.4.1 Glioblastoma

Para generar ratones de este modelo se siguió el protocolo descrito por S. Cha y colaboradores [178] en colaboración con Teresa Delgado y Milena Acosta del GABRMN. Se emplearon para ello ratones C57BL/6, hembras de entre 18 y 20 semanas de edad y con pesos comprendidos entre los 20-25 g. Dichos ratones se obtienen de los laboratorios Charles River (*Charles River Laboratories International*, L'Arbresle, Francia). Quince minutos antes de empezar la implantación de las células tumorales, se administró a los animales como analgesia 1,0 mg/Kg de Meloxicam (Boehringer Ingelheim España, S.A.) por inyección subcutánea. A continuación los animales se anestesiaron con una mezcla de 80 mg/Kg de ketamina (Parke-Davis S-L., Madrid) y 10 mg/Kg de xilazina (Carlier, Barcelona, España) vía intraperitoneal. Una vez dormidos, los animales se inmovilizaron en un sistema esterotáctico (Kopf Instruments, Tujunga/CA, EEUU), donde se exponía el cráneo del animal, para realizar una perforación en el mismo de 1 mm de diámetro con un microtaladro (*Fine Science Tools*, Heidelberg, Alemania) 0,1 mm posterior a Bregma (en sentido caudal) y 2,32 mm lateral a la línea media (derecha), en la zona correspondiente al estriado. A continuación, se inyectaron 4 µl de una suspensión celular que contenía 10⁵ células de glioma murino de la línea GL261 (obtenidas del *Tumor Bank Repository, National Cancer Institute-Frederick*, Frederick, EEUU). Se utilizó esta línea celular, porque los tumores que generan se han caracterizado previamente en nuestro grupo [63, 179]. Las células se inyectaron mediante una jeringa Hamilton de 26G (Sigma-Aldrich, Madrid, España), utilizando un inyector digital (Harvard Apparatus, Holliston/MA, EEUU) a una velocidad de 2 µl/min, a una profundidad de 3,35 mm desde la superficie del cráneo. Los animales se suturaron con seda del calibre 5/0 (Braun, Barcelona, España) y permanecieron a una temperatura aproximada de unos 25 °C bajo una lámpara de infrarrojos durante su recuperación de la anestesia. Una vez despiertos, se les administraba 0,05 mg/Kg de Buprenorfina (Buprex, Schering-Plough, Madrid, España) por vía subcutánea como analgésico y durante 2 días tras la operación se les administró Meloxicam cada 24 h (1,0 mg/Kg). Tras la implantación, la progresión tumoral se estudiaba por IRM como se describirá en el apartado 3.6.

3.4.2. Oligodendroglioma grado II y III

Para el trabajo descrito en esta tesis, se emplearon 5 ratones de la colonia S100 β -v-erbB/*Ink4a-Arf*(+/-) de OD de bajo grado [146], cuyos animales fundadores fueron obtenidos del repositorio *Mouse Models of Human Cancers Consortium* (MMHCC), *National Cancer Institute* (NCI) Frederick, EEUU. Estos animales presentan un alelo truncado del *endothelial growth factor receptor* (EGFR), denominado v-erbB, que se expresa bajo el control del promotor murino S100 β y cuya activación constitutiva contribuye a la aparición de ODs. Por otro lado, la alteración genética *Ink4a-Arf*(+/-), correspondiente a la delección de dos supresores tumorales (que afectan a las vías de Rb y p53) y que por sí sola provoca la aparición de tumores de alto grado, permite que los tumores de este modelo transicionen a grado superior (OD grado III). Los animales de la colonia se exploraron rutinariamente por el personal del *Servei d'Estabulari* de la UAB y cuando aparecían síntomas neurológicos indicativos de posible patología tumoral se exploraron por IRM, tal como se detallará en el apartado 3.6.1.

La presencia del transgen y de la alteración génica *Knock-out* fueron confirmadas por análisis de PCR añadiendo pequeñas modificaciones a los protocolos diseñados por el Dr. David Goldberg (*University of California*, San Francisco, EEUU) y el Dr. Dave Sims (MMHCC-NCI, USA). Así, el DNA se extrajo de una porción de cola, de aproximadamente 1 mm, de los animales con una solución de lisis estándar (50 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA, 0,2 % SDS, 20 mM NaCl, 100 mg/l proteinasa K) a 55 °C durante toda la noche. Para la amplificación del gen S100 β -v-ErbB se utilizaron los cebadores 5'-CTC ACA GRA ATC TCA AAG CTC CCC-3' y 5'-AGC CTC AAA GTC AGG TTG ATG AGC-3' (Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Germany) según lo descrito en [146]. Para *Ink4a-Arf*(+/-) se utilizaron tres cebadores diferentes, para poder analizar los dos supresores tumorales: 5'-GTG ATC CCT CTA CTT TTT CTT CTG ACT T-3', 5'-CGG AAC GCA AAT ATC GCA C-3' y 5'-GAG ACT AGT GAG ACG TGC TAC TTC CA-3'. El protocolo de PCR fue el siguiente: ([temperatura (°C)/duración (min)]/número de ciclos): [95/5]/1;[(95/1), (60/0,5), (72/2)]/29;[72/10]/1.

También se empleó un ratón de la colonia S100 β -v-ErbB; p53 (+/-) de oligodendrogliomas de bajo grado [146]. Estos ratones modificados transgénicamente comparten con los de la otra colonia el alelo truncado de EGFR, que se genotipó de la misma manera como se describió para la colonia anterior. Por otro lado, tienen inactivado heterocigóticamente el gen p53, que es un supresor tumoral. Para la amplificación del gen p53 se deben realizar dos PCRs con sus respectivos cebadores,

una para el alelo mutante (5'-GGG ACA GCC AAG TCT GTT ATG TGC-3' y 5'-TTT ACG GAG CCC TGG CGC TCG ATG T-3') y otra para el alelo *wild type* (5'-GTG TTT CAT TAG TTC CCC ACC TTG AC-3' y 5'-CTG TCT TCC AGA TAC TCG GGA TAC-3'). El protocolo de PCR para este gen fue el siguiente: [94/3]/1;[(94/1), (57/1), (72/1)]/29;[72/10]/1.

3.4.3. Histopatología

Una vez finalizados los estudios por IERM (sección 3.6.1.2), los animales se sacrificaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital (200 mg/Kg, 60 mg/ml; Dolethal, Vetequinol S.A. Barcelona, España). Se extrajeron los encéfalos y se fijaron en una solución de formaldehído al 4 %. Una vez fijados se incluyeron en parafina y se realizaron cortes seriados (cada 5 μm) para localizar la zona correspondiente al VOI de las secuencias de IERM para cada caso. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina para distinguir las zonas de tejido normal y tumoral y, en el caso de los animales GEM, para diagnosticar el tipo y grado de los tumores, con la colaboración y supervisión del Dr. Martí Pumarola (*Centre de Biotecnologia Animal i de Teràpia Gènica* (CBATEG), *Universitat Autònoma de Barcelona*). Las muestras de algunos animales con tumores fueron teñidas además con anticuerpo contra Ki67 (BD Biosciencias, Madrid), para determinar el nivel de proliferación celular [180].

3.5. Espectroscopía de RMN *in vitro*: HR-MAS

Los espectros de ^1H HR-MAS de las células C6 en fase log y post-confluente, de AOBs, controles lipídicos y liposomas multilamelares fueron adquiridos en el Servei de Ressonància Magnètica Nuclear (UAB) en un espectrómetro Bruker Avance III 9,4 T (Bruker Española S.A., Madrid, Spain).

3.5.1. Ajuste del ángulo mágico

El ángulo mágico al que gira el rotor basculante se ajusta antes de empezar los experimentos con un rotor relleno con bromuro de potasio (KBr) sólido girando a 6.000 Hz. La frecuencia de resonancia del Br-79 es muy próxima a la de C-13, por lo que se usan los canales de carbono para detectar su resonancia y ajustar con ella el ángulo

mágico. Así, se adquiere la señal con una secuencia de pulso y adquisición (anexo 7.3.1.) en modo de adquisición continua para poder detectar fácilmente el cambio en la intensidad de la señal al optimizar el ángulo mágico (figura 3.10). Para adquirir los espectros se seleccionó un *spectral width* (sw) de 749 ppm y un *time domain* (TD) de 2K.

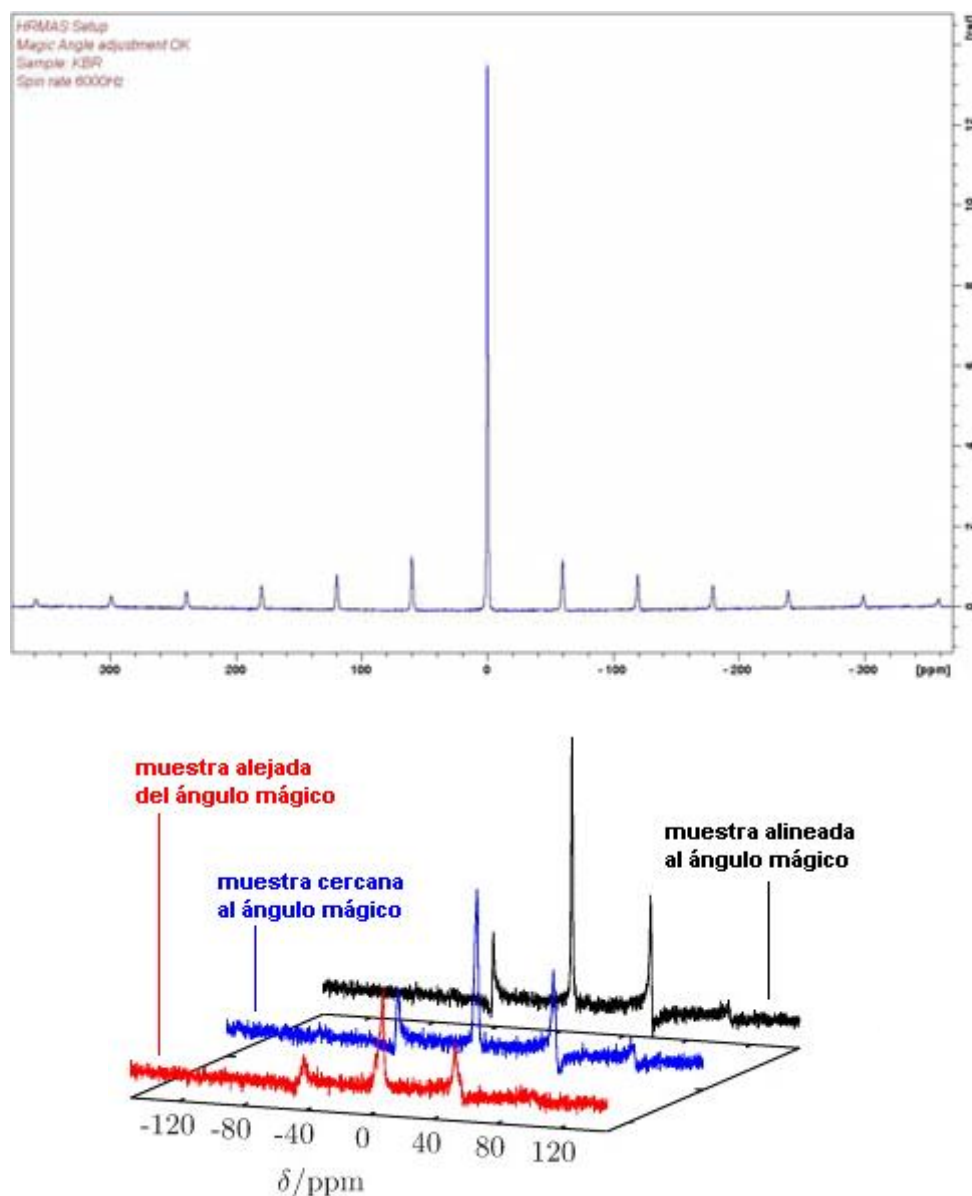


Figura 3.10. En la figura superior se muestra un ejemplo de ajuste del ángulo mágico con la muestra de KBr a 6.000 Hz. En la figura inferior se muestra una comparación de varios espectros obtenidos en el proceso de ajuste del ángulo hasta llegar al óptimo (negro).

3.5.2. Calibración de la temperatura

La calibración de la temperatura a 37 °C se llevó a cabo en todas las velocidades de giro de muestra utilizadas. Para dicha calibración se rellenó un rotor de HR-MAS con etilenglicol al 100 %, que permite calibrar la temperatura en el rango de 27 y a 107 °C. Para cada velocidad se adquirieron espectros con una secuencia de pulso-adquisición (anexo 7.3.1.). Se midió la distancia en ppm ($\Delta\delta$) entre los singletes correspondientes a los grupos $-\text{CH}_3$ y al $-\text{OH}$ del etilenglicol (figura 3.11) y se aplicó la ecuación 3.1 para calcular la temperatura real (en grados Kelvin) a la que se encuentra la muestra.

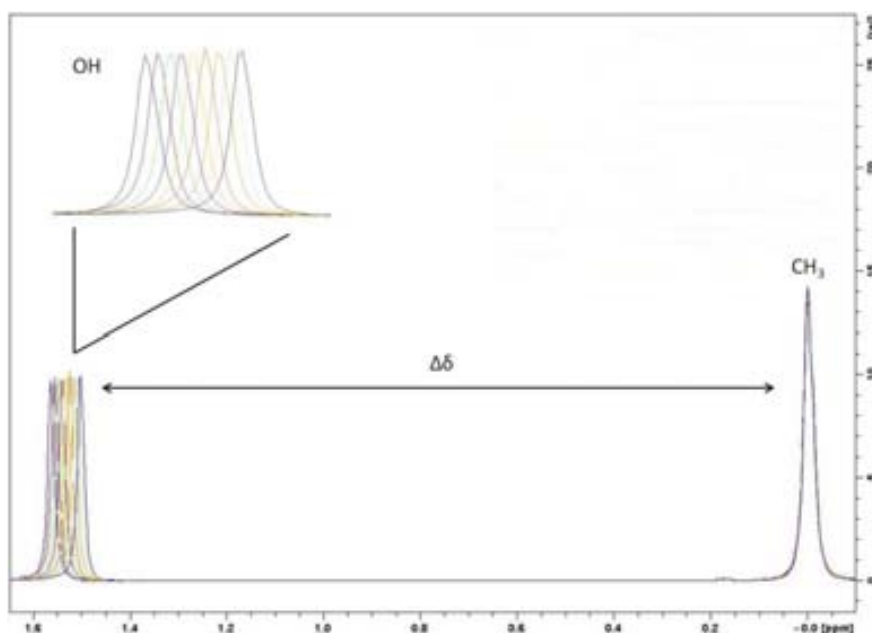


Figura 3.11. Espectros superpuestos adquiridos a diferentes temperaturas para calcular la temperatura real de adquisición en el interior del rotor de HR-MAS, donde se muestra cómo se mide el desplazamiento químico entre los singletes correspondientes a los grupos $-\text{CH}_3$ y al $-\text{OH}$ del etilenglicol.

$$T(\text{K}) = -101,24(\Delta\delta) + 466,4 \quad \text{Ec 3.1}$$

Con los datos obtenidos para diferentes puntos, se realizó una regresión lineal para obtener una fórmula que nos permitiera calcular a cada velocidad la temperatura que se debía programar en el controlador del espectrómetro para trabajar a la

temperatura real deseada. Estos cálculos se realizaron a 500, 1.000, 3.000, 6.000, 9.000, 12.000 y 15.000 Hz, obteniéndose una ecuación para el ajuste de la temperatura de sonda de HR-MAS deseada para cada velocidad (tabla 3.3).

Velocidad (Hz)	Ecuación
500	$y = 42,1133 + 0,8684x$
1.000	$y = 67,7695 + 0,7846x$
3.000	$y = 72,0429 + 0,7698x$
6.000	$y = 66,2873 + 0,7975x$
9.000	$y = 65,1830 + 0,8167x$
12.000	$y = 67,9969 + 0,8307x$
15.000	$y = 89,2401 + 0,7938x$

Tabla 3.3. Lista de ecuaciones para el ajuste de la temperatura de la sonda de HR-MAS en función de la velocidad de giro a la que se estudie la muestra, siendo “y” la temperatura real de la muestra dentro del rotor de HR-MAS y “x” la temperatura que se programa para la sonda que contiene el rotor.

3.5.3. Preparación de las muestras para analizarlas por HR-MAS

Para realizar los experimentos con HR-MAS, las muestras se montaron en rotores de zirconio de 50 µl (Cortecnet, Francia, figura 3.12).

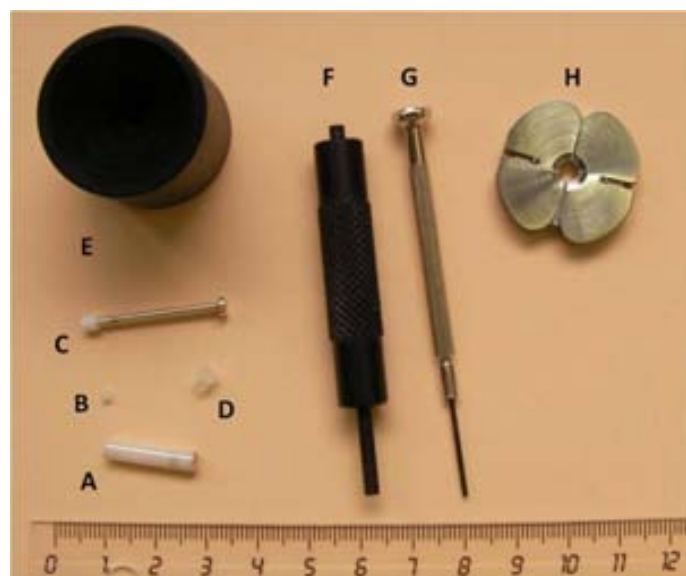


Figura 3.12. Rotores usados para HR-MAS y piezas de montaje: A, rotor de zirconio; B, tornillo que sella el espaciador; C, espaciador con el tornillo que se emplea para introducirlo en el rotor y sacarlo; D, tapón; E, herramienta para poner el tapón; F, herramienta para ajustar el espaciador; G, destornillador; H, extractor de tapas.

Las células C6 se recuperaron de los flascos como se explica en la sección 3.1.1.2. y se centrifugaron en NaCl 0,15 M preparado en agua deuterada a 500 g. El *pellet* obtenido tras centrifugar, fue introducido en el rotor con ayuda de una pipeta *Pasteur*. Cada rotor lleno del *pellet* de células pesó aproximadamente 57 mg y contenía unos 21 millones de células.

Tanto las suspensiones de AOB de caleosina como las de oleosina y los controles lipídicos se introdujeron en los rotors de zirconio con ayuda de una pipeta *Pasteur*. Las muestras de AOB pesaron aproximadamente 56 mg y las de controles lipídicos 70 mg.

3.5.4. Adquisición de espectros de HR-MAS de ^1H

Los experimentos se realizaron a 37 °C, calibrando previamente la temperatura como se indica en la sección 3.3.2 para cada una de las velocidades de giro empleadas. Los espectros fueron adquiridos a diferentes velocidades de giro: 500, 1.000, 3.000, 6.000, 9.000, 12.000 y 15.000 Hz. Para comprobar si los cambios en el patrón espectral eran reversibles, se adquirieron espectros adicionales a 3.000 Hz al inicio y al final del experimento.

En el caso de las células C6, se adquirió inicialmente un espectro de pulso adquisición (anexo 7.3.1.) preliminar a 3.000 Hz para comprobar que se podía saturar adecuadamente la señal del agua en los experimentos posteriores realizados a diferentes velocidades. En dichos experimentos se empleó una secuencia de pulso adquisición con presaturación de agua de 55 db de atenuación del pulso de irradiación durante 2,34 s (anexo 7.3.2.). En los experimentos con presaturación de agua, se empleó una ventana espectral (*spectral width, sw*) de 10 ppm, un TD de 16 K y se adquirieron 256 *scans*. El tiempo de reciclaje total fue de 4,05 s. En el caso de los AOBs y los controles lipídicos, se adquirieron secuencias de pulso adquisición, con un *sw* de 10 ppm, TD de 16 K, adquiriendo también 256 *scans* y un tiempo de reciclaje total también de 4,05 s. El tiempo total de adquisición HR-MAS a cada velocidad de giro fue de 17 min, con lo que el tiempo total de experimentación completo 3.000 Hz, 500-15.000 Hz, 3.000 Hz fue de aproximadamente 3h.

El *receiver gain* no se cambió durante la adquisición de los espectros a diferentes velocidades (tanto en las secuencias de pulso adquisición como de pulso adquisición con presaturación del agua), por lo que las intensidades espectrales de la misma muestra pueden ser comparadas directamente en términos absolutos.

3.5.5. Cuantificación de las resonancias de interés con Topspin

Una vez adquiridos los espectros, se les corrigió la fase y la línea de base manualmente usando el Topspin 2.5 (Bruker). Se calibró el desplazamiento químico ajustando la resonancia del grupo metilo de la creatina total a 3,03 ppm.

Las áreas de los metabolitos de interés se integraron para obtener las áreas relativas para poder comparar la posible variación entre las diferentes velocidades de giro. Para la región a 3,03 ppm la integración se realizó entre 2,86 y 3,09 ppm; para la región a 3,25 ppm, entre 3,24 y 3,26 ppm; para la región a 0,88 ppm, entre 0,55 y 1,05 ppm y para la región a 1,28 ppm la integración se realizó entre 1,52 y 1,06 ppm.

3.6. Estudios por RM *in vivo*

Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo en un imán horizontal de 7 T (BioSpec 70/30, Bruker Biospin, Ettlingen, Alemania) instalado en el *Servei de RMN* de la UAB, equipado con gradientes (bobina de gradientes B-GA12 insertada en un sistema de

gradientes B-GA20S) y una sonda de recepción de superficie en cuadratura, desacoplada activamente de una sonda de emisión de volumen de 72 mm de diámetro interno.

Los animales fueron colocados en una plataforma adecuada para el escáner y anestesiados con isoflurano 0,5-1,5 % en O₂, de manera que su patrón respiratorio se mantenía a frecuencia constante (60-80 respiraciones por minuto). La temperatura de los animales se mantuvo constante en hipotermia moderada a 28,5-29,5 °C por necesidades del protocolo de perturbación del metabolismo tumoral [63] por medio de un baño de agua recirculante conectado a la plataforma para animales. Tanto la temperatura rectal como la frecuencia respiratoria fueron monitorizados por el sistema SA Instruments, Inc., New York, USA. Además, los animales fueron estudiados en situación de hiperglicemia para lo que fueron inyectados i.p. 10 µl/g con una solución al 25 % (peso/volumen) de D-Glucosa en suero fisiológico.

3.6.1. Adquisición y post-procesamiento

3.6.1.1. Estudios por IRM

- Imágenes ponderadas en T₂ (T_{2w})

El crecimiento tumoral de los animales implantados con células de glioma GL261 se seguía mediante secuencias de alta resolución ponderadas en T₂ (T_{2w}-HR) en los planos coronal y axial, para determinar el momento adecuado para realizar el estudio IERM (ver sección 3.6.2.1.). Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: secuencia RARE, *echo train length*, 8; zona de observación (*field of view*, FOV), 19,2x19,2 mm; matriz (MTX), 256x256 (75x75 µm/pixel); número de cortes (*number of slices*, NS), 10; grosor de cada corte (*slice thickness*, ST), 0,5 mm; espacio entre los cortes (*gap*) 0,1 mm; TR/TE, 4200/36 ms; número de promedios (*number of averages*, NA), 4; tiempo total de adquisición (*total acquisition time*, TAT), 6 min y 43 s.

- Imágenes ponderadas en T₁ (T_{1w})

En el caso de tumores de animales GEM, se llevaron a cabo estudios pre y post inyección intraperitoneal de Gadolinio-DTPA (Magnevist, Schering, España) para detectar roturas en la barrera hematoencefálica y poder así orientar mejor el grado de la lesión. Se utilizó una secuencia ponderada en T₁ para detectar cambios en la captación de contraste (T_{1w}-CE) cuyos parámetros de adquisición fueron los siguientes:

secuencias Spin Echo con FOV, 17,6x17,6 mm; MTX, 126x128; NS, 3; ST, 1 mm; gap, 0,1 mm; TR/TE, 350/8,5 ms; NA, 1; TAT, 44 s 800 ms. La secuencia se adquirió antes y después de la inyección i.p. de Gd-DTPA (0,6 mmol/Kg).

3.6.1.2. Estudios por IERM

Las secuencias IERM permiten obtener información acerca de la heterogeneidad del patrón metabólico tumoral y del de su tejido circundante. Para ello se adquirieron inicialmente imágenes T_{2w} -HR en los planos axial, coronal y sagital como referencia para cada ratón estudiado. Puesto que dichos ratones fueron sometidos a perturbación metabólica (IERM-PM) por inyección intraperitoneal de glucosa (10 μ l/g de una solución al 25 % peso/volumen de D-Glucosa en suero fisiológico), se adquirieron secuencias de IERM a tiempo de eco corto (TEC, 12 ms) antes y 88 min después de la inyección del *bolus*, ya que previamente se había caracterizado en el GABRMN que el momento de máxima intensidad de detección de la perturbación del patrón espectral debido a la glucosa se producía a los 88 min [63].

Las exploraciones por IERM se adquirieron utilizando el método 2D *Chemical Shift Imaging* (CSI) con localización PRESS. Los parámetros utilizados fueron: FOV, 17,6x17,6 mm; Volumen de Interés (*volumen of interest*, VOI), 5,5x5,5x1,0 mm, colocado de manera que abarcara parte del tumor y de su tejido normal/peritumoral circundante; ST, 1 mm; TR, 2500 ms; SW, 4006,41 Hz; 512 NEX; TAT, 21 m y 30 s. La supresión de agua se efectuó con el método VAPOR (300 Hz de ancho de banda). Los *shims* lineales y de segundo orden fueron ajustados automáticamente con el método FASTMAP de saturación [181] en un volumen de 5,8x5,8x5,8 mm, dentro del cual estaba incluido el VOI. Seis bandas de saturación (ST, 10 mm; pulsos *sech-shaped*: 1,0 ms/20250 Hz) se posicionaron alrededor del VOI para minimizar la contribución de las señales provenientes del exterior. La resolución espacial obtenida quedó definida por una matriz de 8x8 vóxels en el FOV (4,84 μ l de resolución nominal). Posteriormente, mediante una interpolación de Fourier, se reconstruyó una matriz de 32x32, tal y como se describe en [63], lo que produjo una resolución final de 0,30 μ l/vóxel. En dicha matriz interpolada se encontraba el VOI seleccionado (10x10 vóxels).

3.6.1.3. Post-procesamiento de los estudios por IERM

Los espectros IERM fueron post-procesados como lo describió R. Simoes [63]. Así, los datos se procesaron inicialmente en una estación de trabajo dotada con

Paravision 5.0 (Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania) y después se post-procesaron con un *software* diferente: *3D Interactive Chemical Shift Imaging* v 1.9.10-3DiCSI [182], para aplicar el ajuste de *line broadening* (4 Hz de ajuste lorentziano), la transformada de *Fourier* y el fasado de orden cero y uno. Los datos en formato ASCII se exportaron y se utilizaron en MatLab (The MathWorks Ins., Natick/MA, EEUU) con otro módulo de *software* de procesamiento desarrollado por el GABRMN, DMPM [183] para alinear los espectros en cada vóxel de la matriz de IERM referenciándolos a la resonancia de la colina total a 3,21 ppm, cuantificar intensidades relativas de las resonancias de interés utilizando la altura de las señales en el espectro y codificar los resultados en mapas de color de 10x10 vóxels. Los espectros individuales fueron normalizados a *unit length* (UL2, ecuación 3.2) entre 0 y 4,5 ppm [184] y exportados en un formato compatible con el *software* Spectra Classifier v3.0 [172, 185] utilizado para el análisis de reconocimiento de patrones.

$$I_{normi} = \frac{I_{reali}}{\sqrt{\sum_0^{4,5} (I_{reali})^2}}$$

Ec 3.2

Donde I_{normi} es la intensidad normalizada para cada punto del espectro, i I_{reali} es la intensidad inicial para cada punto entre 0 y 4,5 ppm.

3.7. Estudio por reconocimiento de patrones de los datos de IERM

Con los datos de los estudios multivóxel (MV) obtenidos de los estudios con ratones aquejados de procesos tumorales y sometidos a perturbación del mataboloma mediante inyección intraperitoneal de glucosa, se procedió a realizar un análisis de reconocimiento de patrones. En total se emplearon 12 ratones con GL261, 3 ratones GEM con OD2 y 3 ratones GEM con OD3. Para desarrollar los clasificadores, cada espectro individual de las matrices de IERM adquiridas fue normalizado a *unit length* (UL2) y utilizado como unidad/caso (vectores espectrales) independiente. Las matrices espectrales obtenidas y procesadas de esta manera se dividieron en dos grupos: conjunto de entrenamiento para el “aprendizaje” del clasificador matemático y conjunto de test independiente para evaluar la robustez del clasificador desarrollado. Para ello, cada espectro individual de cada matriz de IERM fue etiquetado, indicando la naturaleza y utilidad de cada vector espectral en procesos de entrenamiento o test del

clasificador: nh= no tumoral, gh= glioblastoma, oh= oligodendroglioma grado II, 3h= oligodendroglioma grado III y x= aquellos vectores que no se incluyeron en el estudio porque no cumplían los criterios de selección de los vóxels. Para realizar dicho etiquetado, se siguió el siguiente criterio de selección de vóxels (figura 3.13): inclusión de la periferia tumoral, pero sólo seleccionando vóxels que contengan un único tipo de tejido. Los bordes externos de la matriz IERM se descartaron por tener una relación señal/ruido baja y también se descartan aquellos vóxels en los que se mezcle parénquima no tumoral y parénquima tumoral. Dicho criterio es ligeramente distinto al seguido anteriormente por Simoes [186], ya que en dicho estudio previo se excluyó la periferia tumoral para el desarrollo del clasificador.

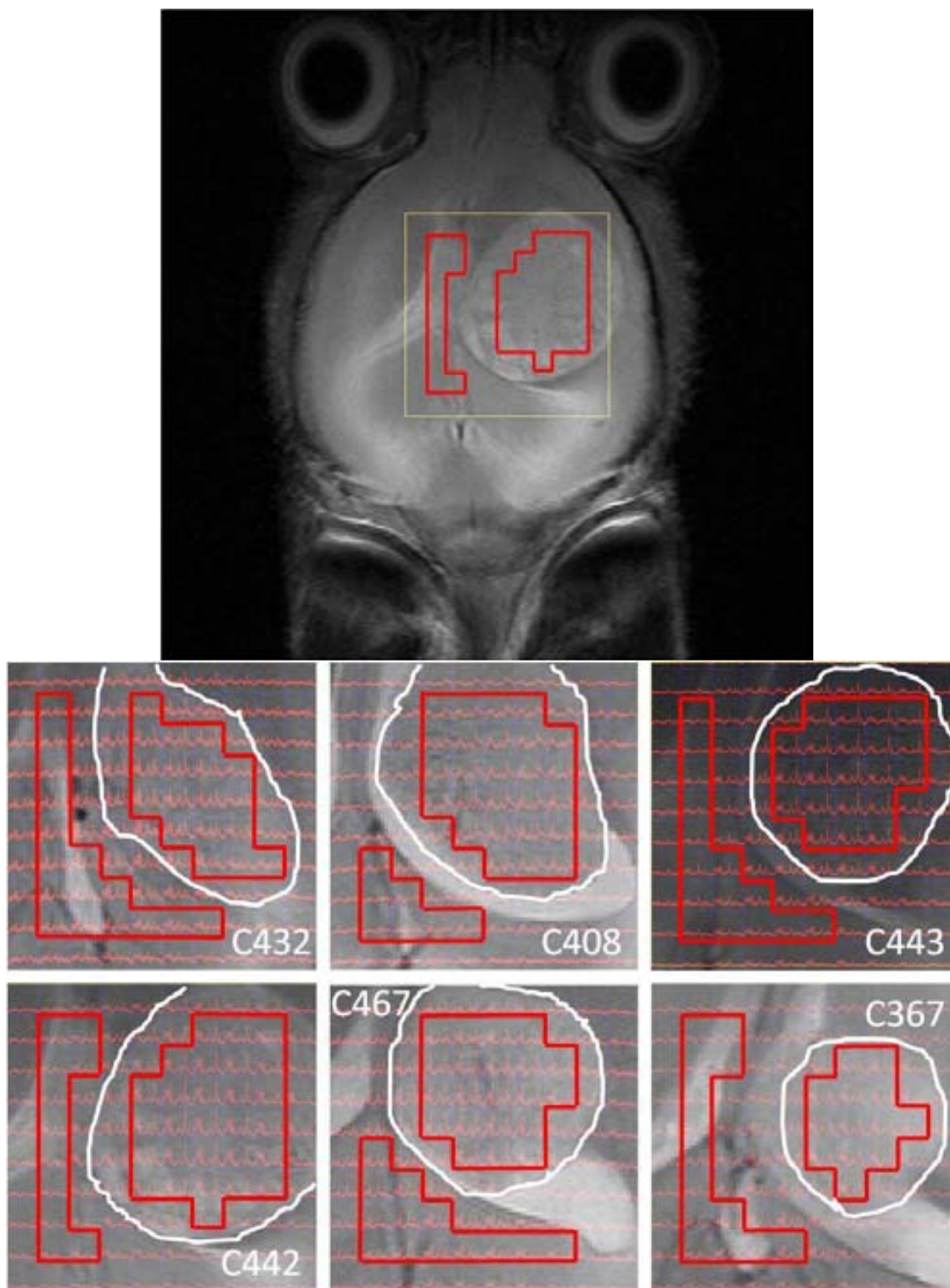


Figura 3.13. En la imagen superior se muestra una IRM T_{2w} (correspondiente al ratón C442, aquejado de un tumor GL261) sobre la que se calcula el VOI (cuadro amarillo) para adquirir un multivóxel. Debajo se muestran ejemplos de vóxeles seleccionados siguiendo el criterio definido en las muestras de glioblastoma. La matriz IERM de espectros individuales se muestra en rojo superpuesta a imágenes T_{2w} de distintos ratones GL261 investigados. El borde tumoral deducido de imágenes T_{2w} superpuestas aparece delimitado por una línea blanca y en rojo se muestran las áreas etiquetadas como tumorales (a la derecha) o no tumorales (a la izquierda).

Los identificadores alfanuméricos (p.e. C432) corresponden a identificadores únicos en el GABRMN para cada animal investigado.

Dada la experiencia previa del grupo en perturbar el patrón espectral de tumores cerebrales murinos mediante hiperglicemia transitoria en condiciones de hipotermia ligera (~30 °C) [63, 179], así como los conocimientos que se tenían de caracterización tumoral por espectroscopía de RMN [19, 187] se intentó aplicar dichas estrategias a los modelos murinos de tumor cerebral. Concretamente nos propusimos intentar reconocer el patrón metabólico de tres tipos de tumores cerebrales de grado II, III y IV, según la clasificación WHO de tumores cerebrales del sistema nervioso central (anexo 7.1), frente a parénquima cerebral sano mediante un clasificador matemático. Como se ha descrito previamente, factores como el grado de malignidad tumoral afectan al patrón lipídico de su metaboloma, por lo que se esperaba que entre las variables seleccionadas por los clasificadores se encontrara esta región espectral investigada en la primera parte de esta tesis.

El primer intento de discriminación se realizó entre los grupos que mayor diferencias espectrales presentan: GBM (grado IV), OD2 (grado II) y tejido sano. La idea en este clasificador era optimizar la clasificación de tumores de alto y bajo grado y perfeccionar dicho sistema para conseguir posteriormente la distinción de tumores de grado intermedio. Se utilizaron para el desarrollo del clasificador doce tumores de tipo glioblastoma (GL261) y tres oligodendrogliomas (GEM, OD2). Los tumores de los animales GEM fueron clasificados en clase y grado mediante histopatología (en colaboración con el grupo del Profesor Martí Pumarola, Unitat de Patologia Murina, CBATEG, UAB), resultando dos de ellos OD2 mientras que el tercero se clasificó como un OD2 con zonas de transición a grado IV (fue el animal S768). Los GBM se distribuyeron aleatoriamente entre la matriz del grupo de entrenamiento y la de test en una proporción 2:1 (tabla 3.4), mientras que teniendo en cuenta la heterogeneidad del GEM S768 se decidió introducir este ratón en el grupo de test y los otros dos (S402 y S357) en el grupo de entrenamiento, para ver si el clasificador diseñado era capaz de clasificar correctamente las distintas regiones de tejido tumoral GEM investigado.

<i>Matriz</i>	<i>ID caso</i>	<i>Patología</i>
Entrenamiento	C442	GBM
Entrenamiento	C443	GBM
Entrenamiento	C467	GBM
Entrenamiento	C367	GBM
Entrenamiento	C71	GBM
Entrenamiento	C32	GBM
Entrenamiento	C179	GBM
Entrenamiento	C234	GBM
Entrenamiento	S402	OD2
Entrenamiento	S357	OD2
Test	C408	GBM
Test	C432	GBM
Test	C69	GBM
Test	C233	GBM
Test	S768	OD2

Tabla 3.4. Distribución de los ratones en el grupo de entrenamiento o test incluidos en el clasificador de GBM, OD2 y NT.

Una vez desarrollado el clasificador de GBM, OD2 y NT (grado IV, II y normal), se intentó desarrollar un clasificador de GBM, OD3 y NT (grados IV, III y normal). Teniendo en cuenta que el grado tumoral de los GBM y OD3 es más próximo, se esperaba que fuera más difícil separar ambos grupos que distinguir el patrón espectral de un tumor de grado IV de uno de grado II.

Se utilizaron para el desarrollo del clasificador doce tumores GL261 y tres OD3. Tanto los GBM como los OD3 se distribuyeron aleatoriamente entre la matriz del grupo de entrenamiento y la de test en una proporción 2:1 (tabla 3.5).

<i>Matriz</i>	<i>ID caso</i>	<i>Patología</i>
Entrenamiento	C442	GBM
Entrenamiento	C443	GBM
Entrenamiento	C467	GBM
Entrenamiento	C367	GBM
Entrenamiento	C71	GBM
Entrenamiento	C32	GBM
Entrenamiento	C179	GBM
Entrenamiento	C234	GBM
Entrenamiento	S725	OD3
Entrenamiento	P176	OD3
Test	C408	GBM
Test	C432	GBM
Test	C69	GBM
Test	C233	GBM
Test	S784	OD3

Tabla 3.5. Distribución de los ratones en los grupos de entrenamiento y test para el clasificador de GBM, OD3 y NT.

A continuación se desarrolló un clasificador que considerara cuatro clases: grado II (OD2), grado III (OD3), grado IV (GBM) y tejido no tumoral (NT). En esta ocasión se utilizaron para el desarrollo del clasificador doce tumores GL261, tres OD2 y 3 OD3. Los GBM y OD3 se distribuyeron aleatoriamente entre la matriz del grupo de entrenamiento y la de test en una proporción 2:1 (tabla 3.6), mientras que en el grupo de los OD2 teniendo en cuenta la heterogeneidad del GEM S768 se decidió introducir este ratón en el grupo de test y los otros dos (S402 y S357) en el grupo de entrenamiento como en el clasificador descrito en la tabla 3.4, para ver si dicho clasificador era capaz de clasificar correctamente las distintas regiones de tejido tumoral.

<i>Matriz</i>	<i>ID caso</i>	<i>Patología</i>
Entrenamiento	C442	GBM
Entrenamiento	C443	GBM
Entrenamiento	C467	GBM
Entrenamiento	C367	GBM
Entrenamiento	C71	GBM
Entrenamiento	C32	GBM
Entrenamiento	C179	GBM
Entrenamiento	C234	GBM
Entrenamiento	S402	OD2
Entrenamiento	S357	OD2
Entrenamiento	S725	OD3
Entrenamiento	P176	OD3
Test	C408	GBM
Test	C432	GBM
Test	C69	GBM
Test	C233	GBM
Test	S768	OD2
Test	S784	OD3

Tabla 3.6. Distribución de los ratones en el grupo de entrenamiento o test incluidos en el clasificador de GBM, OD2, OD3 y NT.

Por último se desarrolló un clasificador que considerara tres clases: grado II (OD2), grado III (OD3) y tejido no tumoral (NT). En esta ocasión se utilizaron para el desarrollo del clasificador tres OD2 y 3 OD3 (tabla 3.7). Tanto los OD2 como los OD3 se repartieron entre las matrices de entrenamiento y test siguiendo el mismo criterio que para el desarrollo anterior (tabla 3.6).

Matriz	ID caso	Patología
Entrenamiento	S402	OD2
Entrenamiento	S357	OD2
Entrenamiento	S725	OD3
Entrenamiento	P176	OD3
Test	S768	OD2
Test	S784	OD3

Tabla 3.7. Distribución de los ratones en el grupo de entrenamiento o test incluidos en el clasificador de OD2, OD3 y NT.

El número óptimo de variables espectrales a considerar durante el desarrollo del clasificador mediante el uso del *software* Spectra Classifier v3.0 se escogió con los siguientes criterios:

- Número mínimo de variables espectrales para que exista un máximo de eficacia en el grupo de entrenamiento, medida por grado de acierto en el *bootstrapping*.
- Número mínimo de variables con las que el *Balanced Error Rate* (BER) del grupo de test alcanza un mínimo.

Si el número de variables resultantes no es el mismo con ambos criterios, se le da prioridad al valor obtenido al minimizar BER al evaluar el grupo de test.

3.8. Análisis estadístico

3.8.1. Análisis estadístico de los experimentos de HR-MAS

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos, se usó SPSS v.19.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL, EEUU). Para comparar el efecto de la velocidad de giro dentro de las muestras de un mismo tipo así como entre muestras, se realizó un análisis ANOVA con un nivel de significación estadística de $p < 0,05$.

Para evaluar el posible cambio el tamaño de los AOBs antes y después del análisis con HR-MAS se aplicó la prueba T de *Student* pareada.

3.8.2. Análisis estadístico por reconocimiento de patrones de los datos IERM

Para cada clasificador se seleccionaron entre 2 y 23 variables en el grupo de entrenamiento, que eran posiciones (ppm) correspondientes a características espectrales (alturas) normalizadas de los espectros. Este proceso se llevó a cabo con el método de *Sequential Forward Feature Selection* (SFFS) [188] e implementado en Spectra Classifier v3.0 [185] en modo *batch*. Las variables seleccionadas se utilizaron para generar clasificadores utilizando el Análisis Lineal Discriminante de Fisher (LDA), creando para cada uno un espacio latente bidimensional definido por la proyección de las variables canónicas derivadas del ADL donde se observan simultáneamente los casos de entrenamiento y de test. Cada clasificador fue evaluado en sus características descriptivas y predictivas utilizando el método de *bootstrapping* [158] con 1.000 repeticiones para el grupo de entrenamiento y el *balanced error rate* (BER) para el grupo de test independiente (ecuación 3.3, donde se muestra un ejemplo para un clasificador de tres clases).

$$BER = 1/3 \left[\left(\frac{NT \text{ mal clasificados}}{NT \text{ totales}} \right) + \left(\frac{GBM \text{ mal clasificados}}{GBM \text{ totales}} \right) + \left(\frac{ODG \text{ mal clasificados}}{ODG \text{ totales}} \right) \right] \quad \text{Ec 3.3}$$

Las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para cada grupo de entrenamiento, es decir, los valores de verdaderos positivos versus las de falsos positivos, fueron analizadas para cada clasificador transformadas en valores de área bajo la curva (AUC). Además, los resultados obtenidos para cada matriz de IERM fueron representados como mapas codificados en color con una estrategia de tipo nosológico [152, 167]. Para ello se llevaron a cabo los siguientes pasos utilizando SpectraClassifier 3.0: un clasificador desarrollado según lo descrito anteriormente fue utilizado para predecir qué vóxels de la matriz de IERM pertenecían a cada clase y la probabilidad de dicha clasificación. Esa información fue codificada en modo HSB (color, saturación e intensidad) para cada vóxel de la siguiente forma: el color (verde, rojo, azul o amarillo) define la clase a la que pertenece el vóxel y la saturación (tono definido por la mezcla de los colores del clasificador) define la probabilidad de cada vóxel de pertenecer al grupo asignado. El parámetro del brillo no se utilizó y se le asignó un valor constante en todos los casos. Finalmente, el mapa nosológico se obtuvo dibujando el valor HSB de cada vóxel en el lugar espacial que le correspondía dentro de la matriz de IERM.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Estudio de los lípidos móviles (ML) en sistemas modelo y en líneas celulares

4.1. Efecto de la velocidad de giro en el análisis de las muestras estudiadas por HR-MAS

4.1.1. Caracterización de las células C6 por HR-MAS

4.1.1.1. Cambios en el patrón espectral de las células C6

La velocidad de giro en el sedimento de las células C6 de glioma de rata parece que tiene un efecto de movilización de las señales de los ML así como de la región de las colinas, tanto en células de 4 como de 7 días de cultivo, mientras que el resto de metabolitos no parecen verse afectados. Estos cambios se ven claramente en la figura 4.1, donde se muestra la comparación del espectro adquirido a menor velocidad (500 Hz) y a máxima velocidad (15.000 Hz) para las células C6 en los días 4 y 7 de cultivo.

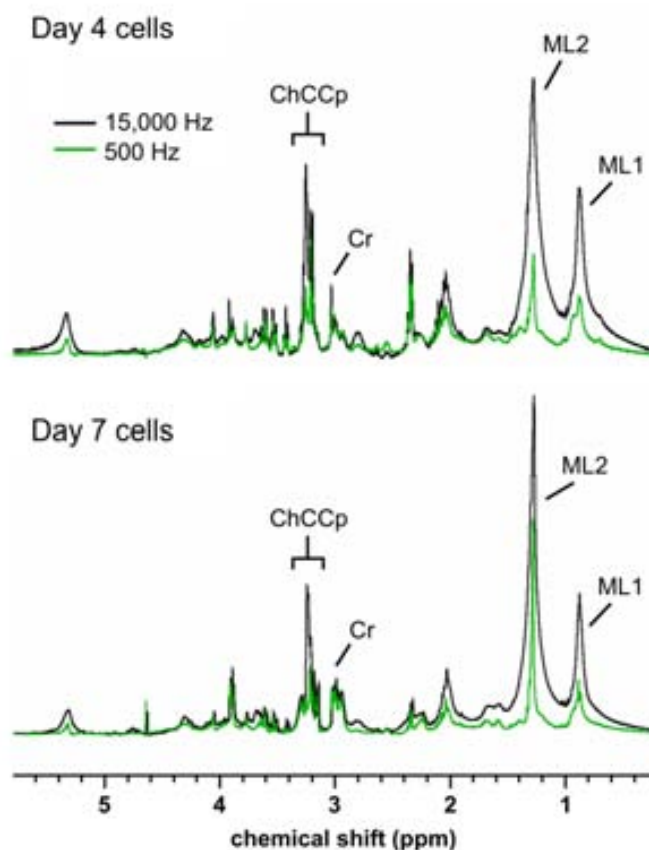


Figura 4.1. Ejemplo donde se muestra la comparación entre espectros de células C6 adquiridos a 500 Hz (verde) y 15.000 Hz (negro) a día 4 y 7 de cultivo. Las resonancias de interés para este estudio son las correspondientes a los lípidos móviles a 0,88 ppm (ML1) y 1,28 ppm (ML2), la creatina a 3,03 ppm (Cr) y las sustancias que contienen colina en la región de 3,18 a 3,25 ppm (ChCCp).

En la figura 4.2 se muestra más claramente el efecto descrito en la variación de las áreas de los ML y de los ChCCp descritos anteriormente. Se puede observar un aumento gradual de las áreas de estas regiones con la velocidad (entre 500 y 15.000 Hz) para ambas fases de crecimiento de las células, mientras que la resonancia de la creatina a 3,03 ppm permanece invariable con la velocidad de giro.

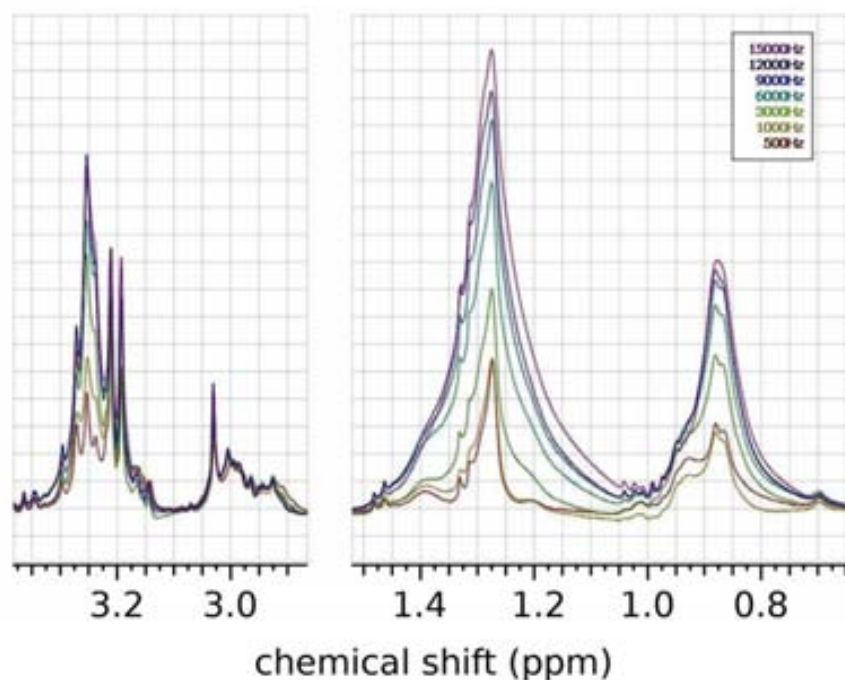


Figura 4.2. Las regiones mostradas (entre 1,52-0,64 ppm y 3,38-2,87 ppm) de los espectros de HR-MAS adquiridos a 37 °C corresponden a células C6 de día 4 de cultivo. Los espectros tienen un color diferente en función de la velocidad a la que han sido adquiridos. La región de la creatina (a 3,03 ppm) permanece constante a diferentes velocidades de giro, mientras que se observa un aumento en el área de los ML a 0,88 y 1,28 ppm y de la región de los compuestos que contienen colina a 3,25 ppm.

En las células de día 4 de cultivo el área de los ML a 0,88 ppm entre 500 y 15.000 Hz aumenta 2,3 veces (tabla 4.1), pero este aumento sólo es estadísticamente significativo ($p < 0,05$) hasta 3.000 Hz (figura 4.3) permaneciendo estable su área aparente por encima de dicha velocidad. Respecto a la resonancia de los ML a 1,28 ppm, el área aumenta entre 500 y 15.000 Hz 4,6 veces, siendo este aumento de área estadísticamente significativo, excepto entre 500 y 1.000 Hz. Respecto a la resonancia de la fosfatidilcolina a 3,25 ppm, el aumento total es de 3,2 veces, siendo significativo hasta 6.000 Hz (figura 4.3), mientras que por encima de esta velocidad el área permanece sin cambios estadísticamente significativos.

Respecto a las células de día 7 de cultivo, la resonancia de los ML a 0,88 ppm aumenta 2,5 veces entre 500 y 15.000 Hz, siendo este incremento significativo hasta 6.000 Hz. Para el área de los ML a 1,28 ppm el aumento es de 4,2 veces entre la mínima y la máxima velocidad utilizadas y, como en el caso de las células de día 4, dicho aumento de áreas es significativo entre todas las velocidades de giro excepto

entre 500 y 1.000 Hz. Finalmente el aumento para la resonancia a 3,25 ppm es de 7,2 veces, y como en el caso de las células de día 4 también es significativo este aumento sólo hasta 6.000 Hz.

Comparando las resonancias de los ML a 0,88 y 1,28 ppm y de la resonancia de la fosfatidilcolina a 3,25 ppm entre las dos fases de crecimiento celular, sólo se observan diferencias significativas en los cambios producidos por la velocidad de giro en el patrón de HR-MAS de las células de día 4 y día 7 de cultivo para la resonancia de la fosfatidilcolina.

Velocidad de giro	0,88 ppm		1,28 ppm		3,25 ppm	
	4 días	7 días	4 días	7 días	4 días	7 días
500 Hz	$8,53 \cdot 10^7 \pm 1,1 \cdot 10^7$	$1,08 \cdot 10^8 \pm 6,8 \cdot 10^6$	$9,74 \cdot 10^7 \pm 7,0 \cdot 10^6$	$1,90 \cdot 10^8 \pm 2,9 \cdot 10^7$	$5,18 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^6$	$3,25 \cdot 10^6 \pm 4,9 \cdot 10^5$
1.000 Hz	$1,10 \cdot 10^8 \pm 1,2 \cdot 10^7$	$1,31 \cdot 10^8 \pm 8,9 \cdot 10^6$	$1,15 \cdot 10^8 \pm 1,3 \cdot 10^7$	$2,07 \cdot 10^8 \pm 2,1 \cdot 10^7$	$6,41 \cdot 10^6 \pm 2,0 \cdot 10^6$	$4,63 \cdot 10^6 \pm 6,2 \cdot 10^5$
3.000 Hz	$1,59 \cdot 10^8 \pm 2,5 \cdot 10^7$	$1,90 \cdot 10^8 \pm 7,4 \cdot 10^6$	$2,08 \cdot 10^8 \pm 3,2 \cdot 10^7$	$3,43 \cdot 10^8 \pm 2,7 \cdot 10^7$	$1,08 \cdot 10^7 \pm 2,6 \cdot 10^6$	$1,05 \cdot 10^7 \pm 4,4 \cdot 10^5$
6.000 Hz	$1,82 \cdot 10^8 \pm 3,5 \cdot 10^7$	$2,35 \cdot 10^8 \pm 2,1 \cdot 10^7$	$3,10 \cdot 10^8 \pm 4,2 \cdot 10^7$	$5,07 \cdot 10^8 \pm 3,4 \cdot 10^7$	$1,34 \cdot 10^7 \pm 3,5 \cdot 10^6$	$1,48 \cdot 10^7 \pm 2,7 \cdot 10^6$
9.000 Hz	$2,02 \cdot 10^8 \pm 3,1 \cdot 10^7$	$2,54 \cdot 10^8 \pm 3,5 \cdot 10^7$	$3,77 \cdot 10^8 \pm 3,3 \cdot 10^7$	$6,22 \cdot 10^8 \pm 4,9 \cdot 10^7$	$1,51 \cdot 10^7 \pm 2,9 \cdot 10^6$	$1,94 \cdot 10^7 \pm 2,9 \cdot 10^6$
12.000 Hz	$1,97 \cdot 10^8 \pm 2,8 \cdot 10^7$	$2,71 \cdot 10^8 \pm 3,2 \cdot 10^7$	$4,16 \cdot 10^8 \pm 4,0 \cdot 10^7$	$7,10 \cdot 10^8 \pm 4,5 \cdot 10^7$	$1,61 \cdot 10^7 \pm 2,7 \cdot 10^6$	$2,04 \cdot 10^7 \pm 4,0 \cdot 10^6$
15.000 Hz	$2,06 \cdot 10^8 \pm 6,6 \cdot 10^6$	$2,73 \cdot 10^8 \pm 3,5 \cdot 10^7$	$4,58 \cdot 10^8 \pm 2,7 \cdot 10^7$	$7,74 \cdot 10^8 \pm 4,9 \cdot 10^7$	$1,59 \cdot 10^7 \pm 2,6 \cdot 10^6$	$2,37 \cdot 10^7 \pm 7,1 \cdot 10^6$
15.000/500 Hz	2,32±0,39	2,53±0,19	4,61±0,37	4,21±0,46	3,16±0,48	7,21±1,43

Tabla 4.1. Cambio en el área de los ML en espectros de HR-MAS a 9,4 T para las células C6 de glioma de rata de día 4 (n=3) y día 7 (n=4) de cultivo, variando la velocidad de giro entre 500 y 15.000 Hz. Para la resonancia a 0,88 ppm, la integración se realizó entre 0,55 y 1,05 ppm, a 1,28 ppm entre 1,52 y 1,06 ppm y a 3,25 ppm entre 3,24 y 3,26 ppm. La diferencia de aumento del área para la región a 3,25 ppm entre día 4 y 7 (de 3,16 a 7,21 veces) fue estadísticamente significativa, mientras que el resto de aumentos para el cociente 15.000/500 Hz no mostró diferencias significativas entre las células de día 4 y 7 de cultivo.

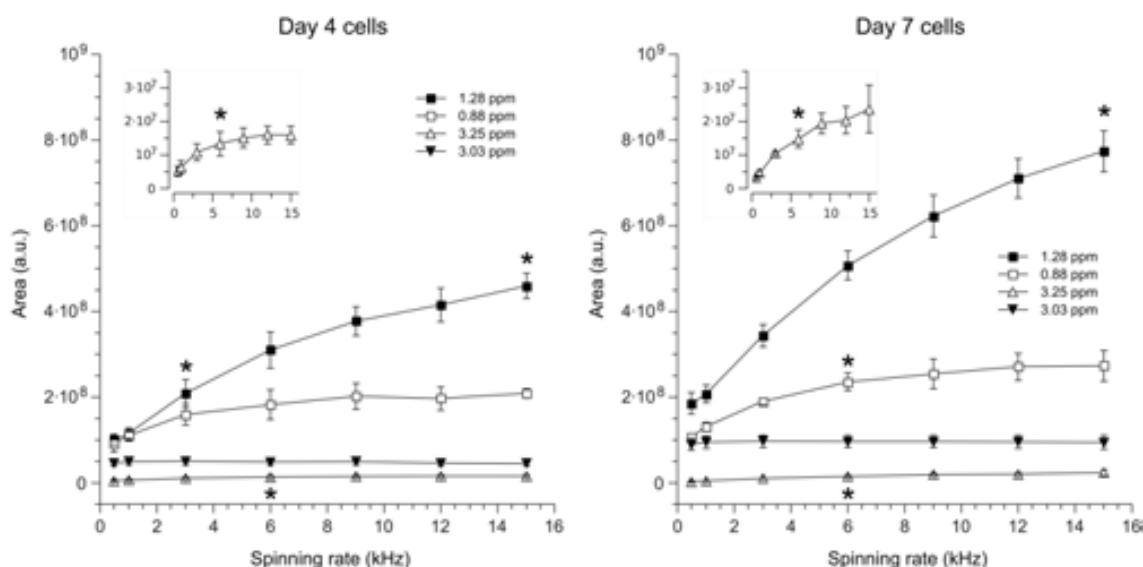


Figura 4.3. Efecto de la velocidad de giro en la visibilidad de varias resonancias en los espectros de HR-MAS a 9,4 T de células C6 de glioma de rata a días 4 y 7 de cultivo. Los gráficos muestran la variación de las áreas con el aumento de la velocidad de giro para los lípidos móviles (0,88 y 1,28 ppm), la creatina (3,03 ppm) y los compuestos que contienen colina (ChCCp 3,25 ppm) para las células a día 4 de cultivo (izquierda) y a día 7 de cultivo (derecha). El gráfico insertado en la parte superior de cada figura muestra una vista expandida de la curva de los ChCCp. En ambas muestras la región de creatina no cambia con el aumento de la velocidad de giro, mientras que la región de los ChCCp a 3,25 ppm aumenta significativamente sólo hasta 6.000 Hz y la de los ML a 1.28 ppm aumenta significativamente hasta 15.000 Hz. Para las células de día 4 de cultivo, la resonancia de los ML a 0,88 ppm aumenta significativamente sólo hasta 3.000 Hz y para las células de día 7 de cultivo sólo lo hace significativamente hasta 6.000 Hz. El área en el eje de ordenadas se da en unidades arbitrarias instrumentales.

Asimismo, los cambios detectados en el patrón espectral adquirido por HR-MAS girando a diferentes velocidades fueron cuantitativamente reversibles tanto para las células de 4 días como para las de 7 días de cultivo, como se ilustra en la figura 4.4.

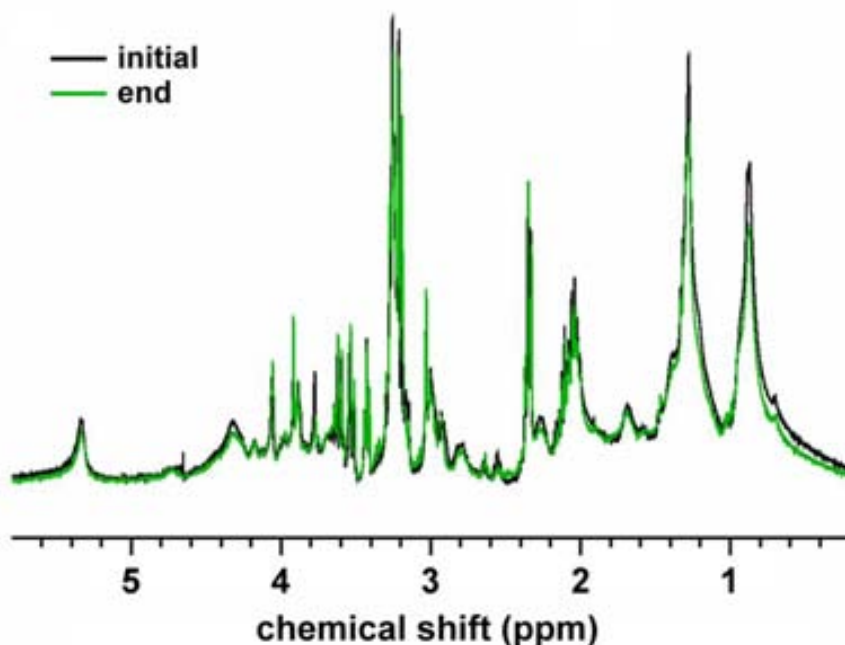


Figura 4.4. La figura muestra un ejemplo de la reversibilidad del patrón espectral de las células C6. Espectros de HR-MAS de células C6 de glioma de rata a 3.000 Hz al comienzo del experimento (negro) superpuesto sobre un espectro adquirido a la misma velocidad al terminar los experimentos adquiridos a diferentes velocidades de giro (verde).

4.1.1.2. Viabilidad e integridad celular tras los experimentos con HR-MAS

La viabilidad celular se midió tiñendo las células con una solución de *Trypan Blue* y realizando contajes antes de empezar los experimentos de HR-MAS y después de realizar diferentes tandas de experimentos para valorar el efecto de la velocidad en la viabilidad celular. Dicha viabilidad celular antes de los experimentos de HR-MAS siempre se encontraba por encima del 90 %. Girando sólo a 3.000 Hz durante 60 minutos la viabilidad celular por exclusión de *Trypan Blue* se reducía a un 17 ± 14 % aunque la recuperación de células del rotor fue muy alta, del 80 ± 27 %, indicando que mientras la integridad celular aún no se ve comprometida, la viabilidad celular se ve reducida.

En el momento en el que se subía a 15.000 Hz la velocidad de giro la viabilidad celular bajaba al 0 % tanto si se realizaba el experimento completo (pasando por todas las velocidades estudiadas entre 500 y 15.000 Hz) como si se giraba sólo 20 minutos a 3.000 Hz, 20 minutos a 15.000 Hz y 20 minutos a 3.000 Hz. Tras realizar dicho experimento, sólo el 8 % de las células se recuperaban del rotor de HR-MAS al ser

observadas por microscopía. De las células recuperadas algunas de ellas presentaban una apariencia normal, pero la mayoría se encontraban deformadas y los núcleos adquirían forma de pera después de girar a alta velocidad. Además se detectaron células rotas y se observaron por microscopía confocal trozos de membrana y de otras estructuras celulares en el sedimento recuperado del rotor de HR-MAS (figura 4.5).



Figura 4.5. Efecto de la velocidad de giro en la integridad celular. Las imágenes fueron adquiridas con microscopía confocal usando un objetivo de 100x antes de los experimentos de HR-MAS (A), después de girar 60 minutos a 3.000 Hz (B) y después de girar 20 minutos a 3.000 Hz, 20 minutos a 15.000 Hz y otros 20 minutos a 3.000 Hz para simular las condiciones experimentales de giro a velocidad creciente llevadas a cabo anteriormente (C). La línea blanca mide 20 μm .

4.1.2. Preparación y estudio de las gotículas lipídicas artificiales (AOB) y los controles lipídicos por HR-MAS

4.1.2.1 Caracterización de las gotículas lipídicas artificiales mediante microscopía óptica y electrónica

El diámetro promedio de las preparaciones de AOBs empleadas para evaluar el efecto de la velocidad de giro del HR-MAS en el patrón de los ML fue de 780 ± 580 nm ($n=1.096$ AOBs de 4 preparaciones independientes) (figura 4.6).

Resultados y discusión

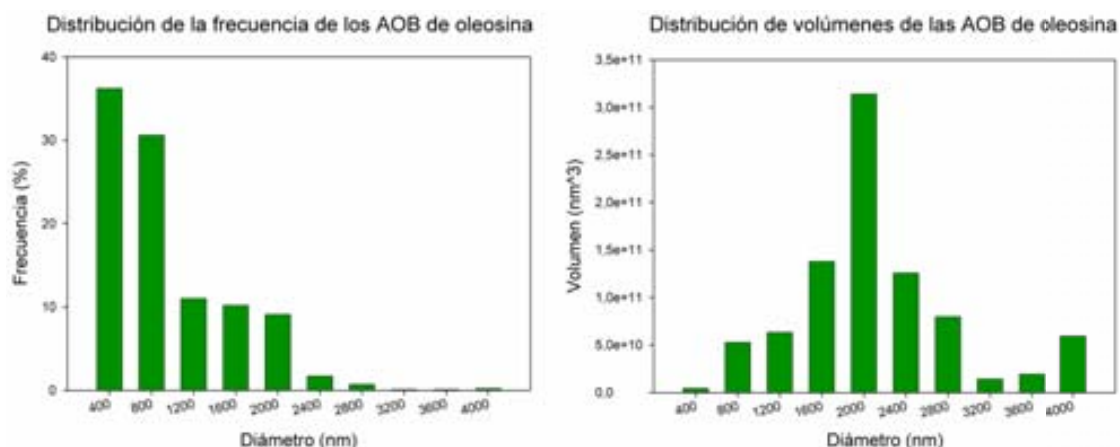


Figura 4.6. Distribución de frecuencias de tamaños y volúmenes de las AOB de oleosina frente al diámetro (eje x) expresado en nm.

Para las AOBs de oleosina (evaluado mediante microscopía óptica confocal) y de 240–293 nm ($n=230$ AOBs de 2 preparaciones independientes) para los AOBs de caleosina, evaluado mediante microscopía electrónica de transmisión. Al analizar estos resultados, se vio que con la forma de preparación estándar, se podían detectar, aunque a muy baja frecuencia, gotículas con un tamaño superior al buscado (figura 4.7), por lo que se dejó sedimentar la muestra 1h y se analizó la parte inferior de dicha muestra, obteniéndose una media de tamaño menor (122–40 nm, $n=263$) y con diámetros más homogéneamente distribuidos.

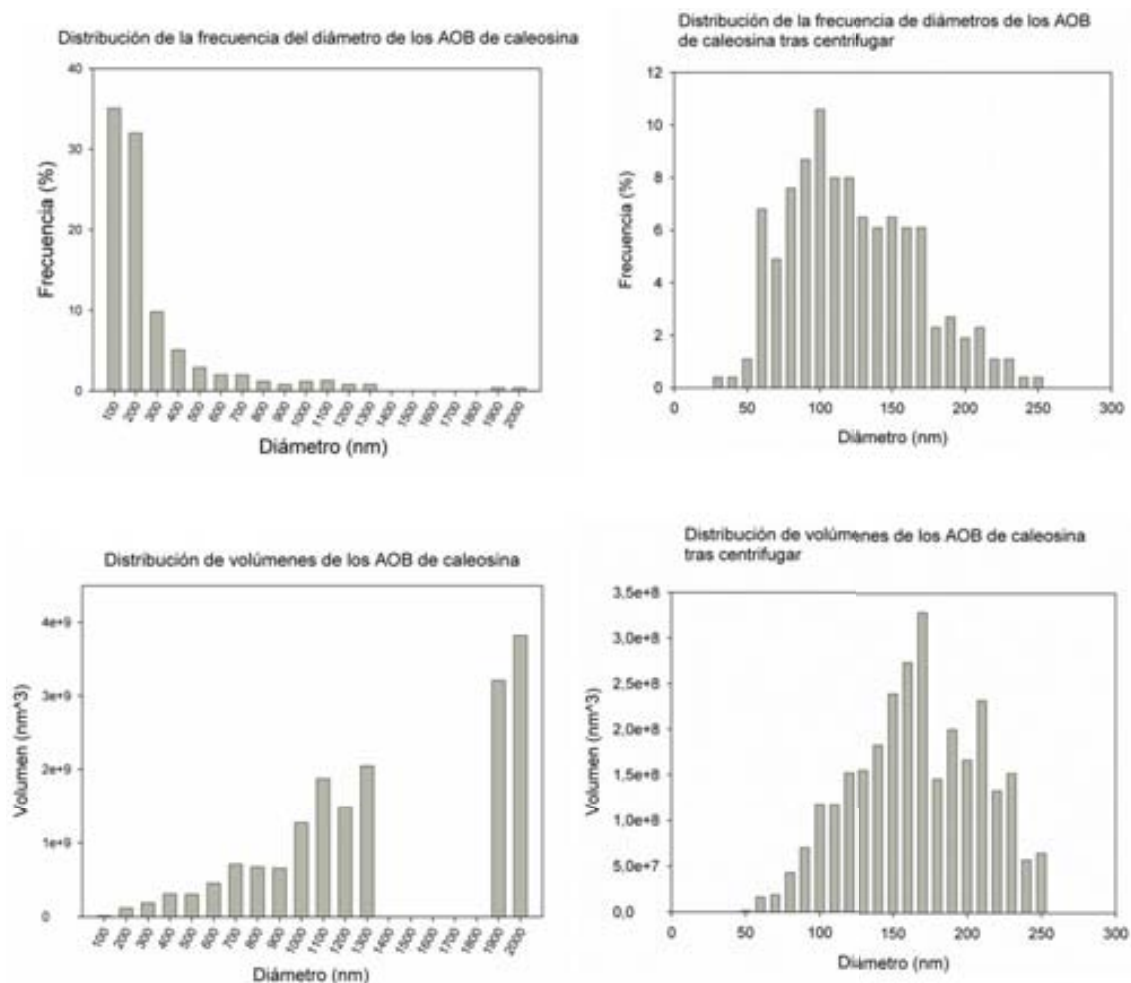


Figura 4.7. Distribución de frecuencias de tamaños y volúmenes de las AOBs de caleosina. En la margen izquierdo se muestran la frecuencia de diámetros (arriba) y el volumen de las AOBs de caleosina siguiendo el protocolo descrito en el grupo de Tzen [139]. En la columna derecha se muestran la frecuencia de diámetros (arriba) y el volumen de los AOBs (abajo) tras dejar sedimentar la muestra. En el eje x se representa el diámetro de las gotículas en nm.

Además, también se evaluó la posible variación del tamaño de los AOBs antes y después de los experimentos de HR-MAS por microscopía confocal (para los AOBs de oleosina, figura 4.8) y con microscopía electrónica de transmisión (para las AOBs de caleosina). Como se observa en la figura 4.8 los AOBs de oleosina tienden a agregarse con posterioridad al experimento de HR-MAS, pero sin llegar a fusionarse. En cualquier caso no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el diámetro de los AOBs antes y después de la adquisición por HR-MAS, siendo el diámetro promedio antes de los experimentos por HR-MAS de 703 ± 513 nm y de 789 ± 604 nm ($n=257$ AOBs en ambos casos).

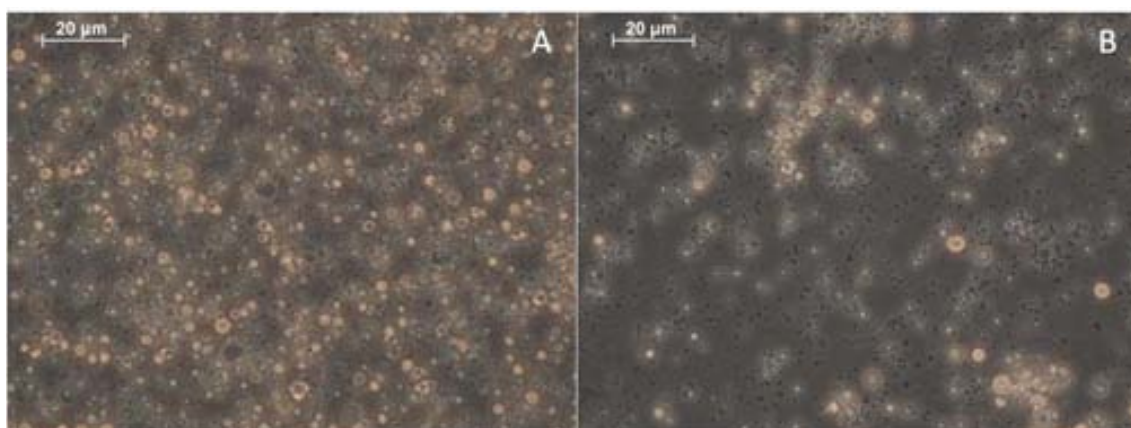


Figura 4.8. Imágenes adquiridas en microscopio confocal de AOBs con oleosina antes (A) y después (B) de la adquisición por HR-MAS de la tanda de espectros entre 500 y 15.000 Hz. Tras el HR-MAS parece que los AOBs aparecen formando algunos agregados, pero sin llegar a fusionarse.

En el caso de las gotículas de caleosina, tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas antes y después de los experimentos por HR-MAS, siendo el diámetro promedio de 122 ± 40 nm antes del experimento y de 114 ± 50 nm después del HR-MAS ($n=263$ AOBs) (figura 4.9).

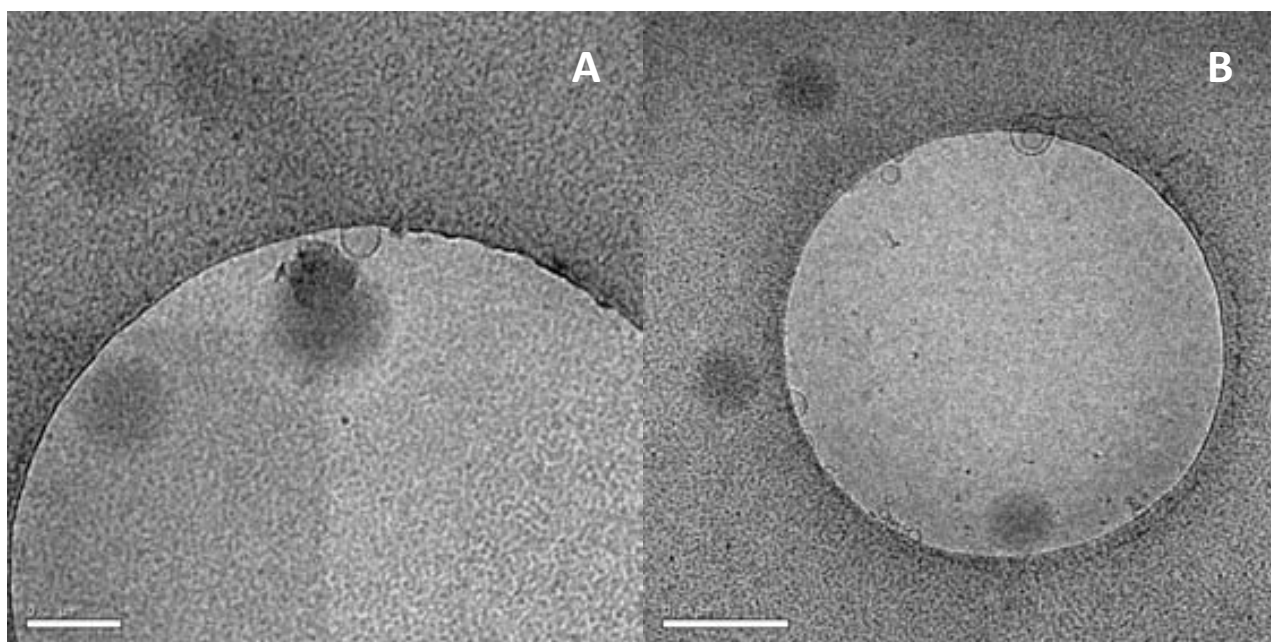


Figura 4.9. Imágenes de AOBs de caleosina obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión antes (A) y después (B) de la adquisición por HR-MAS. La barra blanca equivale a 200 nm en la imagen A y a 500 nm en la imagen B. Las esferas más oscuras son las

correspondientes a los AOBs, ya que contienen triacilglicéridos en el interior. Alguna esfera transparente corresponde a algún liposoma.

4.1.2.2. Efectos de la velocidad de giro en el patrón espectral de HR-MAS de las gotículas lipídicas artificiales y los controles lipídicos

Comparando el patrón espectral de los ML de las AOBs preparadas con caleosina y con oleosina, no se observaron diferencias relevantes (figura 4.10). En la figura 4.11 se muestra el área de los ML a 0,88 y 1,28 ppm y el área de la creatina para las preparaciones de AOBs de caleosina y oleosina a diferentes velocidades de giro.

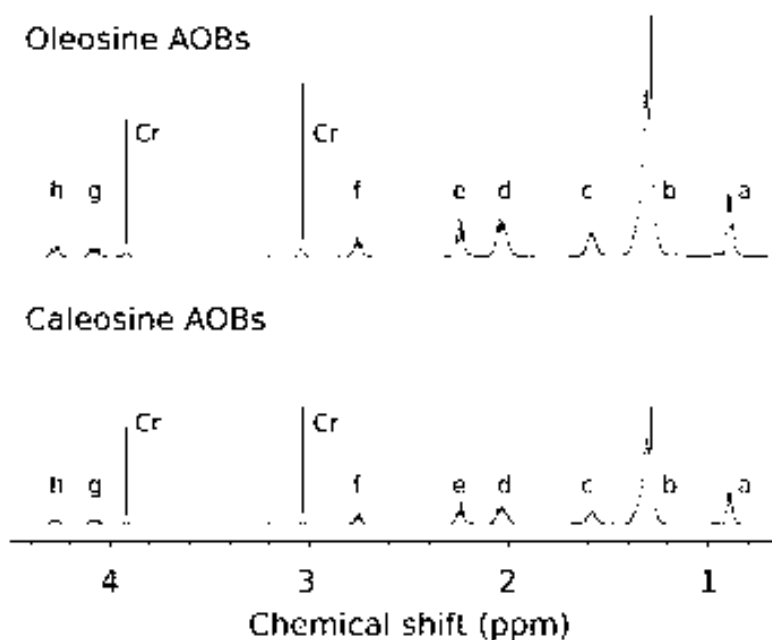


Figura 4.10. Comparación entre el espectro de las gotículas lipídicas artificiales de oleosina (arriba) y de caleosina (abajo) adquiridas con HR-MAS girando a 3.000 Hz. La creatina, la referencia interna, se observa a 3,03 y 3,09 ppm. Hay que destacar que no se detecta la resonancia a 3,25 ppm correspondiente a fosfatidilcolina en fosfolípidos. De derecha a izquierda, las resonancias (en negrita) de los ácidos grasos corresponden a $-\text{CH}_3$ a 0,88 ppm (a), $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ a 1,28 ppm (b), $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$ a 1,58 ppm (c), $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ a 2,04 ppm (d), $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$ a 2,24 ppm (e), $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ a 2,75 ppm (f), el ^1H del glicerol C-1/C-3 a 4,18 ppm (g), $-\text{OCH}_2-\text{CHO}$ y 4,23 ppm (h) y $-\text{CH}=\text{CH}-$ a 5,33 ppm (fuera del rango espectral mostrado).

Para las AOBs de caleosina, el aumento del área de los ML a 0,88 y 1,28 ppm entre 500 y 15.000 Hz fue de aproximadamente 1,4 veces para ambas resonancias (tabla 4.3). Para las gotículas de oleosina, el incremento del área a 0,88 y 1,28 ppm entre la mínima y la máxima velocidad de HR-MAS estudiadas, fue en torno a 1,4-1,5 veces (tabla 4.4). El máximo efecto de la velocidad de giro en el HR-MAS para estas muestras se alcanza a 3.000 Hz o no aumenta a velocidades superiores (figura 4.11). Respecto a la muestra control lipídica no sonicada, no se detectaron variaciones de la se al de los ML (figura 4.11). Esto sugiere que el diámetro de las gotículas en sí mismo es capaz de producir restricción de la movilidad y es por tanto, lo que reduce la visibilidad de los ML de las muestras de gotículas lipídicas artificiales.

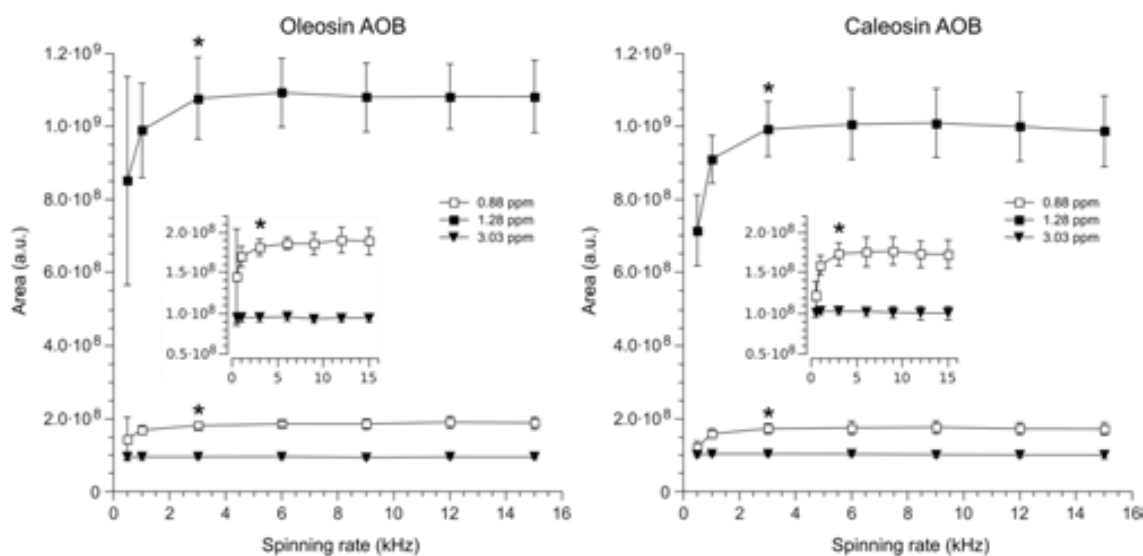


Figura 4.11. Efecto de la velocidad de giro en la visibilidad de las señales de lípidos móviles provenientes de las gotículas lipídicas artificiales de oleosina y caleosina. Los gráficos muestran la variación de las áreas con el aumento de la velocidad de giro para los ML a 0,88 y 1,28 ppm y la creatina a 3,03 ppm. Las AOBs de oleosina están a la izquierda (780 – 580 nm, n=1096 AOB de 4 preparaciones distintas) y para las AOBs de caleosina a la derecha (240 – 293 nm, n=230 AOB de 2 preparaciones distintas). Para ambas muestras el área de la creatina (3,03 ppm) permanece constante con la velocidad de giro creciente, mientras que las resonancias de los ML a 0,88 y 1,28 ppm aumentan significativamente entre 500 y 3.000 Hz (estrella) y permanecen constantes por encima de 3.000 Hz. Los gráficos insertados en la figura muestran una visión expandida de las curvas de la Cr y los ChCCp. El área en el eje de ordenadas se da en unidades arbitrarias instrumentales.

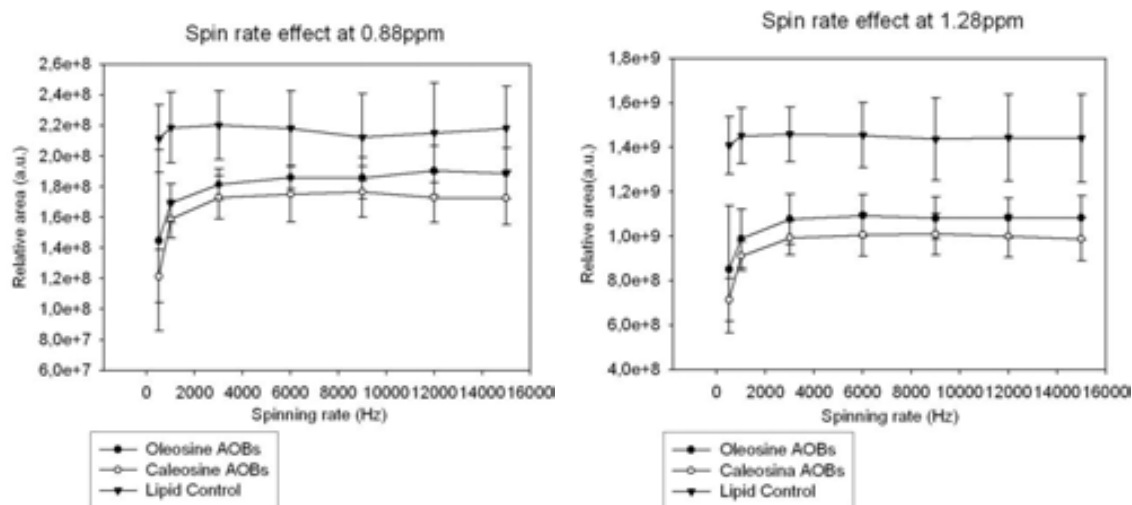


Figura 4.12. Efecto de la velocidad de giro en la visibilidad de las señales de lípidos móviles a 0,88 ppm (izquierda) y a 1,28 ppm (derecha) provenientes de las gotículas lipídicas artificiales de oleosina y caleosina y de los controles lipídicos. Los gráficos muestran la variación de las áreas con el aumento de la velocidad de giro para los ML a 0,88 y 1,28 ppm. oleosina están a la izquierda (780 ± 580 nm, $n=1096$ AOB de 4 preparaciones distintas) y para las AOBs de caleosina a la derecha (240 ± 293 nm, $n=230$ AOB de 2 preparaciones distintas). Para ambas resonancias, el área del control lipídico permanece constante con la velocidad de giro creciente, mientras que las resonancias de los ML a 0,88 y 1,28 ppm de las muestras de oleosina y caleosina aumentan significativamente entre 500 y 3.000 Hz y permanecen constantes por encima de 3.000 Hz como se detalla con más claridad en la figura 4.11.

AOB de caleosina		
Velocidad de giro	0,88 ppm	1,28 ppm
500 Hz	$1,22 \cdot 10^8 \pm 1,7 \cdot 10^7$	$7,14 \cdot 10^8 \pm 9,7 \cdot 10^7$
1.000 Hz	$1,59 \cdot 10^8 \pm 1,2 \cdot 10^7$	$9,11 \cdot 10^8 \pm 6,5 \cdot 10^7$
3.000 Hz	$1,73 \cdot 10^8 \pm 1,4 \cdot 10^7$	$9,93 \cdot 10^8 \pm 7,6 \cdot 10^7$
6.000 Hz	$1,75 \cdot 10^8 \pm 1,8 \cdot 10^7$	$1,01 \cdot 10^9 \pm 9,7 \cdot 10^7$
9.000 Hz	$1,77 \cdot 10^8 \pm 1,7 \cdot 10^7$	$1,01 \cdot 10^9 \pm 9,5 \cdot 10^7$
12.000 Hz	$1,73 \cdot 10^8 \pm 1,7 \cdot 10^7$	$1,00 \cdot 10^9 \pm 9,5 \cdot 10^7$
15.000 Hz	$1,73 \cdot 10^8 \pm 1,7 \cdot 10^7$	$9,87 \cdot 10^8 \pm 9,7 \cdot 10^7$
15.000/500 Hz	$1,44 \pm 0,24$	$1,40 \pm 0,23$

Tabla 4.2. Cambio en las áreas de los ML a 0,88 y 1,28 ppm para las AOBs de caleosina (n=3). El aumento total entre la velocidad máxima y mínima de giro es similar para ambas señales, en torno a 1,4 veces.

AOB de oleosina		
Velocidad de giro	0,88 ppm	1,28 ppm
500 Hz	$1,45 \cdot 10^8 \pm 5,9 \cdot 10^7$	$8,51 \cdot 10^8 \pm 2,9 \cdot 10^8$
1.000 Hz	$1,69 \cdot 10^8 \pm 1,3 \cdot 10^7$	$9,90 \cdot 10^8 \pm 1,31 \cdot 10^8$
3.000 Hz	$1,82 \cdot 10^8 \pm 1,0 \cdot 10^7$	$1,08 \cdot 10^9 \pm 1,1 \cdot 10^8$
6.000 Hz	$1,86 \cdot 10^8 \pm 7,3 \cdot 10^6$	$1,09 \cdot 10^9 \pm 9,5 \cdot 10^7$
9.000 Hz	$1,86 \cdot 10^8 \pm 1,4 \cdot 10^7$	$1,08 \cdot 10^9 \pm 9,5 \cdot 10^7$
12.000 Hz	$1,90 \cdot 10^8 \pm 1,6 \cdot 10^7$	$1,08 \cdot 10^9 \pm 9,0 \cdot 10^7$
15.000 Hz	$1,89 \cdot 10^8 \pm 1,7 \cdot 10^7$	$1,08 \cdot 10^9 \pm 9,9 \cdot 10^7$
15.000/500 Hz	1,49±0,67	1,39±0,52

Tabla 4.3. Cambio en las áreas de los ML a 0,88 y 1,28 ppm para las AOBs de oleosina (n=4). El aumento total entre la velocidad máxima y mínima de giro es similar para ambas señales, en torno a 1,4-1,5 veces.

4.1.3. Estudio de las gotículas lipídicas artificiales inmovilizadas en una matriz sólida

Tras el análisis de las AOBs de caleosina y oleosina libres se llevó a cabo una inmovilización en una matriz sólida (Sephacryl S-1000) para ver si esta unión afectaba a la visibilidad de los ML evaluada por HR-MAS. Inicialmente se adquirió un espectro de la matriz sólida seleccionada para descartar que produjera alguna señal que se solapara con la región de interés de los ML (figura 4.13). A continuación la matriz fue activada según lo descrito en la sección 3.2.5., de forma que se generaron unos “brazos” en la matriz capaces de unirse a los AOBs y se comprobó que los brazos de la matriz activa (MA) resonaban fuera de la región de estudio de los ML (figura 4.13.B).

Finalmente, se llevó a cabo la reacción de inmovilización de AOBs de oleosina, obteniéndose un perfil de ML como se ve en la figura 4.13.C.

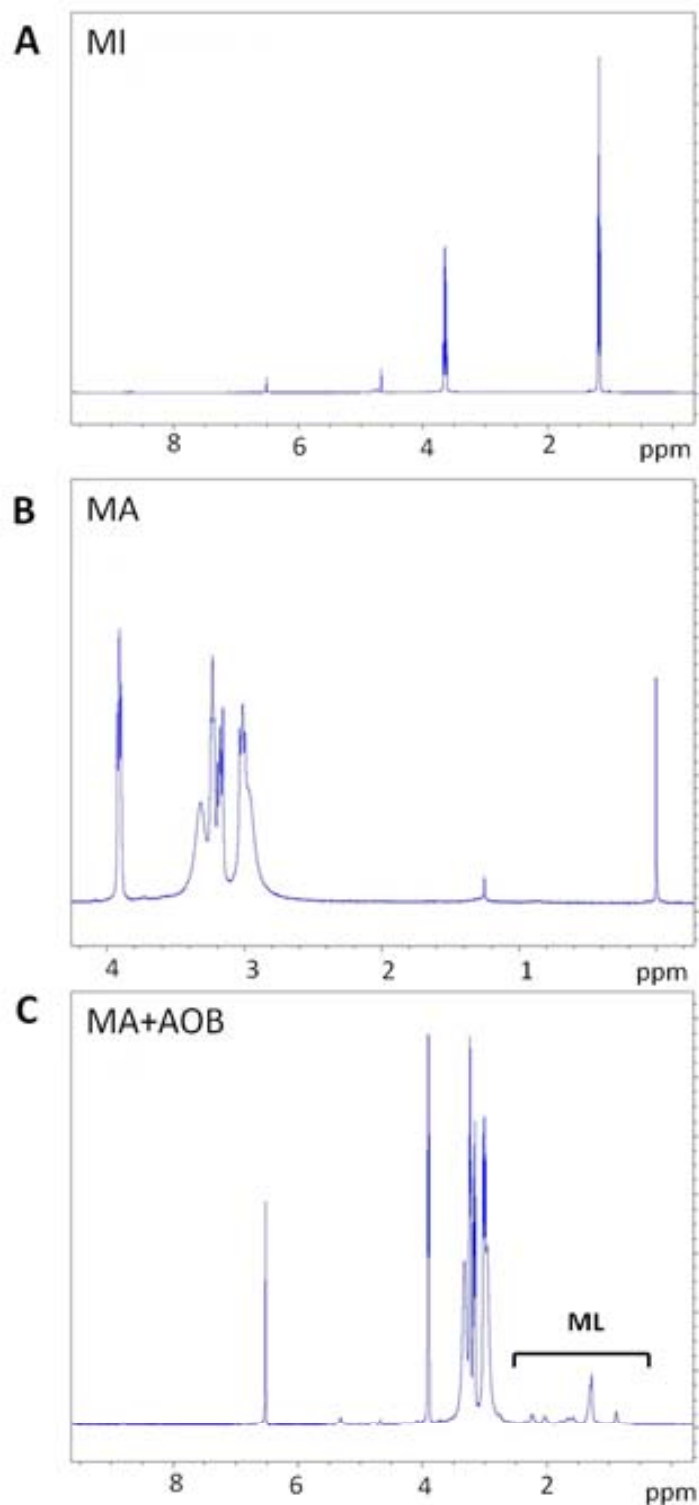


Figura 4.13. Tres de los espectros adquiridos con HR-MAS a 37 °C y girando a 3.000 Hz de Sephacryl S-1000. En A se muestra el espectro de la matriz sólida sin activar (MI). En esta primera figura sólo se detectan las resonancias del etanol (solvente en el que viene suspendida la matriz) y el fumarato a 6,5 ppm, que se añade como estándar interno. En B se muestra la

matriz activada de Sephacryl S-1000 (MA), ver figura 3.8, para visualizar las resonancias que se detectan y si interferirían con las resonancias de los ML alrededor de 0,88 y 1,28 ppm, a 0 ppm se detecta TSP que se añadió como estándar interno. En C se muestra el espectro de la matriz activada de Sephacryl S-1000 tras reaccionar con las AOB de oleosina (MA+AOB) y la se al de fumarato.

Para poder dilucidar si las uniones a la matriz activada (MA) se debían a la correcta formación y funcionalidad de los brazos o si las AOBs se unieron inespecíficamente a la matriz, se realiza un control, que consistió en incubar con AOBs de caleosina y de oleosina tanto con la MA como con la matriz inactiva (MI) y adquirir después un espectro a 3.000 Hz con HR-MAS. Aunque se detectó algo de se al proveniente de los ML (tanto a 0,88 ppm como a 1,28 ppm) en la MI, fue claramente menor que la se al proveniente de la MA, siendo estadísticamente significativa la diferencia en la detección de los ML a 0,88 y 1,28 ppm, lo que indicaba que las AOB se unen con mayor afinidad a la MA como era de esperar (figura 4.14). Sin embargo, hasta un 36,6 % de los ML a 1,28 ppm de oleosina y 42,9 % en el caso de los AOBs de caleosina pueden provenir de AOBs adsorbidos inespecíficamente en la matriz de Sephacryl S-1000, mientras que de los ML a 0,88 ppm podrían provenir en un 39,8 % en el caso de los AOBs de oleosina de adsorción inespecífica y un 30,7 % en el caso de los AOBs de caleosina.

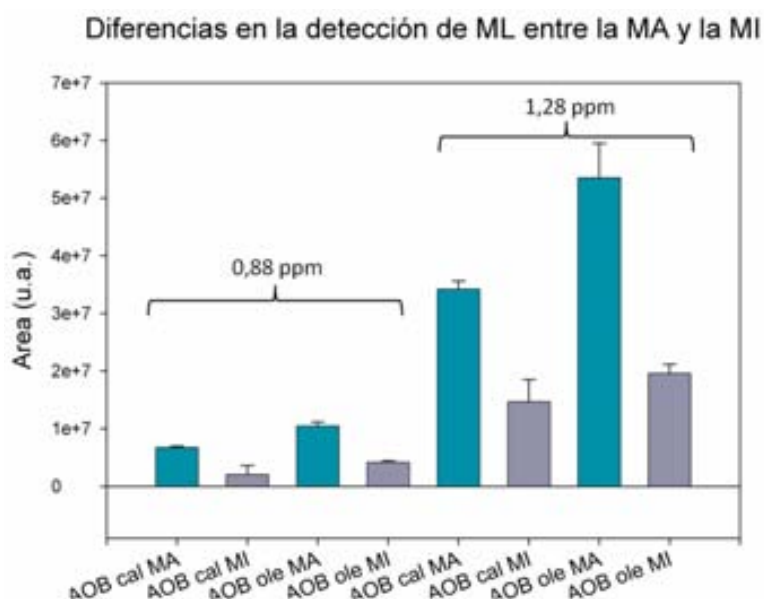


Figura 4.14. Se muestra la comparación en la detección de los ML a 0,88 y 1,28 ppm entre la MA (azul) y la MI (gris) tras la interacción con los AOB de caleosina y oleosina. En todos los

casos la detección en la MA es significativamente mayor que en la MI ($p < 0,05$). Ver también tabla 4.4 para valores numéricos.

Diferencias en la detección de ML entre la MA y la MI			
0,88 ppm	AOB Cal	MA	$6,74 \cdot 10^6 \pm 2,21 \cdot 10^5$
		MI	$2,07 \cdot 10^6 \pm 1,56 \cdot 10^6$
	AOB Ole	MA	$1,05 \cdot 10^7 \pm 7,00 \cdot 10^5$
		MI	$4,16 \cdot 10^6 \pm 2,67 \cdot 10^5$
1,28 ppm	AOB Cal	MA	$3,42 \cdot 10^7 \pm 1,40 \cdot 10^6$
		MI	$1,47 \cdot 10^7 \pm 3,84 \cdot 10^6$
	AOB Ole	MA	$5,35 \cdot 10^7 \pm 6,01 \cdot 10^6$
		MI	$1,96 \cdot 10^7 \pm 1,58 \cdot 10^6$

Tabla 4.4 Comparación en la detección de los ML a 0,88 y 1,28 ppm entre la MA y la MI tras la interacción con los AOB de caleosina y oleosina.

Además, estos dos tipos de muestra se analizaron por microscopía electrónica de barrido para intentar visualizar las AOB dentro de las esferas de la matriz de Sephacryl S-1000 (figura 4.15). En la parte superior de la figura 4.15 se muestran las imágenes de la MA tras interactuar con los AOB y en la parte inferior se muestra la MI tras interactuar con las AOB. Se observan algunas diferencias cualitativas entre las esferas de Sephacryl activadas (MA) o sin activar (MI) que se ilustran en dicha figura 4.15. Así, el “granulado” en la MA es mucho más fino que en la MI, cosa que podría interpretarse como una mayor ocupación de espacios accesibles dentro de la matriz activa por las AOBs covalentemente asociadas.

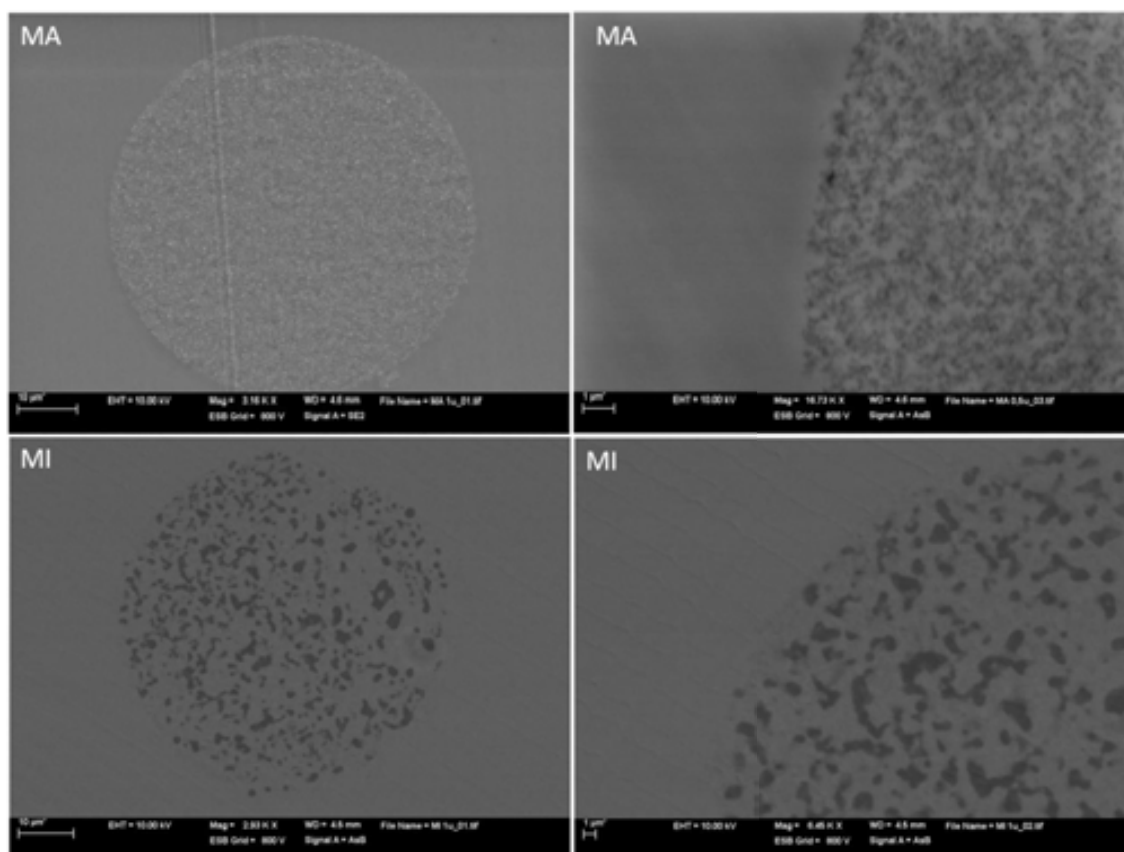


Figura 4.15. Imagen tomada por microscopía electrónica de barrido (Merlin FE-SEM) de la matriz activa (imágenes superiores) y la matriz inactiva (imágenes inferiores) tras interactuar con las AOBs de oleosina. En las figuras de la izquierda la barra blanca corresponde a 10 μ m, mientras que en las imágenes de la derecha corresponde a 1 μ m. La barra blanca está dentro la franja negra bajo las imágenes.

En la figura 4.16 se muestra el efecto de la velocidad de giro en el HR-MAS en las señales de los ML provenientes de las AOB inmovilizadas en la matriz sólida. El comportamiento de las señales de los ML cambia ostensiblemente respecto al de las AOB libres. En el caso de los AOB de caleosina inmovilizados, no existen diferencias significativas en la detección de ML ni a 0,88 ppm ni a 1,28 ppm con la velocidad de giro. En el caso de las AOB de oleosina sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre 500 Hz y velocidades iguales o superiores a 3.000 Hz. Por otro lado, así como en los AOB libres no se detectaron diferencias significativas entre las AOB de oleosina y caleosina, habría que destacar en la población de AOB inmovilizadas sí que las diferencias son significativas en todas las velocidades en la detección de los ML de las AOB de oleosina y caleosina.

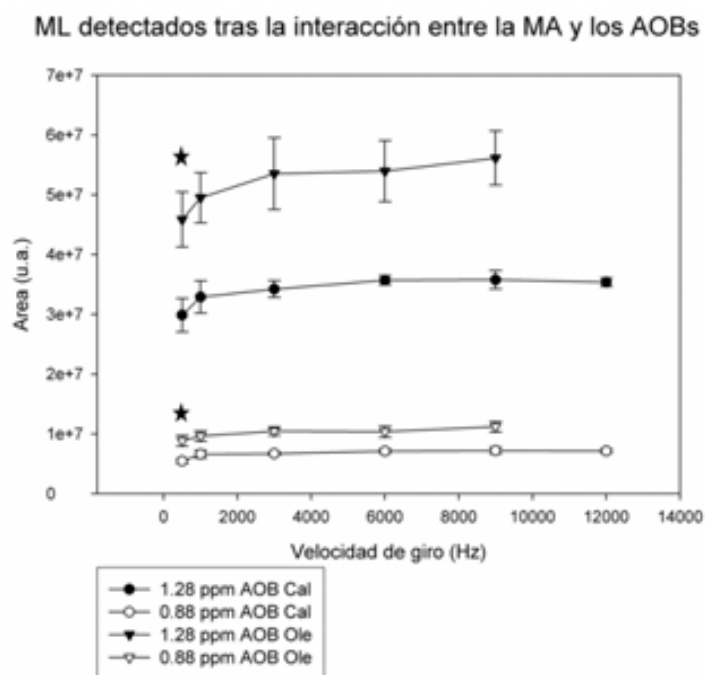


Figura 4.16. Efecto de la velocidad de giro en la detección de las señales de ML detectadas de las AOB inmovilizadas en la matriz sólida. Ver también tablas 4.5 y 4.6 para valores numéricos.

AOB de caleosina inmovilizados		
Velocidad de giro	0,88 ppm	1,28 ppm
500 Hz	$5,46 \cdot 10^6 \pm 3,94 \cdot 10^5$	$2,99 \cdot 10^7 \pm 2,80 \cdot 10^6$
1.000 Hz	$6,62 \cdot 10^6 \pm 6,64 \cdot 10^5$	$3,29 \cdot 10^7 \pm 2,70 \cdot 10^6$
3.000 Hz	$6,74 \cdot 10^6 \pm 2,21 \cdot 10^5$	$3,42 \cdot 10^7 \pm 1,40 \cdot 10^6$
6.000 Hz	$7,13 \cdot 10^6 \pm 3,54 \cdot 10^5$	$3,57 \cdot 10^7 \pm 7,64 \cdot 10^6$
9.000 Hz	$7,21 \cdot 10^6 \pm 5,35 \cdot 10^5$	$3,58 \cdot 10^7 \pm 1,52 \cdot 10^6$
12.000 Hz	$7,15 \cdot 10^6 \pm 3,24 \cdot 10^5$	$3,54 \cdot 10^7 \pm 7,16 \cdot 10^5$
12.000/500 Hz	$1,32 \pm 0,14$	$1,19 \pm 0,09$

Tabla 4.5. Cambio en las áreas de los ML a 0,88 y 1,28 ppm para las AOBs de caleosina inmovilizadas en la matriz sólida (n=3). El aumento total entre la velocidad máxima y mínima de giro es similar para ambas señales, en torno a 1,2-1,3 veces.

AOB de oleosina inmovilizados		
Velocidad de giro	0,88 ppm	1,28 ppm
500 Hz	$8,84 \cdot 10^6 \pm 8,84 \cdot 10^5$	$4,59 \cdot 10^7 \pm 4,59 \cdot 10^6$
1.000 Hz	$9,64 \cdot 10^6 \pm 8,51 \cdot 10^5$	$4,95 \cdot 10^7 \pm 4,20 \cdot 10^6$
3.000 Hz	$1,05 \cdot 10^7 \pm 7,00 \cdot 10^5$	$5,35 \cdot 10^7 \pm 6,01 \cdot 10^6$
6.000 Hz	$1,04 \cdot 10^7 \pm 9,20 \cdot 10^5$	$5,40 \cdot 10^7 \pm 5,11 \cdot 10^6$
9.000 Hz	$1,12 \cdot 10^7 \pm 8,25 \cdot 10^5$	$5,61 \cdot 10^7 \pm 4,53 \cdot 10^6$
9.000/500 Hz	1,21±0,04	1,13±0,02

Tabla 4.6. Cambio en las áreas de los ML a 0,88 y 1,28 ppm para las AOBs de oleosina inmovilizadas en la matriz sólida (n=4, excepto para 9.000 Hz que se adquirió n=2).

4.1.4. Tratamiento de la matriz de Sephacryl S-1000 conteniendo gotículas inmovilizadas con ditiotreitól

Tras incubar la muestra de matriz activada conteniendo AOBs de caleosina con DTT (sección 3.2.6), para producir la liberación de la asociación covalente de las AOB de la matriz de Sephacryl se estudió el efecto de la velocidad de giro en experimentos de HR-MAS en la región de los ML. En la figura 4.17 se muestra la variación del área de la resonancia a 0,88 ppm no muestra diferencias estadísticamente significativas con la velocidad. Mientras que para la resonancia a 1,28 ppm sí que existen.

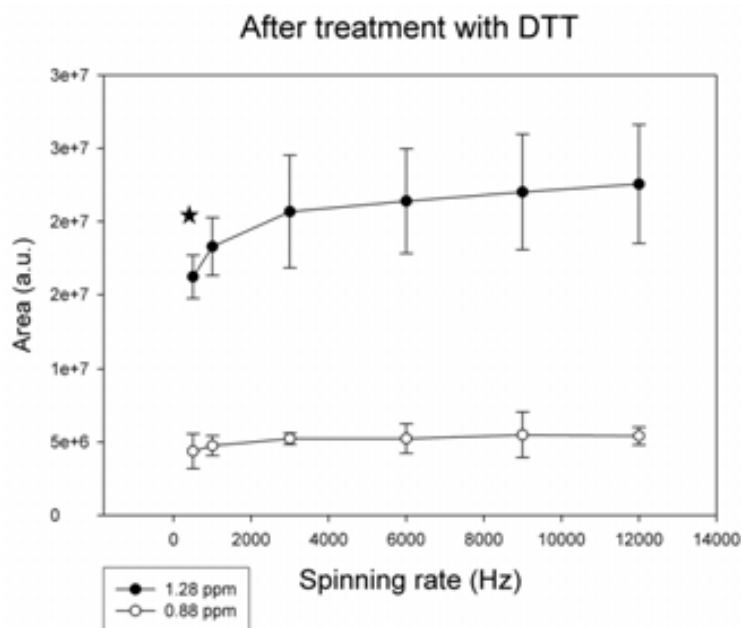


Figura 4.17. Presentación del efecto de la velocidad de giro en la región de los ML (a 1,28 y 0,88 ppm) para la muestra de matriz activada teniendo AOBs de caleosina y tratada con DTT (n=2). La estrella muestra la única velocidad de giro a la que se detectan diferencias estadísticamente significativas: entre 500 Hz y el resto de velocidades excepto 1.000 Hz con $p < 0,05$.

AOB Cal + DTT	0,88ppm	1,28 ppm
500 Hz	$4,37 \cdot 10^6 \pm 1,19 \cdot 10^6$	$1,62 \cdot 10^7 \pm 1,48 \cdot 10^6$
1.000 Hz	$4,75 \cdot 10^6 \pm 6,79 \cdot 10^5$	$1,83 \cdot 10^7 \pm 1,98 \cdot 10^6$
3.000 Hz	$5,23 \cdot 10^6 \pm 3,87 \cdot 10^5$	$2,07 \cdot 10^7 \pm 3,85 \cdot 10^6$
6.000 Hz	$5,25 \cdot 10^6 \pm 1,01 \cdot 10^5$	$2,14 \cdot 10^7 \pm 3,57 \cdot 10^6$
9.000 Hz	$5,50 \cdot 10^6 \pm 1,55 \cdot 10^6$	$2,20 \cdot 10^7 \pm 3,94 \cdot 10^6$
12.000 Hz	$5,42 \cdot 10^6 \pm 6,13 \cdot 10^5$	$2,26 \cdot 10^7 \pm 4,06 \cdot 10^6$
12.000/500 Hz	$1,27 \pm 0,20$	$1,34 \pm 0,12$

Tabla 4.7. Presentación del efecto de la velocidad de giro en la región de los ML (a 1,28 y 0,88 ppm) para la muestra de matriz activada teniendo AOBs de caleosina y tratada con DTT (n=2).

Cuando se compara el porcentaje de aumento promedio entre 500 y 12.000 Hz final de la región de los ML antes y después del tratamiento con DTT parece que en la resonancia a 1,28 ppm el aumento del área entre la máxima y la mínima velocidad estudiada es mayor para la muestra tratada con DTT, mientras que no se detectan diferencias a 0,88 ppm entre ambas muestras (figura 4.18).

Cabe señalar que el aumento aproximado en el área de los ML a 1,28 ppm cuando la matriz de Sephacryl con AOBs de caleosina unido se trata con DTT (aumento de 1,34 veces) es idéntico al ya obtenido para las AOBs de caleosina libres (1,4, tabla 4.2) y superior al obtenido tras la inmovilización (1,9, tabla 4.5).

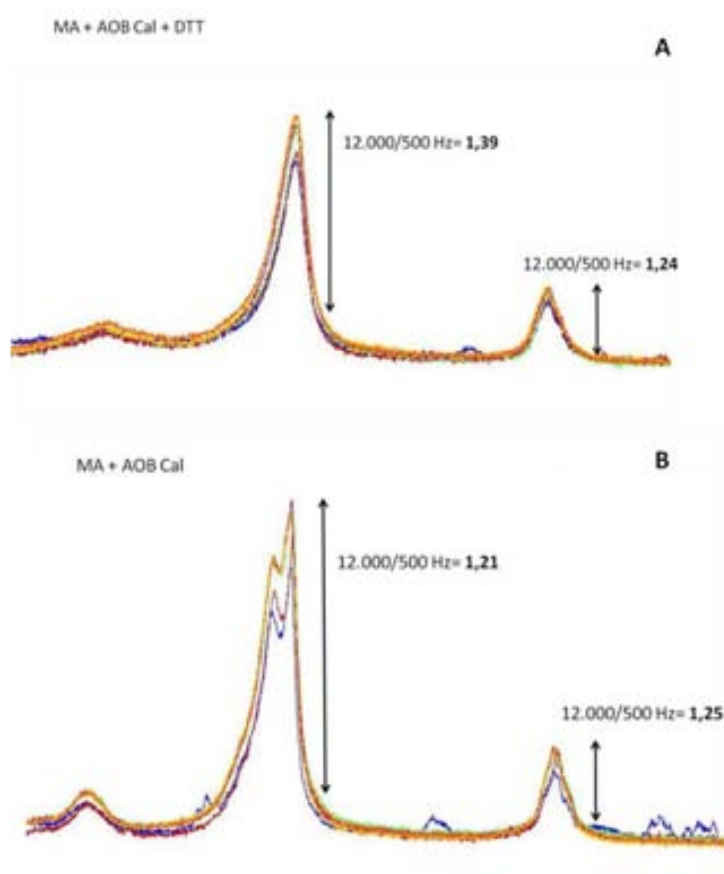


Figura 4.18. Comparación de la velocidad de giro en la región de los ML a la máxima y la mínima velocidad estudiadas para la muestra de matriz activa incubada con caleosina y tratada con DTT (A) y para la muestra antes de ser tratada con DTT (B).

4.1.5. Estudio de los liposomas multilamelares

4.1.5.1 Caracterización de los liposomas multilamelares mediante microscopía óptica y electrónica

El diámetro promedio de las preparaciones de liposomas multilamelares empleadas para evaluar el efecto de la velocidad de giro del HR-MAS en el patrón de los ML fue de $1,83 \pm 1,15 \mu\text{m}$ (figura 4.19).

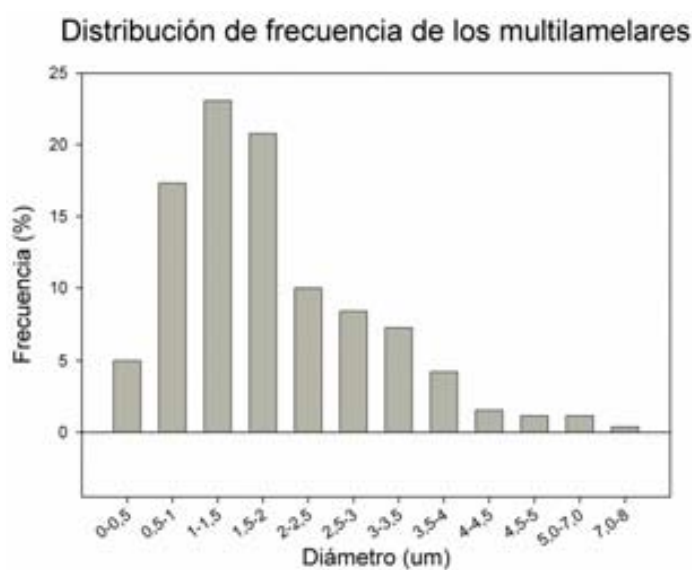


Figura 4.19. Distribución de diámetros de los liposomas multilamelares. En el eje x se representa el diámetro de las gotículas en μm .

Asímismo se evaluó la muestra por microscopía antes de realizar las adquisiciones con HR-MAS (figura 4.20). Con los resultados de microscopía confocal se pudo evaluar la distribución de tamaños global de la muestra y con los resultados de la criomicroscopía se pudo comprobar la multilamelaridad de los liposomas.

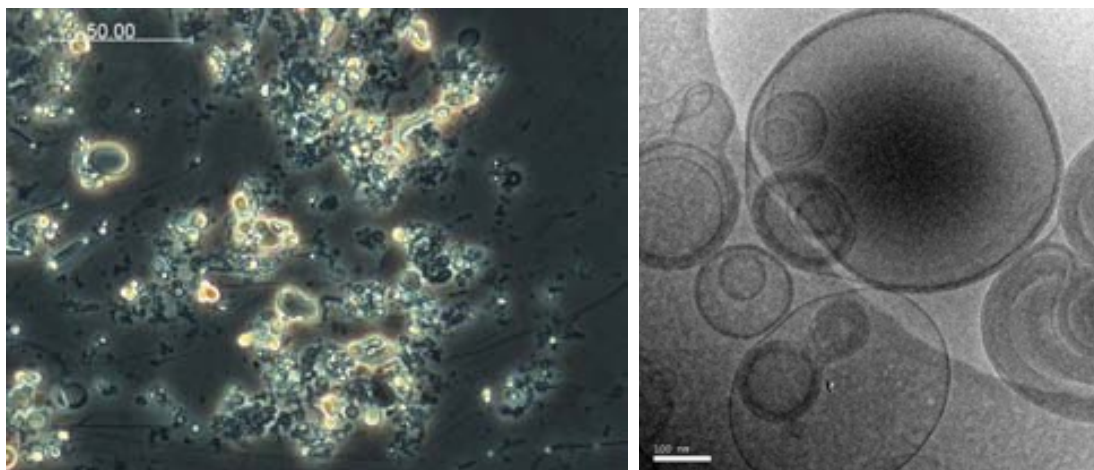


Figura 4.20. Liposomas multilamelares observados por microscopía confocal a 40x (izquierda) y microscopía electrónica (derecha). La barra blanca de la imagen de la izquierda corresponde a 50 μm y la de la derecha a 100 nm.

4.1.5.2. Efectos de la velocidad de giro en el patrón espectral de HR-MAS de los liposomas multilamelares

La velocidad de giro de los liposomas multilamelares parece que tiene un efecto de movilización de las señales de los ML así como de la región de la colina. Estos cambios se ven claramente en la figura 4.21, donde se muestra la comparación del espectro adquiridos entre 500 y 12.000 Hz.

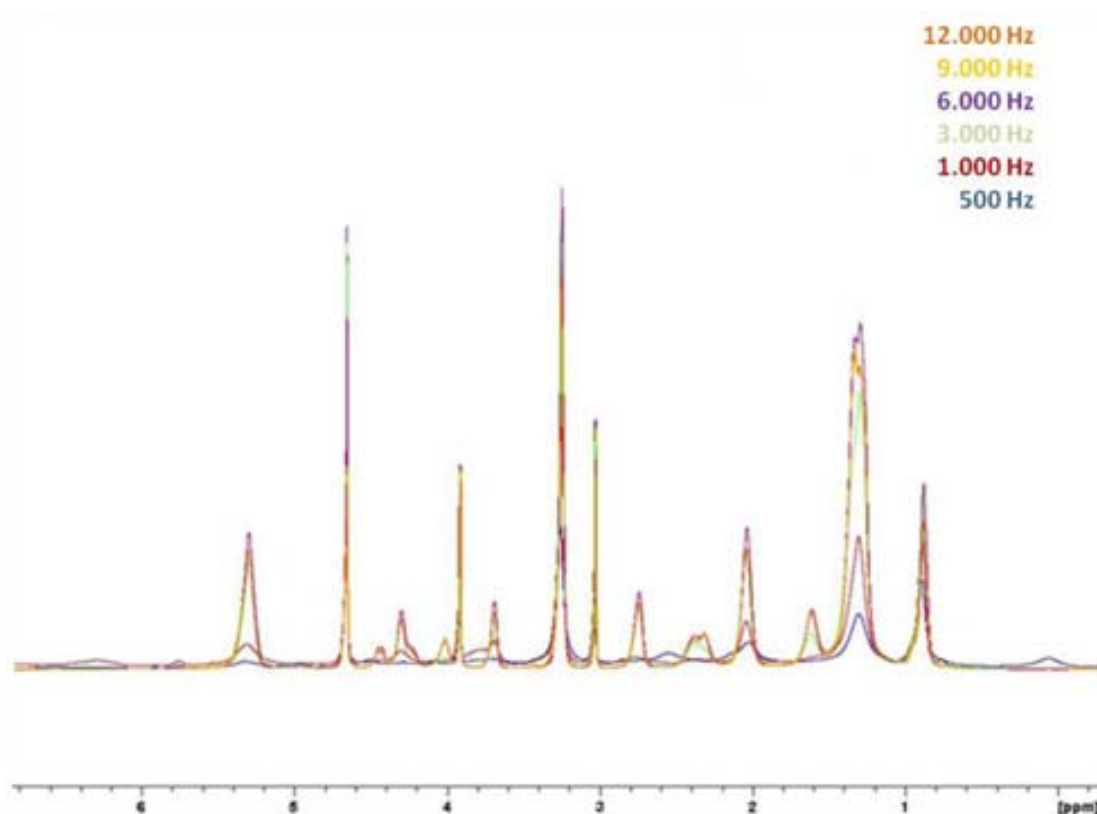


Figura 4.21. Efecto de la velocidad de giro por HR-MAS en una muestra de liposomas multilamelares. Los espectros mostrados están adquiridos girando a 500, 1.000, 3.000, 6000, 9.000 y 12.000 Hz.

En la figura 4.22 se muestra la variación del área a diferentes velocidades de giro de los ML a 0,88 y 1,28 ppm, la resonancia a 3,25 ppm y de la creatina 3,03 ppm que se añadió como estándar interno. El aumento del área de los ML a 0,88 ppm con entre 500 y 12.000 Hz fue de aproximadamente 1,8 veces (tabla 4.8), siendo este aumento significativo ($p < 0,05$) hasta 3.000 Hz. Respecto al área a 1,28 ppm, el aumento fue de aproximadamente 8,6 veces siendo significativo hasta 12.000 Hz. La resonancia a 3,25 ppm, correspondiente a fosfatidilcolina, tuvo un aumento de área de 2,2 veces aproximadamente, que fue significativo hasta 3.000 Hz.

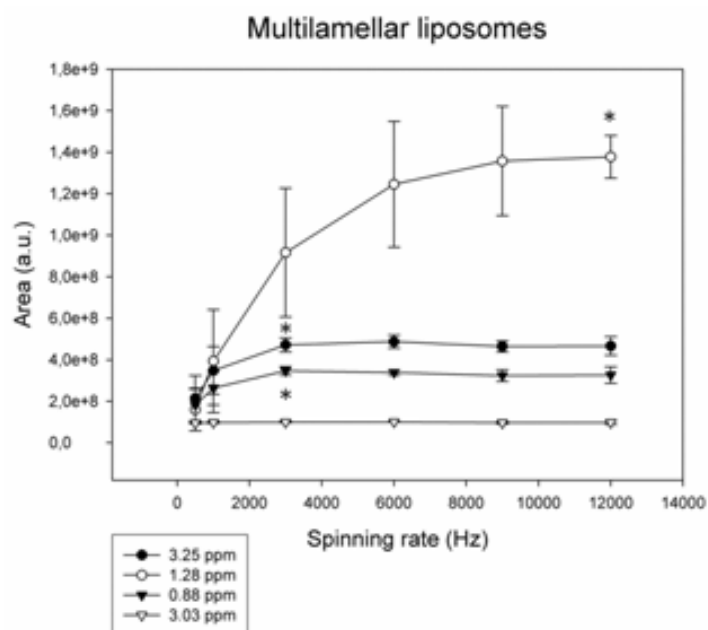


Figura 4.22. Efecto de la velocidad de giro en la visibilidad de las se ales de ML y fosfatidilcolina provenientes de liposomas multilamelares. El gráfico muestra la variación de las áreas con el aumento de la velocidad de giro para los ML a 0,88 y 1,28 ppm, la creatina a 3,03 ppm y la fosfatidilcolina a 3,25 ppm. El área de la creatina (3,03 ppm) permanece constante con la velocidad de giro creciente, las resonancias a 0,88 y 3,25 ppm muestran un aumento significativo del área hasta 3.000 Hz, marcados por los asteriscos, mientras que la resonancia a 1,28 ppm muestra diferencias con la velocidad hasta 12.000Hz.

Velocidad de giro	0,88ppm	1,28ppm	3,25ppm
500Hz	$1,82 \cdot 10^8 \pm 7,63 \cdot 10^7$	$1,60 \cdot 10^8 \pm 1,02 \cdot 10^8$	$2,14 \cdot 10^8 \pm 1,10 \cdot 10^8$
1000Hz	$2,64 \cdot 10^8 \pm 8,21 \cdot 10^7$	$3,93 \cdot 10^8 \pm 2,48 \cdot 10^8$	$3,49 \cdot 10^8 \pm 1,15 \cdot 10^8$
3000Hz	$3,47 \cdot 10^8 \pm 1,99 \cdot 10^7$	$9,17 \cdot 10^8 \pm 3,10 \cdot 10^8$	$3,49 \cdot 10^8 \pm 1,15 \cdot 10^7$
6000Hz	$3,39 \cdot 10^8 \pm 1,28 \cdot 10^7$	$12,50 \cdot 10^8 \pm 3,03 \cdot 10^8$	$4,88 \cdot 10^8 \pm 3,24 \cdot 10^7$
9000Hz	$3,24 \cdot 10^8 \pm 2,75 \cdot 10^7$	$13,60 \cdot 10^8 \pm 2,63 \cdot 10^8$	$4,64 \cdot 10^8 \pm 2,64 \cdot 10^7$
12000Hz	$3,27 \cdot 10^8 \pm 3,97 \cdot 10^7$	$13,80 \cdot 10^8 \pm 1,03 \cdot 10^8$	$4,66 \cdot 10^8 \pm 4,49 \cdot 10^7$
12000/500Hz	1,79	8,59	2,18

Tabla 4.8. Cambio en las áreas de los ML a 0,88 y 1,28 ppm y la fosfatidilcolina a 3,25 ppm para los liposomas multilamelares (n=3).

4.1.6 Discusión del efecto de la velocidad de giro en espectros HR-MAS a 9,4 T en el análisis de muestras conteniendo ML

En el trabajo de Quintero y colaboradores [80] se propuso que la restricción en la visibilidad de los ML en células C6 de glioma de rata podía estar relacionada con el tamaño de las gotículas lipídicas de lípidos neutros y/o con la unión de las mismas al citoesqueleto. En este trabajo se ha intentado comprobar parte de esta hipótesis usando las AOB como modelos de las gotículas lipídicas que aparecen en las células tumorales de forma natural. Este sistema modelo fue elegido debido a la amplia literatura existente acerca de él [139, 141, 189], en la que se describe una preparación reproducible de gotículas lipídicas artificiales de tamaños definidos y estables a temperatura fisiológica. Las AOBs de oleosina preparadas en esta tesis muestran un diámetro promedio (780 ± 580 nm) que se esperaba que produjera una visibilidad completa o casi completa del contenido en TAG, mientras que las AOBs de caleosina, con un diámetro promedio de 240 ± 293 nm se esperaba que empezaran a mostrar una movilidad de los TAG parcialmente restringida. Los resultados mostrados en la figura 4.10 y las tablas 4.2 y 4.3 parece que sólo se corresponden parcialmente con la hipótesis de partida de la restricción diferencial en función del diámetro de las gotículas, porque la detección de las resonancias de los ML está parcialmente restringida para los dos tipos de AOBs estudiados. Así, el contenido de TAG de las AOBs sólo es parcialmente visible por HR-MAS a baja velocidad, ya que las resonancias de los ML a 0,88 y 1,28 ppm son significativamente menores que a 15.000 Hz. En consecuencia, el tamaño de las gotículas lipídicas en sí mismo puede producir, posiblemente por efectos de restricción de la movilidad de los “lípidos periféricos” [190, 191], una reducción aparente del área detectable de TAG. La reducción del diámetro promedio de 780 a 240 nm no parece suficiente para generar diferencias en la restricción a la visibilidad de los ML considerados, que, en todo caso, sólo llega a aumentar un factor de 1,4 veces su área relativa entre 500 y 15.000 Hz, lejos aún del factor de hasta 21 veces que podría llegarse a esperar de los datos de la referencia [80]. Hay que tener en cuenta que el aumento debido al giro en condiciones de HR-MAS podría ser mayor ya que no pudieron obtenerse resultados utilizables en el rotor de HR-MAS por debajo de los 500 Hz, con lo que el aumento de área observable debido a las condiciones de HR-MAS podría ser algo superior a las 1,4 veces de aumento de las tablas 4.2 y 4.3.

Al inmovilizar las AOB en una matriz de Sephacryl S-1000 sólida, se detecta una reducción significativa de los cambios en el área de los ML con la velocidad de giro. Mientras que en las AOB libres se detectan cambios en el área de las

resonancias a 1,28 y 0,88 ppm tanto en las AOB de caleosina como los de oleosina hasta 3,000 Hz, al inmovilizar dichos AOB (figura 4.13) los cambios significativos en el área de los ML sólo se detectan hasta 500 Hz para los AOB de oleosina y en cambio se dejan de detectar cambios significativos en las AOB de caleosina (figura 4.16). Dado el límite de exclusión del Sephacryl S-1000 (400 nm) la mayor parte de las AOBs de caleosina estarán en el interior de las partículas de Sephacryl, pero sólo una parte de las AOBs de oleosina, los de diámetro inferior a 400 nm, estará en el interior. Esta diferencia, además del diámetro intrínseco de las AOBs podría coadyuvar a una mayor inmovilización de las AOBs de caleosina en la matriz de Sephacryl activada. Dado que la inmovilización aparentemente máxima se había conseguido con las AOB de caleosina, el experimento de liberación mediante incubación con DTT (sección 3.2.6.) se llevó a cabo sólo con ellas. Así, cuando se trató la matriz con DTT para liberar las AOB de caleosina, las resonancias a 0,88 ppm siguieron sin mostrar cambios significativos, mientras que las resonancias a 1,28 ppm pasaron a mostrar diferencias significativas a 500 Hz con respecto al resto de velocidades (aumento de área por un factor de 1,39), excepto a 1.000 Hz.

Basándonos en los resultados reflejados en la tabla 4.2 para las AOBs de caleosina, se podría esperar un aumento de aproximadamente 1,4 veces en el área entre 500 y 15.000 Hz. En cambio, con las AOBs de caleosina ligados a la matriz sólida activada no llega ni a un factor de 1,2 y, además, no es una diferencia significativa. Es decir, que si inmovilizas una gotícula artificial de unos 200 nm de diámetro de manera que no puede girar libremente, ni el HR-MAS puede aumentar la señal de ML producida. Debemos concluir, por tanto, de ese experimento parcial que se han inmovilizado AOBs de caleosina en Sephacryl S-1000 (hasta un 42,9 % de manera inespecífica y el resto mediante derivatización covalente). También hay que destacar que el patrón de ML no desaparece en las gotículas de caleosina inmovilizadas en Sephacryl S-1000, aunque no sabemos si hay una parte de las ML de esas gotículas que no son visibles incluso con HR-MAS a 12.000 Hz. La inmovilización de AOBs de caleosina en la matriz sólida, sea de manera covalente o inespecífica impide el efecto movilizador del HR-MAS entre 500 y 3.000 Hz. Por lo tanto, si consideramos las AOBs de caleosina como un buen modelo de gotículas lipídicas “pequeñas” (aproximadamente de 200 nm de diámetro), deberíamos considerar probado que una restricción de su movilidad rotacional disminuye la visibilidad por RMN de ^1H en condiciones de giro HR-MAS a 3.000 Hz, por un factor aproximado del 40 %.

Por otra parte, con respecto a las AOBs de oleosina podemos concluir que se han inmovilizado AOBs de oleosina en Sephacryl S-1000 (hasta un 36,6 % de manera inespecífica y el resto mediante derivatización covalente). El patrón de ML tampoco desaparece para las gotículas de oleosina inmovilizadas en Sephacryl S-1000, aunque no sabemos si hay una parte de los ML de esas gotículas que no son visibles incluso con HR-MAS a 12.000 Hz. En cualquier caso, la inmovilización de AOBs de oleosina en Sephacryl S-1000, sea de manera covalente o inespecífica, reduce el efecto movilizador del HR-MAS entre 500 y 3.000 Hz. Por lo tanto, si consideramos las AOBs de oleosina como un buen modelo de las gotículas “grandes” en C6 (aproximadamente 1 μm de diámetro) deberíamos concluir que incluso con ese diámetro su inmovilización reduce parcialmente el efecto movilizador del HR-MAS (de factor 1,4 a factor 1,2, aproximadamente).

Respecto a los liposomas multilamelares, el aumento de la velocidad de giro de su preparación produce un aumento significativo de las resonancias de ML y fosfatidilcolina, mientras que la creatina control no varía (figura 4.21 y tabla 4.8). El aumento del área se estabiliza a partir de 3.000 Hz para la fosfatidilcolina y los ML a 0,88 ppm y a 12.000 ppm para los ML a 1,28 ppm. Si comparamos los datos de área absoluta a 12.000 Hz para ML a 1,28 ppm y fosfatidilcolina a 3,25 ppm encontramos un área 3 veces mayor para los ML a 1,28 ppm. Si aplicáramos ese mismo cociente a los valores de ML y fosfatidilcolina (en forma de ChCCP) en células C6 de 7 días de cultivo a 12.000 Hz (tabla 4.1) esperaríamos una contribución de ML a 1,28 ppm por parte de estructuras multilamelares de aproximadamente $6,12 \cdot 10^7$, comparado con $7,10 \cdot 10^8$ (tabla 4.1). Por lo tanto, de ser válidos esos liposomas multilamelares como modelo de lo que acaece en las células C6, sólo un 9 % del área de la resonancia de ML a 1,28 ppm observado en células C6 de 7 días sería explicable por estructuras subcelulares distintas de las gotículas lipídicas y su contenido en lípidos neutros (principalmente TAGs).

Los resultados de HR-MAS de los *pellets* de las células C6 de día 4 (fase log de crecimiento) y día 7 (fase post-confluente) siguen un comportamiento algo diferente respecto a las AOB. Así, en los resultados de HR-MAS para la resonancia de los ML a 1,28 ppm, existe un aumento de 4,6 veces para las células C6 de día 4 y, como se muestra en la figura 4.3, ni girando a 15.000 Hz se alcanza una zona asintótica en el aumento del área de los metilenos (ML a 1,28 ppm). En consecuencia, parece que parte del *pool* de las cadenas de ácidos grasos de los TAG en células C6, a diferencia de las AOBs, no puede llegar a ser completamente movilizado por HR-MAS. Una manera de interpretar estos resultados sería considerar las siguientes posibilidades: 1)

las AOBs de caleosina y oleosina no modelan adecuadamente el comportamiento de las gotículas lipídicas presentes en las células C6 de glioma de rata debido a diferencias en los lípidos neutros en ellos contenidos, los fosfolípidos presentes en las estructuras micelares formadas o una combinación de todos esos factores; 2) las AOBs de caleosina y oleosina libres no representan adecuadamente el comportamiento de la fracción de las gotículas lipídicas en las células C6 de pequeño diámetro (60-200 nm de diámetro) asociadas al citoesqueleto.

En todo caso, los resultados obtenidos con la inmovilización de AOBs en Sephacryl S-1000 parecen sugerir que las gotículas pequeñas de caleosina se ven fuertemente afectadas por dicha inmovilización (figura 4.16), con lo que el giro con HR-MAS no puede producir un aumento de la visibilidad de los ML en ellos contenidos, que si se vuelven a hacer parcialmente visualizables al romper esa inmovilización covalente (figuras 4.17 y 4.18). Si aceptáramos como hipótesis de trabajo dicha interpretación, deberíamos concluir que el aumento de ML observado en las células C6 de glioma de rata, tanto de día 4 como de día 7, no parece corresponder a gotículas pequeñas asociadas al citoesqueleto, sino a gotículas con capacidad de giro libre, como las AOBs de caleosina y oleosina. Sin embargo, el aumento de área de los ML en el caso de AOBs es de 1,4 veces mientras que en el caso de las células C6 es de 4,6 veces (para C6 de 4 días de cultivo) y de 21 veces el “máximo” esperado según la referencia [80]. Un aspecto adicional importante a tener en cuenta es que las AOBs no muestran una resonancia detectable para la resonancia de los ChCCp para la fosfatidilcolina (PtdCho) micelar, mientras que en las células C6 se detecta claramente esta resonancia en las mismas condiciones (comparar las figuras 4.2 y 4.10). La ausencia de visibilidad de la resonancia de PtdCho podría estar en relación con el elevado cociente volumen/superficie de las AOBs, siendo la contribución principal de los ML la de los TAG del interior de las gotículas, mientras que sólo en la superficie se pueden encontrar los fosfolípidos contribuyendo a la resonancia de la PtdCho. Por otro lado, la resonancia de la PtdCho muestra un claro aumento en su área, de hasta 7,2 veces en las células de día 7, entre 500 y 15.000 Hz. Como la PtdCho de las AOBs es insignificante esto se podría interpretar como que la señal de PtdCho en las células C6 se origina de grupos de fosfatidilcolina procedentes de endosomas no micelares y que por lo tanto no contengan TAG. La visibilidad de la PtdCho ha sido descrita para preparaciones de vesículas de membrana exploradas por RMN clásica de estado líquido [192] y también para estado líquido o espectros de HR-MAS de liposomas unilamelares o multilamelares [193]. Por lo tanto, una proporción no cuantificada de la variación de los ML con el cambio de la velocidad en HR-MAS podría provenir de las

cadena de ácidos grasos de los fosfolípidos en endosomas intracelulares, para los cuales un aumento en la detección de la PtdCho podría esperarse con la adquisición por HR-MAS. En consecuencia, los endosomas multilamelares celulares (por ejemplo vacuolas autofagosómicas) podrían también contribuir tanto a la señal de PtdCho como de los llamados genéricamente ML en condiciones de giro de alta velocidad en experimentos de HR-MAS. Deberíamos concluir por lo tanto esta sección considerando probado que existe un *pool* de cadenas de ácidos grasos en células C6 de glioma de rata movilizable para su detección mediante espectroscopía de RMN de ^1H , siempre que dichos espectros se obtengan mediante metodologías de giro en ángulo mágico. Dicho *pool* “explica” parte de los ML en TAG no visibles por RMN de ^1H clásica de líquidos descritas anteriormente por el GABRMN [80]. Es decir, que entre 500 y 15.000 Hz, el área de la resonancia de los metilenos de ácidos grasos a 1,28 ppm se multiplica por un factor máximo de 4,6 veces, lo que unido a que no llega a un estadio asintótico además del posible aumento entre 0 y 500 Hz nos permite explicar parte de las 21 veces de aumento esperadas en [80]. Sin embargo, no debe descartarse una contribución aún no cuantificada plenamente en condiciones de giro de HR-MAS, de cadenas de ácidos grasos de endosomas multilamelares a dicho aumento de señal de ML a 1,28 ppm. Sin embargo, la contribución de las cadenas de ácidos grasos de fosfolípidos de estructuras multilamelares de células C6 no explicaría la mayor parte del aumento de área observado para los ML a 1,28 ppm que deberían por tanto proceder de gotículas citosólicas conteniendo lípidos neutros. Hay que tener en cuenta para explicar el aumento aparente de ML descrito previamente en el GABRMN para células C6 en cultivo [80], se propusieron factores que explicarían una reducción de señal detectable: la inmovilización de gotículas lipídicas pequeñas (diámetro < 240 nm) por asociación al citoesqueleto; mientras que explicaría un aumento de señal detectable una fusión de gotículas pequeñas asociadas a citoesqueleto produciendo gotículas grandes y, preferentemente, sin asociación al citoesqueleto y por lo tanto, con capacidad de libre giro (figuras 1.21 y 4.23).

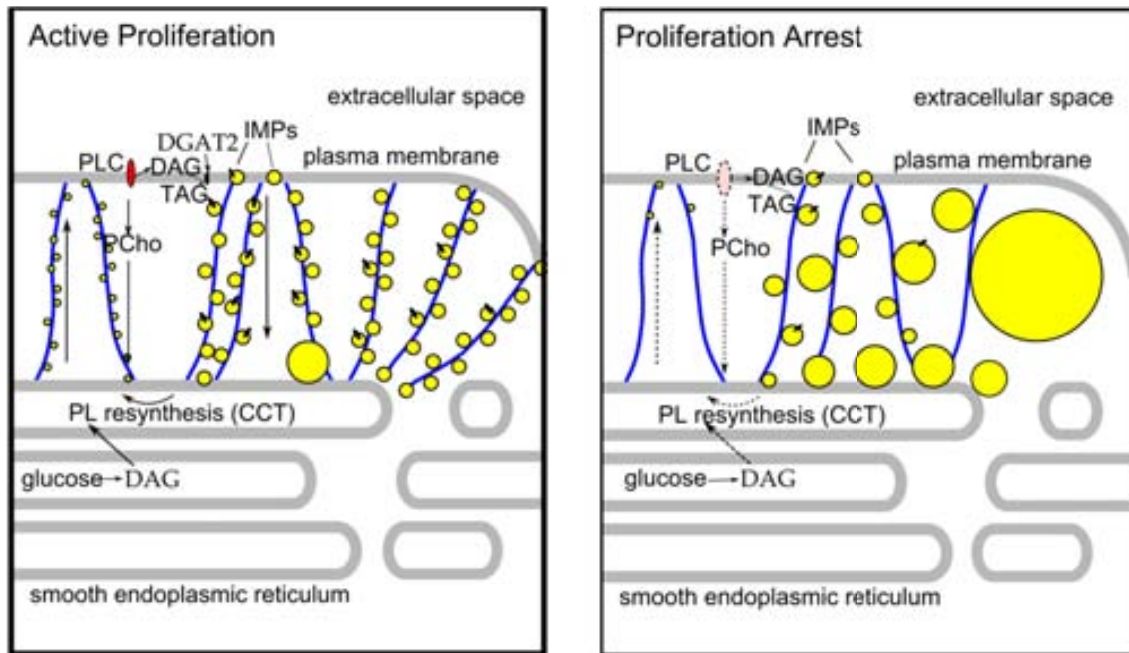


Figura 4.23. Esquema de la dinámica de las gotículas lipídicas citosólicas que contienen TAG en células C6, en A proliferando activamente y en B en parada de la proliferación. IMPs: *intramembrane particles*, partículas intramembrana; PL: fosfolípidos; CCT: CTP-fosfolina citidiltransferasa; PCT: fosfolina transferasa. Imagen tomada de Quintero y colaboradores [82].

Cabe tener en cuenta también que, en el trabajo previo de Griffin y colaboradores [194], sobre la detección de los ML en células BT4C de glioma en apoptosis bajo terapia génica que induce muerte celular no encontraron ningún efecto aparente en la velocidad de giro (entre 1.000-9.000 Hz) o de la variación de la temperatura (entre 4 °C- 20 °C) en la región de los ML. De todas formas, no se dieron detalles de la cuantificación de las resonancias de ML con respecto a otras referencias internas como la creatina. Teniendo este detalle en cuenta, cuando se analiza con detenimiento su figura 5 (figura 4.24), los resultados sugieren que los incrementos relativos del contenido en ML con respecto a la creatina entre 1 °C y 20 °C parecen estar teniendo lugar, lo que concuerda con experimentos similares sobre la dependencia de la temperatura de los ML en células C6 y en biopsias tumorales humanas [195]. Desgraciadamente no es posible evaluar los posibles cambios en la intensidad aparente de los ML con la velocidad de giro con los datos aportados en [194].

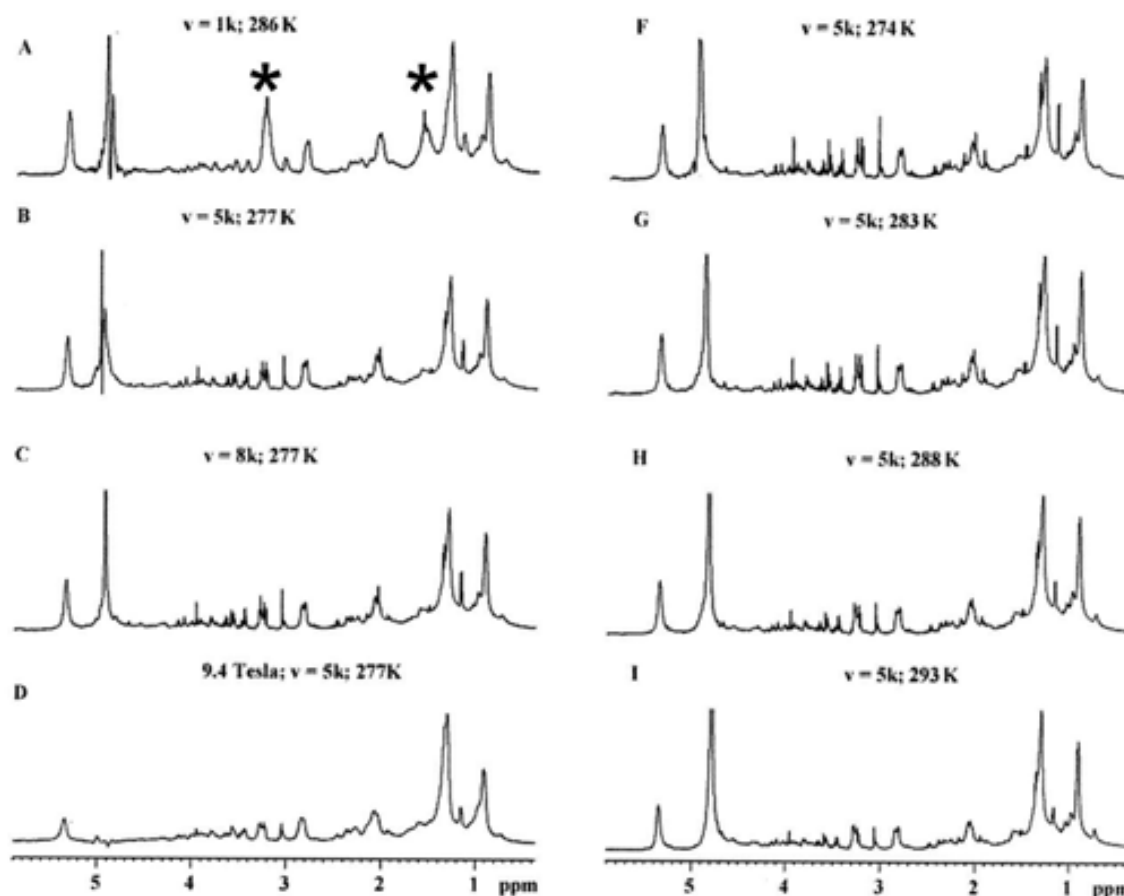


Figura 4.24. Imagen tomada de Griffin y colaboradores [194] donde se muestra el efecto de la velocidad de giro, temperatura e intensidad de campo en espectros de ^1H de HR-MAS. Las muestras de tumor (gliomas BT4C) de día 9 de tratamiento con ganciclovir fueron estudiadas en un rotor MAS a 14,1 (A-C, F-I) y a 9,4 T (D). La temperatura de la sonda y la velocidad de giro (v) están indicadas en la imagen. El asterisco (*) indica las sidebands visibles en la región espectral de A.

El análisis por HR-MAS de los *pellets* de las células C6 se realizó asumiendo que no habría cambios significativos en la creatina total a 3,03 ppm con la velocidad de giro, lo que se verificó cuando se compararon los datos a 500 Hz con los obtenidos a alta velocidad (figura 4.2), lo que concuerda con la literatura previa en el tema en la que se describe la constancia del valor de la creatina en extractos de células C6 de día 4 y 7 de cultivo [36]. Además, también se había visto que la adquisición de espectros de HR-MAS de duración limitada no afectaba a la cantidad de creatina total detectada en biopsias de tumores cerebrales humanas [195]. Por el contrario, se ha descrito un aumento en el contenido aparente de creatina de muestras de tejido con el HR-MAS a lo largo del tiempo (3 horas a 4 °C y velocidad de giro de 5.000 Hz) [196]. En dicho trabajo el porcentaje de cambio medido para la creatina variaba en función del tipo de

tejido analizado (hasta un 68 % de aumento para el cerebro de rata, pero sólo un 10 % de aumento para las biopsias de glioblastoma). En nuestro caso esperaríamos que las células C6 de glioma de rata se comportaran se forma similar a lo descrito en las biopsias de glioblastoma [196] y, por lo tanto, se esperarían pequeños cambios o la ausencia de los mismos en la creatina total, como fue el caso. Una posible limitación de la comparación de los resultados entre las células C6 y de las AOB podría ser la pérdida de viabilidad e integridad en las C6 debido a la alta velocidad de giro, de hasta 15.000 Hz. A pesar de dicha velocidad de giro, las células C6 girando 60 minutos a 37 °C y 3.000 Hz mantienen la integridad del 80 % de las mismas, mientras que el 17 % son viables por *Trypan blue*. Por tanto, se debería considerar el *pellet* de las células C6 investigado más próximo al tejido *ex vivo* de una biopsia que a una muestra de células vivas en cultivo.

B. Estudio de la metabolómica de tumores cerebrales preclínicos mediante estrategias de reconocimiento de patrones

4.2 Obtención de clasificadores para tumores cerebrales preclínicos basados en ERM e IERM.

El tiempo destinado al desarrollo de cada clasificador utilizando un ordenador con 2,4 GHz de CPU (unidad central de procesamiento) y 3 GB (gigabytes) de RAM (*random access memory*) fue de unos cinco minutos para cada selección de las variables (ppm de los espectros correspondientes a características espectrales de metabolitos que permitiesen la distinción entre tipos tumorales) y de unos tres segundos para realizar el análisis lineal discriminante de Fisher, incluyendo los datos de los grupos de entrenamiento y test.

4.2.1 Diferenciación entre glioblastoma, oligodendroglioma de grado II y parénquima cerebral sano. Clasificador 1.

El grupo de entrenamiento del clasificador tuvo un 90 % de acierto, evaluándolo por *Bootstrapping*, al seleccionar al menos 5 variables (figura 4.25). Al evaluar la robustez del clasificador obtenido con el grupo test independiente el valor más bajo de BER (4,2 %) se obtuvo tomando 6 variables mediante el sistema SFFS. Las características espectrales seleccionadas se muestran en el anexo 7.4. De las 6 variables (figura 4.25) priorizadas por el *Spectra Classifier* para el clasificador óptimo una puede corresponder a zonas donde resuenan los lípidos móviles (1,30 ppm), NAA (2,01 ppm), alanina (1,45 ppm), glutamato (2,34 ppm), glucosa (3,85 ppm) y a mio-inositol/glicina/glucosa (3,51 ppm) (tabla 1.1).

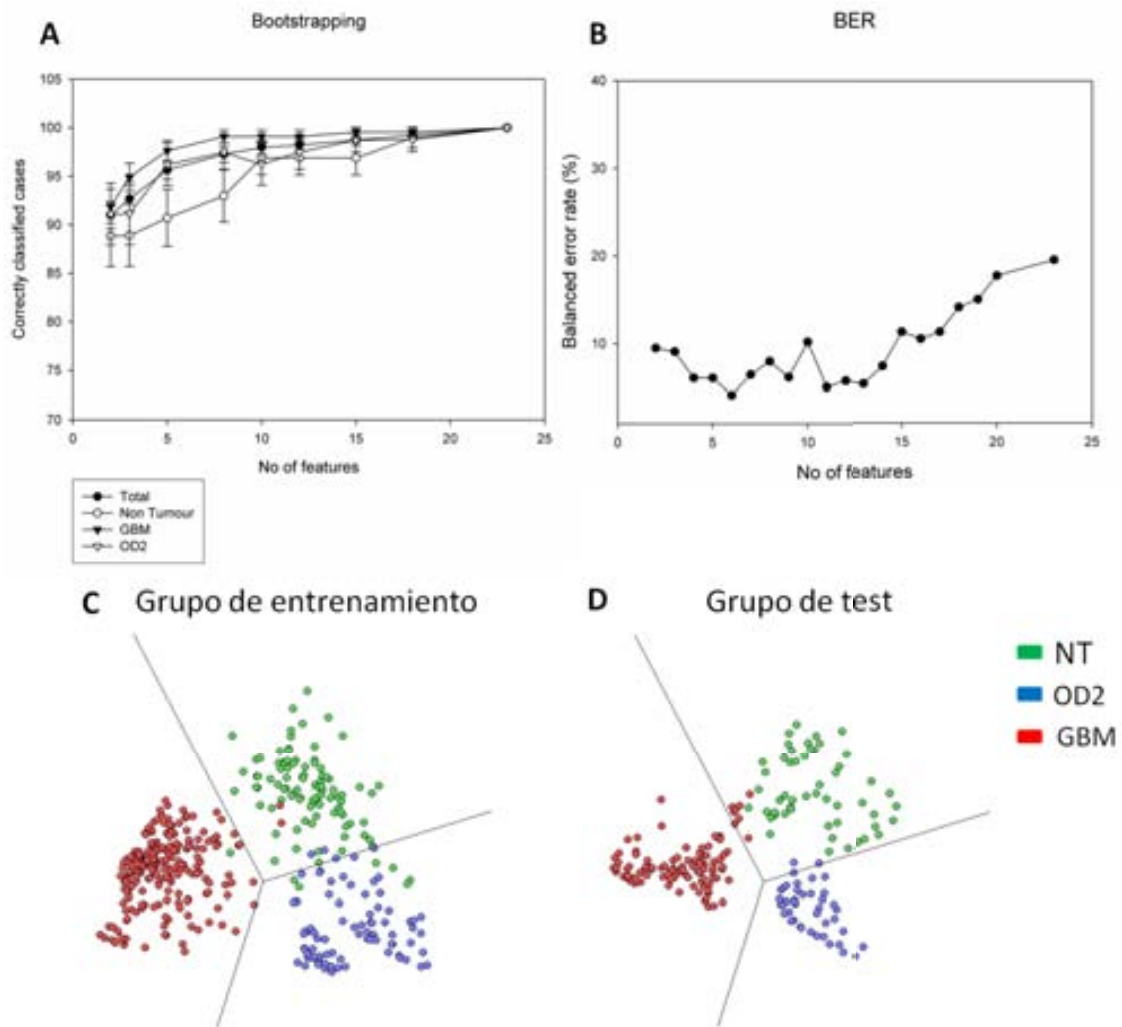


Figura 4.25. En la figura A se muestran los resultados del *Bootstrapping* para evaluar el grupo de entrenamiento del clasificador en el que se muestran el resultado global, la curva del tejido no tumoral, la curva de los GBM y de los OD2. En B se muestra la curva BER para evaluar el grupo de test. Los puntos más bajos de la curva BER se obtienen seleccionando 6 variables (4,2 %) y 11 variables (5,1 %). En las imágenes de abajo se muestra la distribución de los casos para el grupo de entrenamiento (C) y de test (D) seleccionando 6 variables. OD2: oligodendroglioma II; GBM, Glioblastoma; NT: no tumoral.

En la figura 4.26 se muestran los promedios de los tipos de tejido estudiados así como las variables que han sido seleccionadas en verde.

Resultados y discusión

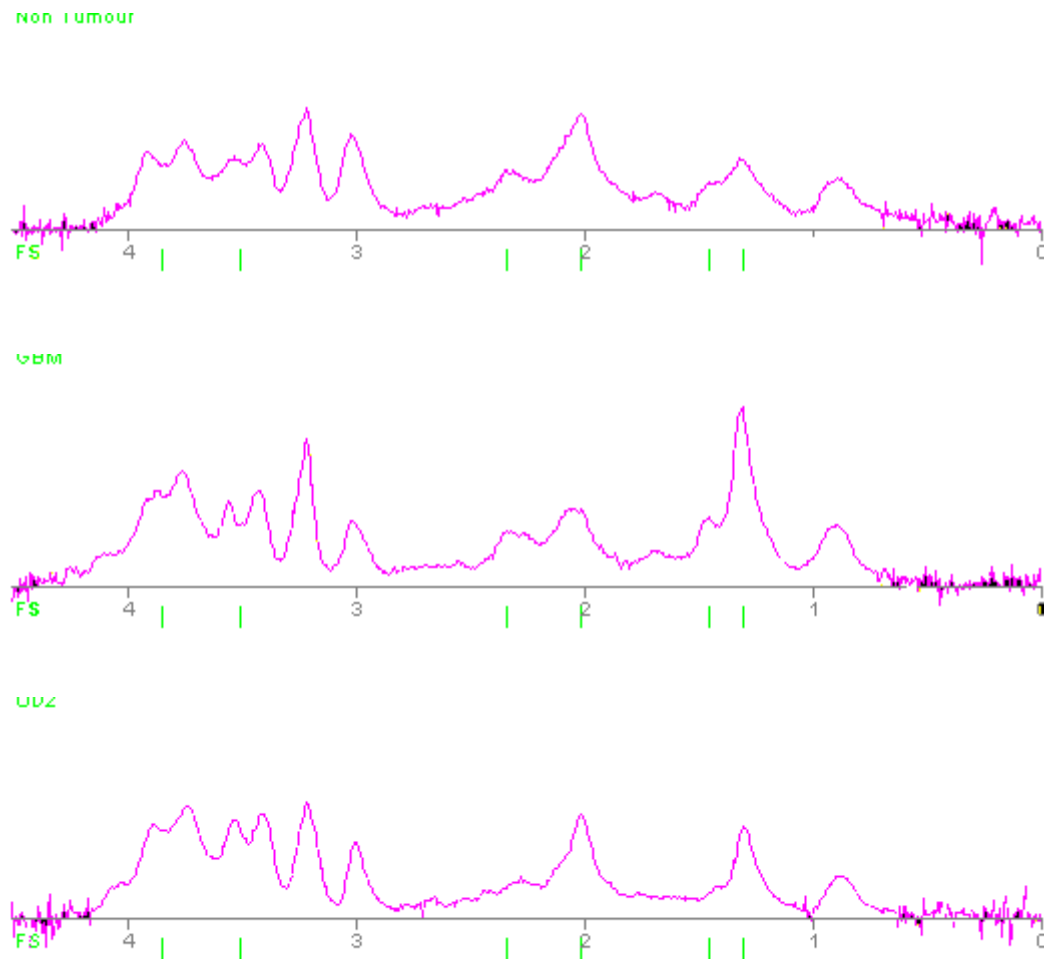


Figura 4.26. Espectros promedio de los espectros no tumorales (imagen superior), de los glioblastomas (imagen media) y los oligodendrogliomas de grado 2 (imagen inferior). En verde se muestran la posición de las variables seleccionadas por el Spectra Classifier (FS, *feature selection*). Ver también Anexo 7.4.

En la figura 4.27 se muestran los resultados de grupo de test en forma de mapa nosológico. Utilizando el clasificador de 6 variables para los GBM C69, C233 y C408 se clasificaron correctamente todos sus spv, tanto de la región que corresponde a zonas de tejido sano como de tejido tumoral. Sin embargo los spv del ratón C432 se clasificaron bien para la zona NT pero el borde de la región del GBM parece que fue identificado como NT en vez de GBM. Esto podría deberse a que al estar cerca de dicho borde tumoral, podría haber mezcla quizás por infiltración de tejido no tumoral y GBM.

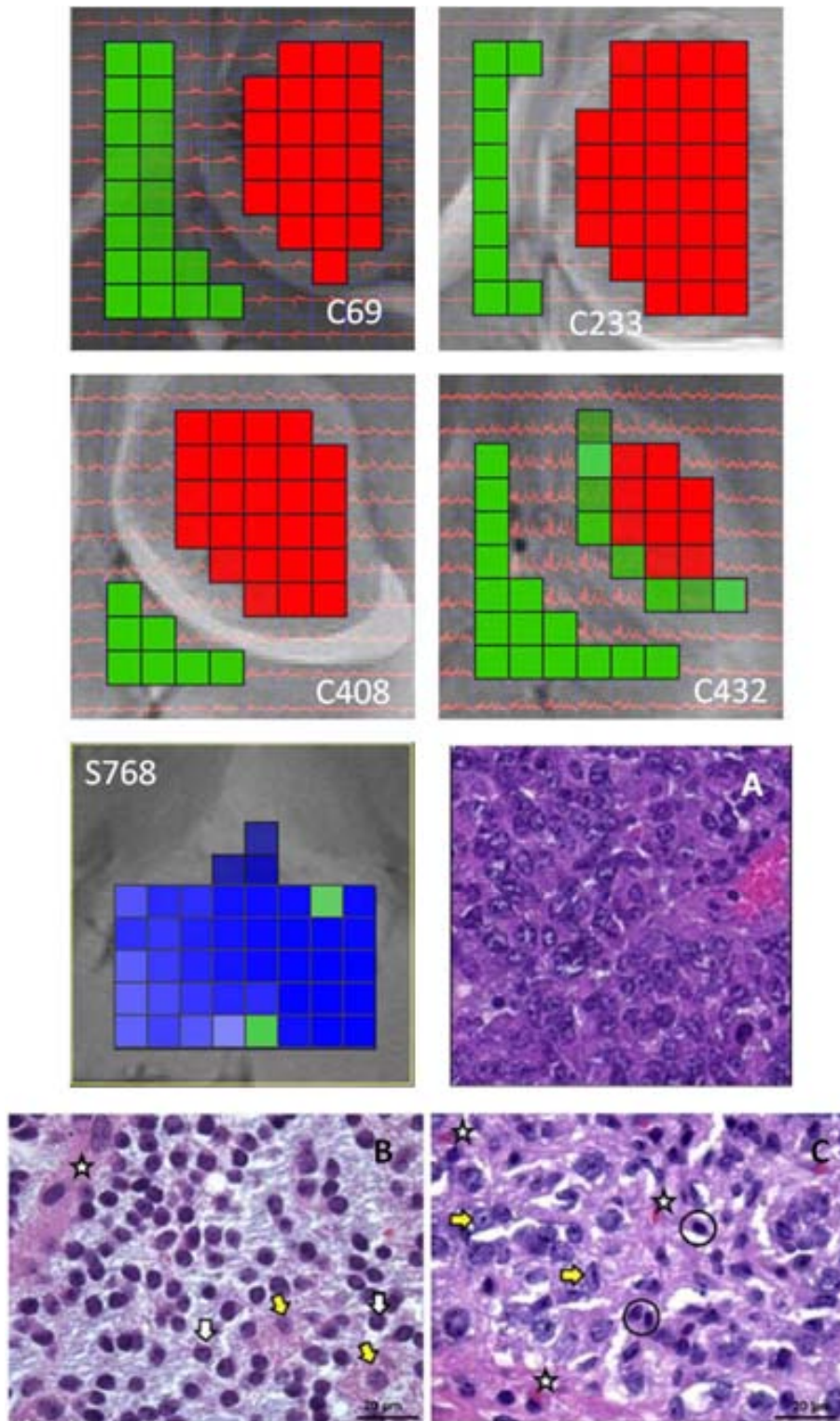


Figura 4.27. Imágenes de T_{2w} de la zona cerebral seleccionada para ubicar el VOI para IERM de 5 de los ratones investigados con las imágenes nosológicas obtenidas del clasificador 1 para las zonas seleccionadas como tumorales o tejido sano. Se muestran los resultados de la clasificación del grupo de test de los GBM (C69, C233, C408 y C432) y del ratón con OD2 (S768). El color verde corresponde a las zonas que el clasificador etiquetaría como tejido normal, en rojo las zonas que corresponderían a GBM y en azul las zonas que corresponderían

Resultados y discusión

a OD2. Las imágenes A, B y C corresponden a tinciones hematoxilina-eosina de un ejemplo de GBM (A) y a los dos tipos de tejido detectados por histología en el tumor del animal S768. La imagen B corresponde a la mayoría del tumor OD2. Las flechas blancas señalan células características de este tipo tumoral en forma de panal y la estrella indica un capilar de paredes finas presente en la región de estudio. Las flechas amarillas indican algunas células de patrón más indiferenciado que el anterior. La imagen C muestra la población en transición (grado IV) con células típicas de este estadio (flechas amarillas), vasos sanguíneos más prominentes (estrella) y células necróticas con núcleos picnóticos (círculos). La imagen A corresponde a un GBM GL261 (grado IV) en la que se puede comparar la similitud con los resultados histológicos de la figura C.

Respecto a la clasificación del OD2, excepto 4 spv de la zona periférica del tumor, que son clasificados como NT, el resto de las regiones seleccionadas son clasificadas como OD2. Si se observa detenidamente la figura, se puede apreciar que hay dos tonalidades de azul, que indican diferente confianza en la clasificación del clasificador, correspondiendo el color oscuro a una clasificación con mayor confianza. Las zonas clasificadas como OD2 con menor confianza, parecen corresponder con la zona que por histopatología se vio que estaban evolucionando a un grado tumoral superior (figura 4.27 C).

En la figura 4.28 se muestra la distribución de aciertos y errores tanto del grupo de entrenamiento del grupo de test y donde se puede apreciar que en ambos grupos y en los tres tipos de tejido estudiado (GBM, OD2 y NT) el porcentaje de acierto es muy superior al de error.

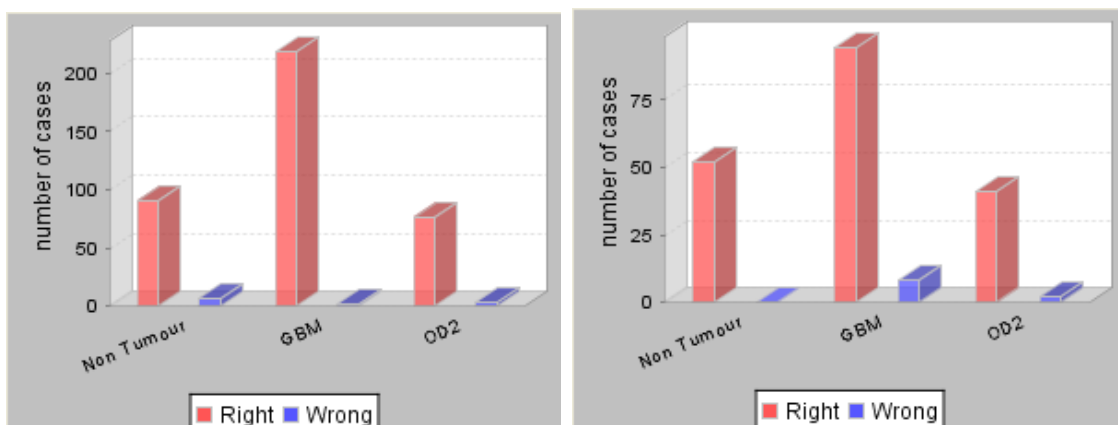


Figura 4.28. Distribución de errores y aciertos del grupo de entrenamiento (izquierda) y del grupo de test (derecha).

4.2.2 Diferenciación entre glioblastoma, oligodendroglioma de grado III y parénquima cerebral sano. Clasificador 2.

El grupo de entrenamiento del clasificador tuvo un 90 % de acierto, evaluándolo por *Bootstrapping*, al seleccionar al menos 5 variables (figura 4.29). Al evaluar la robustez del clasificador obtenido con el grupo test independiente el valor más bajo de BER (15 %) se obtiene seleccionando 15 variables mediante el sistema SFFS. El grupo de entrenamiento parece que se clasifica muy bien con 15 variables (99,18 % de acierto global), pero el análisis del grupo de test mediante el BER parece indicar que está habiendo algo de sobreentrenamiento en el clasificador. Las características espectrales seleccionadas se muestran en el anexo 7.4. De las 15 variables seleccionadas por el *Spectra Classifier* las variables seleccionadas corresponden a zonas donde resuenan según el tipo de tejido considerado, los lípidos móviles (1,30, 1,32, 1,97, 1,29 ppm), NAA (2,00, 2,01 y 2,05 ppm), glutamato (2,34 ppm), ChCCp (3,12, 3,10, 3,11 y 3,15 ppm), creatina (3,05 y 4,04 ppm) y mio-inositol/glicina/glucosa (3,52 ppm).

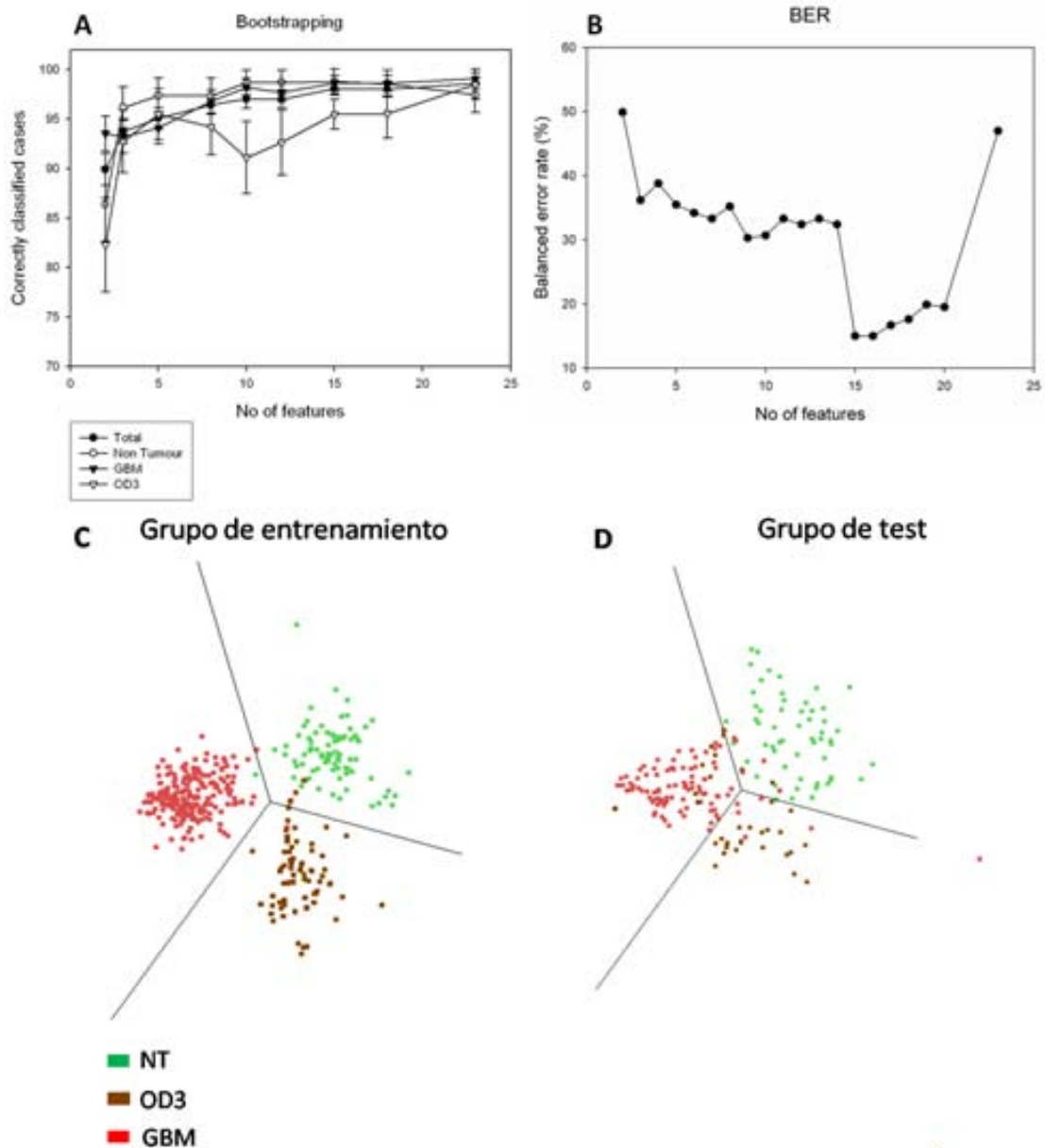


Figura 4.29. En A se muestran los resultados del *Bootstrapping* para evaluar el grupo de entrenamiento del clasificador en el que se muestran el resultado global, la curva del tejido no tumoral, la curva de los GBM y de los OD3. En B se muestra la curva BER para evaluar el grupo de test. Los puntos más bajos de la curva BER se obtienen seleccionando 15 y 16 variables (15 %). En las imágenes de abajo se muestra la distribución de los casos para el grupo de entrenamiento (C) y de test (D). OD3, oligodendroglioma grado III; GBM, Glioblastoma; NT: no tumoral.

En la figura 4.30 se muestran los 2 *outliers* que salen a gran distancia del núcleo del clasificador. Como se puede comprobar, en ambos casos se debe a la mala calidad espectral.

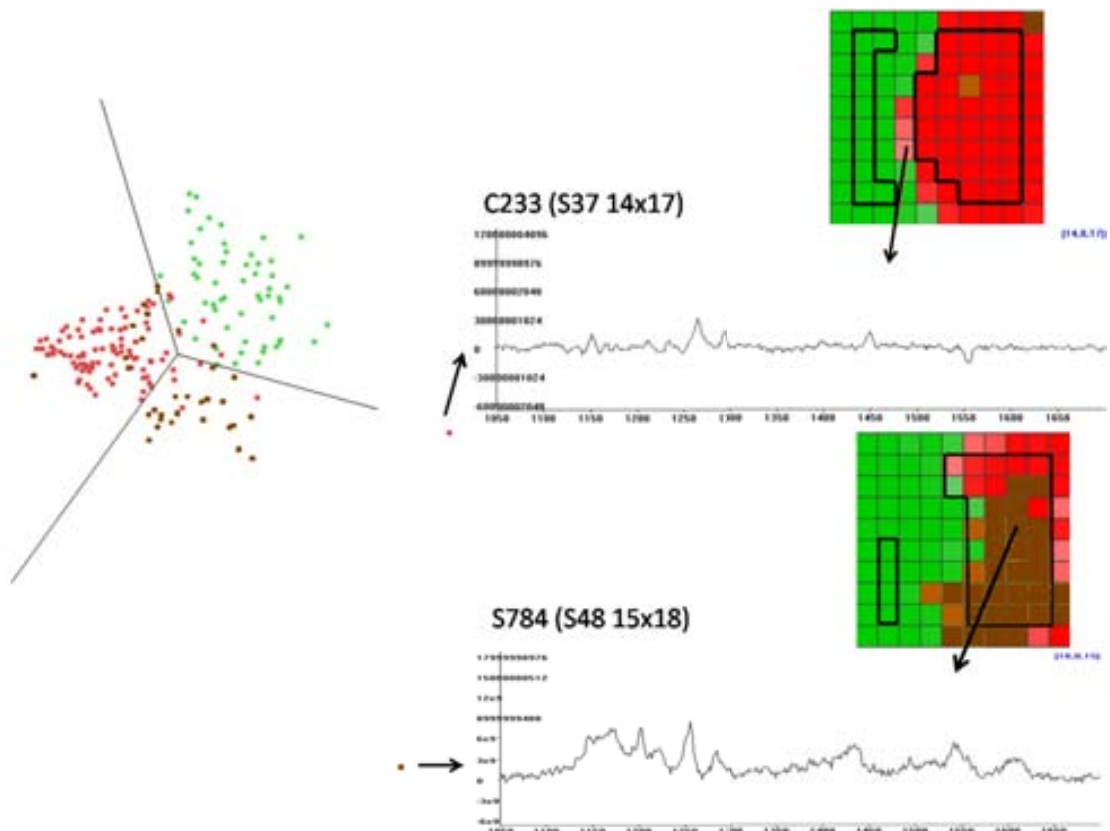


Figura 4.30. Información sobre los *outliers* del grupo de test del clasificador GBM vs OD3 vs NT (en rojo, marrón y verde respectivamente). Como se puede observar, la clasificación lejana al promedio del grupo al que corresponden estos vóxeles se debe a la mala calidad espectral. Los códigos sobre los espectros corresponden al número de ratón según la clasificación creada en el GABRMN y el número de vóxel con el que identifica en el *Spectra Classifier*.

En la figura 4.31 se muestran los resultados del grupo de test en forma de mapa nosológico. Utilizando el clasificador de 15 variables los GBM C432, C233 y C408 se clasifican correctamente en todos sus spv de la región que corresponde a zonas de tejido sano, mientras que la región no tumoral del ratón C69 se clasifica 1 spv como OD3. Respecto a la clasificación de los GBM, los resultados son muy buenos para el ratón C69, donde se identifican correctamente el 100 % de los píxeles GBM, son bastante buenos para el ratones C233 y C408, donde sólo 1 spv en total se clasifica erróneamente como OD3 (97 y 96 % de aciertos respectivamente), pero en el caso del ratón C432, sólo la mitad de los spv son clasificados como GBM y la otra mitad es clasificada como OD3 o NT.

Cabe destacar aquí que el caso C432, quizás debido al reducido tamaño del tumor y a la posible mezcla de tipos espectrales en zonas limítrofes entre tumor y parénquima cerebral, ya dio problemas de clasificación en el clasificador 1 (ver figura 4.25).

En el caso del OD3 (S784) se clasifican correctamente (OD3 según histopatología) el 68 % de los spv seleccionados como tumorales. Del resto, la parte principal se clasifica como GBM (grado IV) y algunos spv limítrofes como parénquima normal.

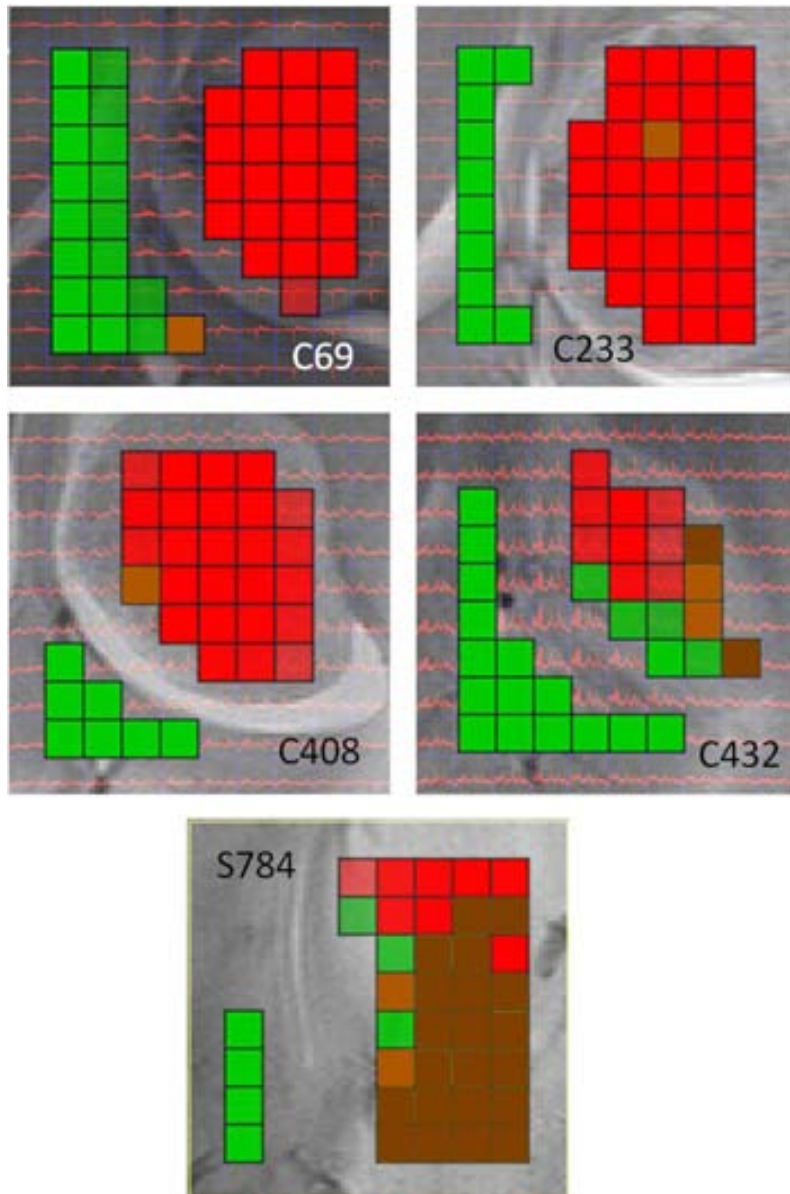


Figura 4.31. Imágenes de T_{2w} de la zona cerebral seleccionada para ubicar el VOI para IERM de cinco de los ratones investigados con las imágenes nosológicas obtenidas del clasificador 2 para las zonas seleccionadas como tumorales o tejido sano. Se muestran los resultados de la clasificación del grupo de test de los GBM (C69, C233, C408 y C432) y del ratón con OD3 (S784). El color verde (en sus distintas tonalidades) corresponde a las zonas que el clasificador etiquetaría como tejido normal, en rojo las zonas que corresponderían a GBM y en marrón las zonas que corresponderían a OD3.

A continuación se muestran los espectros promedios de los multivóxeles de los ratones C432 y S784 de los diferentes grupos que identifica el clasificador dentro del área etiquetada como GBM y OD3 respectivamente (figura 4.32).

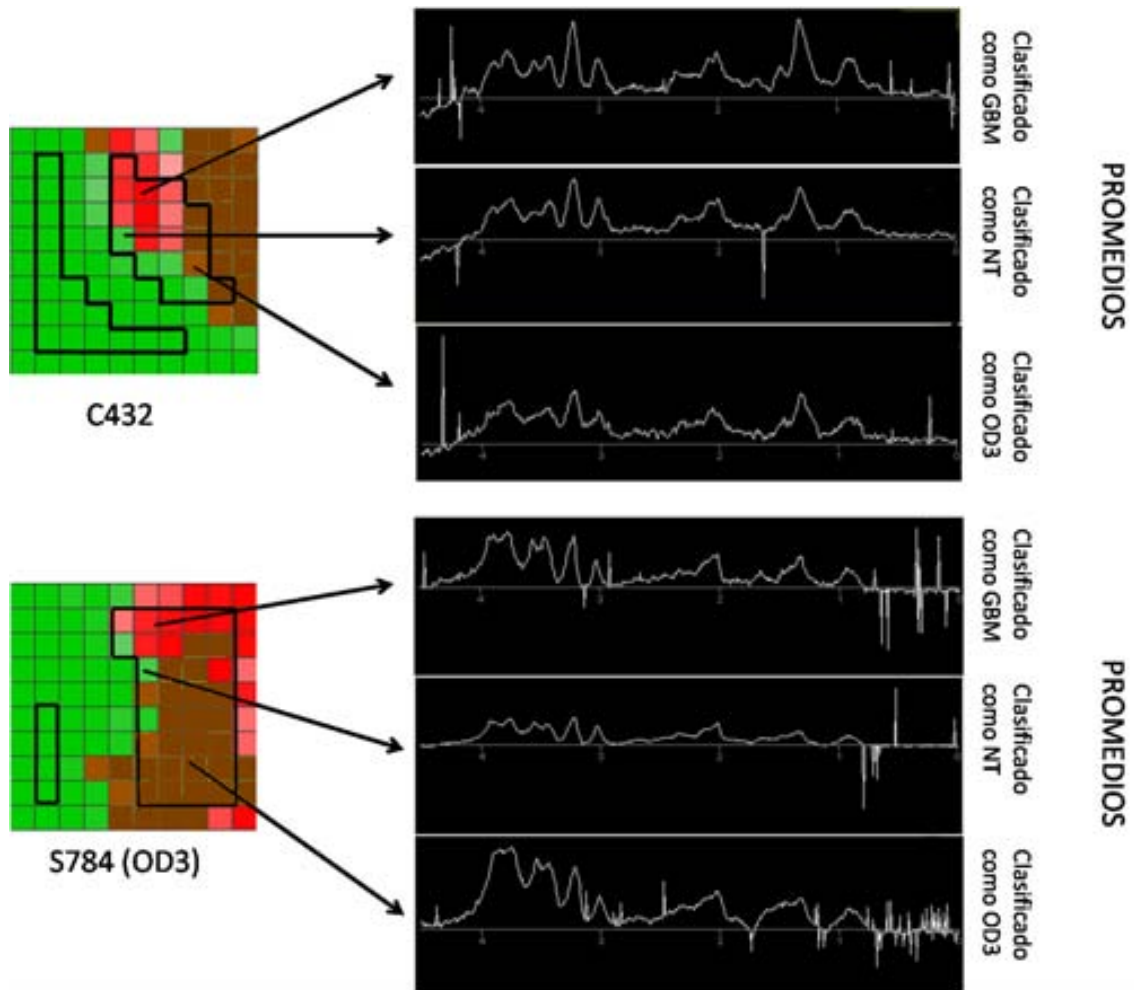


Figura 4.32. Espectros promedio de las zonas identificadas como no tumoral, OD3 o GBM de los ratones C432 y S784, diagnosticados como GBM y OD3 respectivamente por histopatología. Verde: tejido no tumoral; rojo: GBM; marrón: OD3.

En la figura 4.33 se muestra la distribución de aciertos y errores tanto del grupo de entrenamiento como del grupo de test y pudiéndose apreciar que en ambos grupos y en los tres tipos de tejido estudiado (GBM, OD3 y NT) el porcentaje de acierto es muy superior al de error, siendo el grupo OD3 el que más fallos en la clasificación presenta.

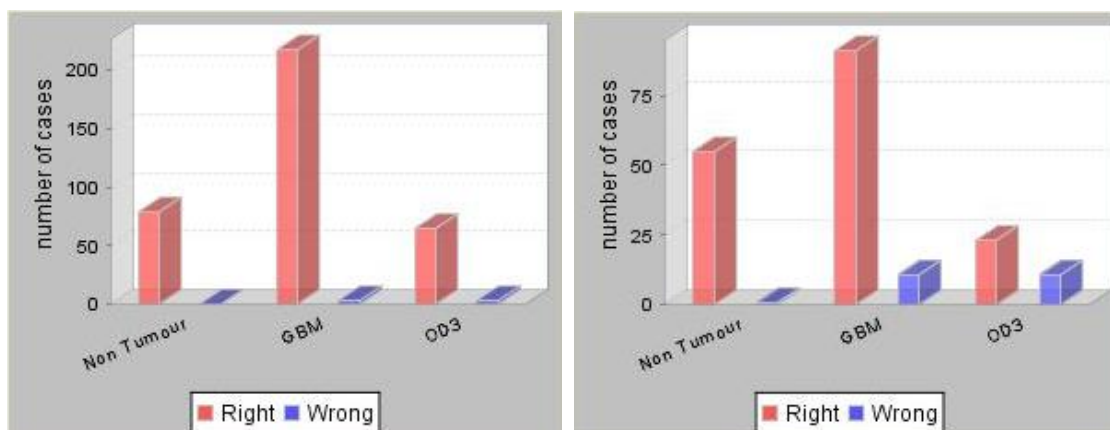


Figura 4.33. Distribución de errores y aciertos del grupo de entrenamiento (izquierda) y del grupo de test (derecha).

4.2.3 Clasificación de glioblastomas, oligodendrogliomas de grado II, oligodendrogliomas de grado III y parénquima sano. Clasificador 3.

El grupo de entrenamiento del clasificador tuvo un 90 % de acierto, evaluándolo por *Bootstrapping*, al seleccionar al menos 5 variables (figura 4.34). Al evaluar la robustez del clasificador obtenido con el grupo test independiente el valor más bajo de BER se obtiene seleccionando 16 (28,6 %) y 17 (27,8 %) variables mediante el sistema SFFS. Estos valores de BER indican que hay sobreentrenamiento en el clasificador. Las características espectrales seleccionadas se muestran en el anexo 7.4. De las 17 variables seleccionadas por el *Spectra Classifier* (anexo 7.4), sólo dos corresponden a zonas donde resuenan los lípidos móviles, según el tipo de tejido considerado, (1,31 y 1,32 ppm), alanina (1,43 ppm), glutamato (2,34, y 2,34 ppm), glutamina (2,47 ppm), NAA (2,00, 2,01 y 2,03 ppm), ChCCp (3,15 ppm), creatina (3,06 3,10 y 3,11 ppm), mio-inositol/glicina/glucosa (3,52, 3,54 ppm), mio-inositol/lactato (4,05 ppm) y glucosa (3,85 ppm). Parece que tienen menos importancia los ML en este clasificador que en los previos.

En la figura 4.35 se muestran los resultados de grupo de test en forma de mapa nosológico. Utilizando el clasificador de 17 variables todas las regiones no tumorales introducidas en el clasificador se clasifican correctamente. Respecto a la clasificación de los GBM el C69 y el C233 se clasifican muy bien como GBM, fallando sólo la clasificación de un spv del C233, que es el mismo spv que daba problemas de clasificación en los clasificadores previos. Sin embargo de los spv de los ratones

C408 y C432 se clasifican bien aproximadamente el 50 %, siendo la mayoría del 50 % restante clasificados como OD3.

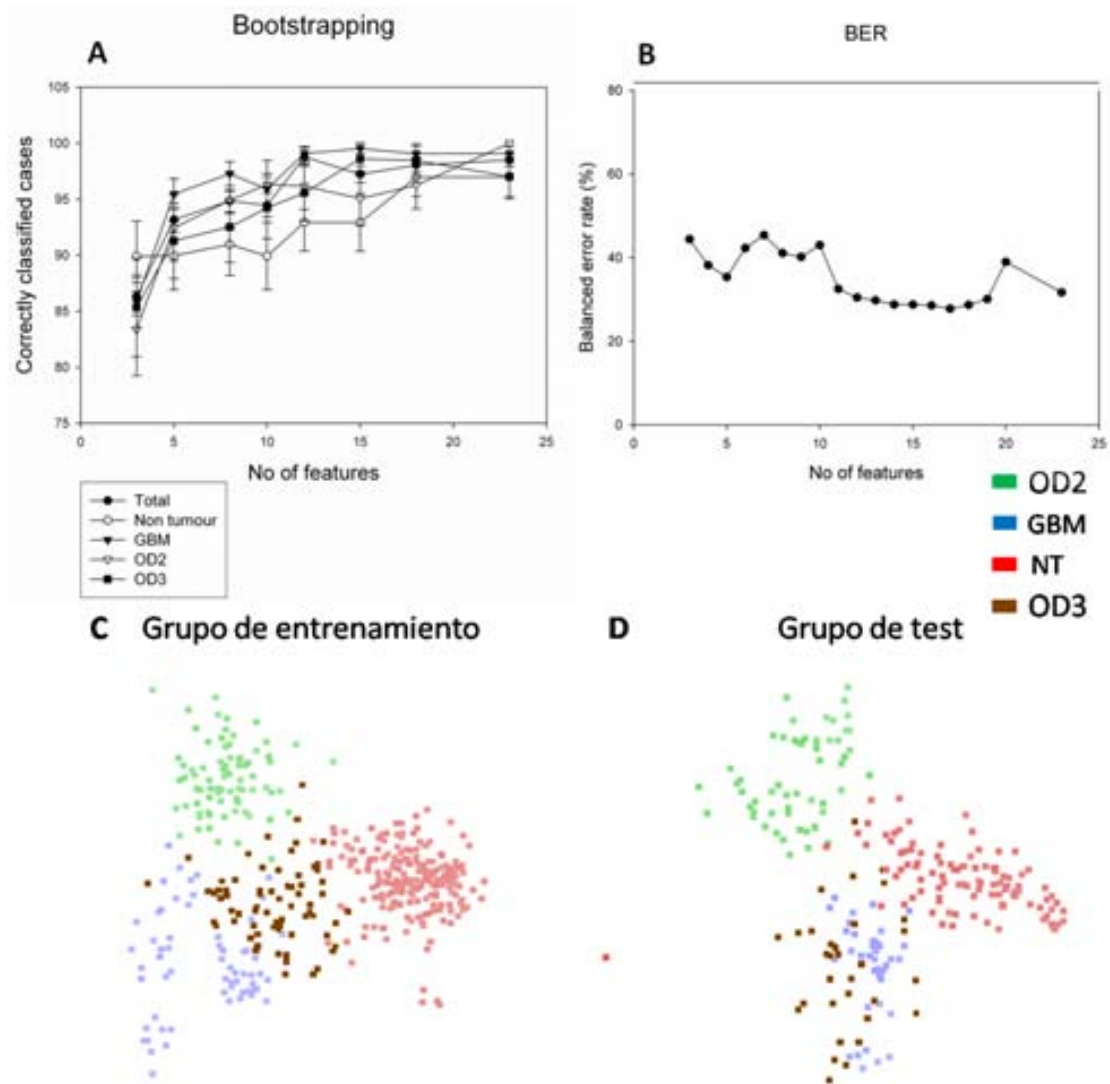


Figura 4.34. En A se muestran los resultados del *Bootstrapping* para evaluar el grupo de entrenamiento del clasificador en el que se muestran el resultado global, la curva del tejido no tumoral, la curva de los GBM, de los OD2 y de los OD3. En B se muestra la curva BER para evaluar el grupo de test. Los puntos más bajos de la curva BER se obtienen seleccionando 16 variables (28,6 %) y 17 variables (27,8 %). En las imágenes de abajo se muestra la distribución de los casos para el grupo de entrenamiento (C) y de test (D) seleccionando 17 variables. OD3: oligodendroglioma grado III; GBM, Glioblastoma; NT: no tumoral. Hay que tener en cuenta que al tener 4 clases hay 3 ejes espaciales en el clasificador, por lo que para ver adecuadamente las figuras C y D sería necesaria una representación 3D.

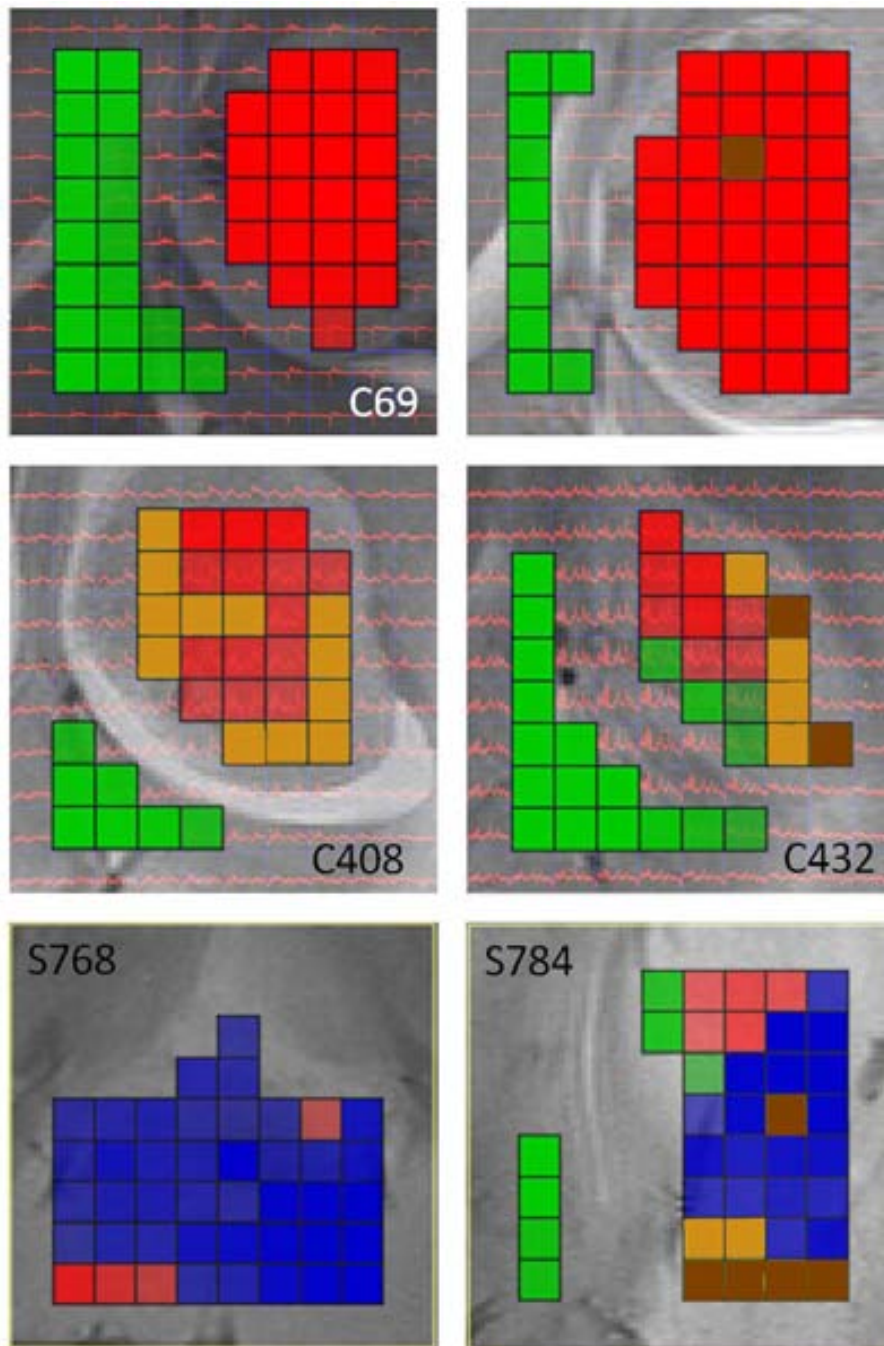


Figura 4.35. Imágenes de T_{2w} de la zona cerebral seleccionada para ubicar el VOI con las imágenes nosológicas obtenidas del clasificador para las zonas seleccionadas como tumorales o tejido sano. Se muestran los resultados de la clasificación del grupo de test de los GBM (C69, C233, C408 y C432), del ratón con OD2 (S768) y del ratón OD3 (S784). El color verde corresponde a las zonas que el clasificador etiquetaría como tejido normal, en rojo las zonas que corresponderían a GBM, en azul las zonas que corresponderían a OD2 y en marrón las zonas que corresponderían a OD3.

Respecto a la clasificación del OD2 (S768), excepto 4 spv de la zona periférica del tumor (9 % de los spv etiquetados como OD2), que son clasificados como GBM, el resto de las regiones seleccionadas son clasificadas como OD2. El OD3 (S784) es el tumor que más problemas tiene para clasificarse correctamente, de hecho sólo el 21 % de los spv son correctamente identificados como OD3. La mayor parte de spv restantes son clasificados como OD2, GBM y NT.

En la figura 4.36 se muestran los espectros de los 3 *outliers* que salen a gran distancia del núcleo del clasificador. Como se puede comprobar, en los tres casos se debe a la mala calidad espectral.

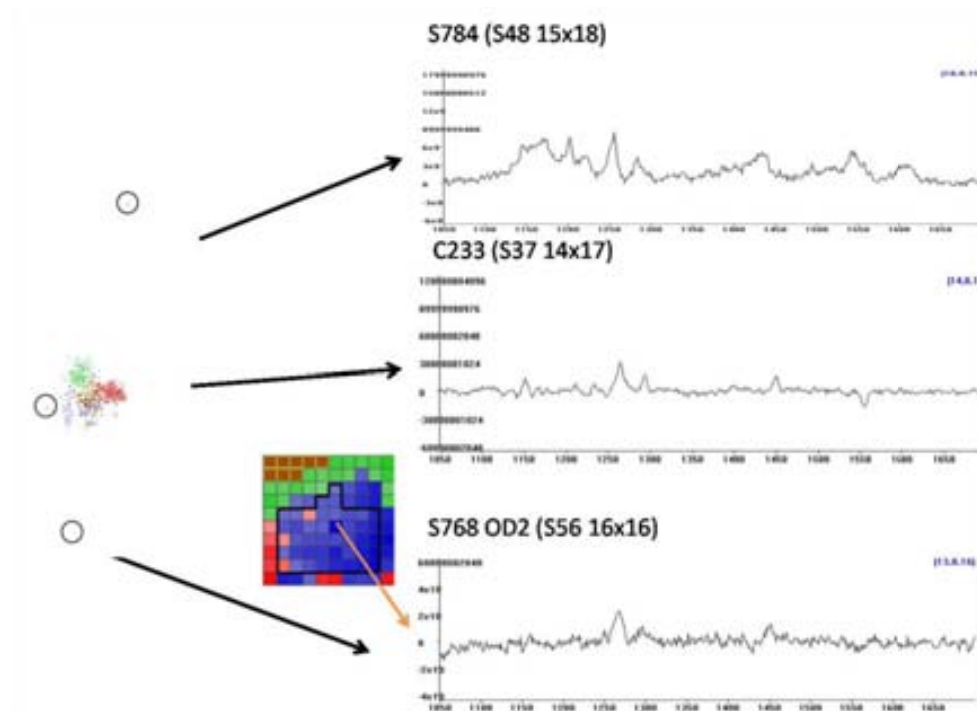


Figura 4.36. Zoom de los resultados del clasificador para el grupo de test del clasificador 3 para poder visualizar 3 los tres puntos que se alejan más del centro del clasificador. Los códigos sobre los espectros corresponden al número de ratón según la clasificación creada en el GABRMN y el número de vóxel con el que identifica el *Spectra Classifier*.

A continuación se muestran los espectros promedios de los multivóxeles del ratón C432 (GBM) de los diferentes grupos que identifica el clasificador dentro del área etiquetada como GBM , OD3 o NT según corresponda (figura 4.37).

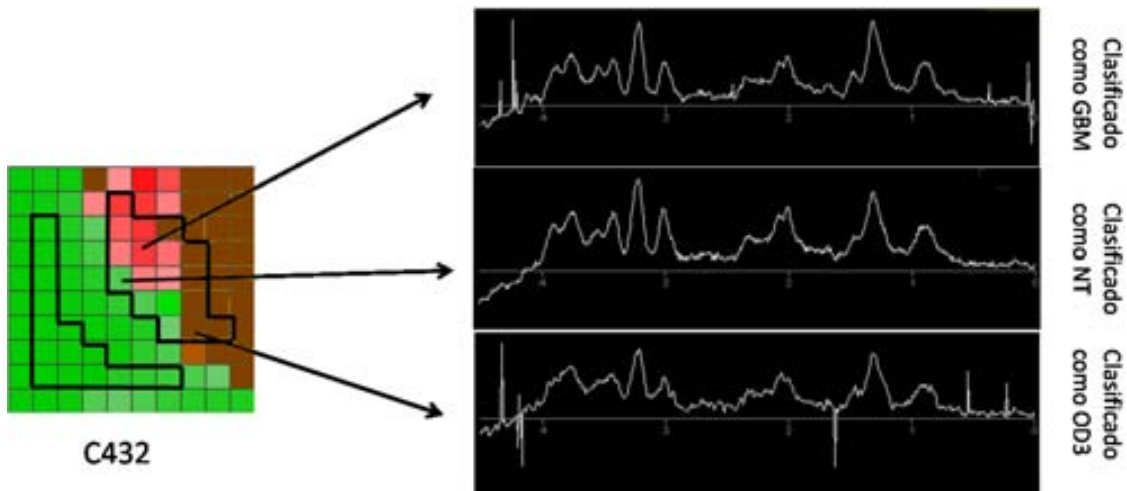


Figura 4.37. Espectros promedio de las zonas identificadas como no tumoral, OD3 o GBM del ratón C432, diagnosticados como GBM y OD3 respectivamente por histopatología. Verde: tejido no tumoral; rojo: GBM; marrón: OD3.

En la figura 4.38 se muestra la distribución de aciertos y errores tanto del grupo de entrenamiento del grupo de test y donde se puede apreciar que en ambos grupos y en los cuatro tipos de tejido estudiado (GBM, OD2, OD3 y NT) el porcentaje de acierto es muy superior al de error en el grupo de entrenamiento, pero en el grupo de test los OD3 se clasifican mal.

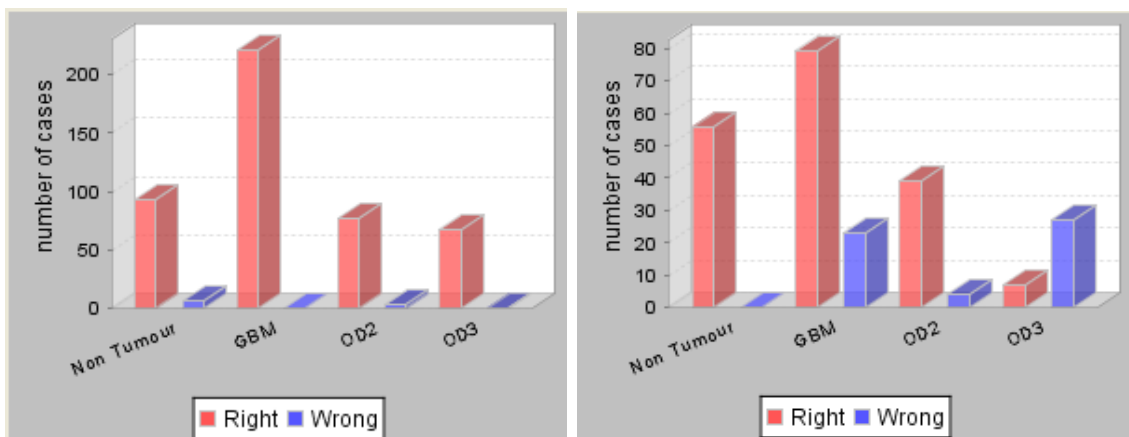


Figura 4.38. Distribución de errores y aciertos del grupo de entrenamiento (izquierda) y del grupo de test (derecha).

4.2.4. Clasificación de oligodendrogliomas de grado II, oligodendrogliomas de grado III y parénquima sano. Clasificador 4.

El grupo de entrenamiento del clasificador tuvo un 94,7 % de acierto, evaluándolo por *Bootstrapping*, al seleccionar al menos 3 variables (figura 4.39), llegando a alcanzar el 100 % de aciertos en el grupo no tumoral con este número de variables. Al evaluar la robustez del clasificador obtenido con el grupo test independiente el valor más bajo de BER se obtiene seleccionando 2 (37,1 %) y 3 (38,3 %) variables mediante el sistema SFFS lo que parece indicar que hay sobreentrenamiento en el clasificador. De las 3 variables seleccionadas por el *Spectra Classifier*, en este caso ninguna corresponde a zonas donde resuenan los lípidos móviles principales, sino que corresponden a glutamina (2,46 ppm), NAA (2,01 ppm) y creatina (3,03 ppm).

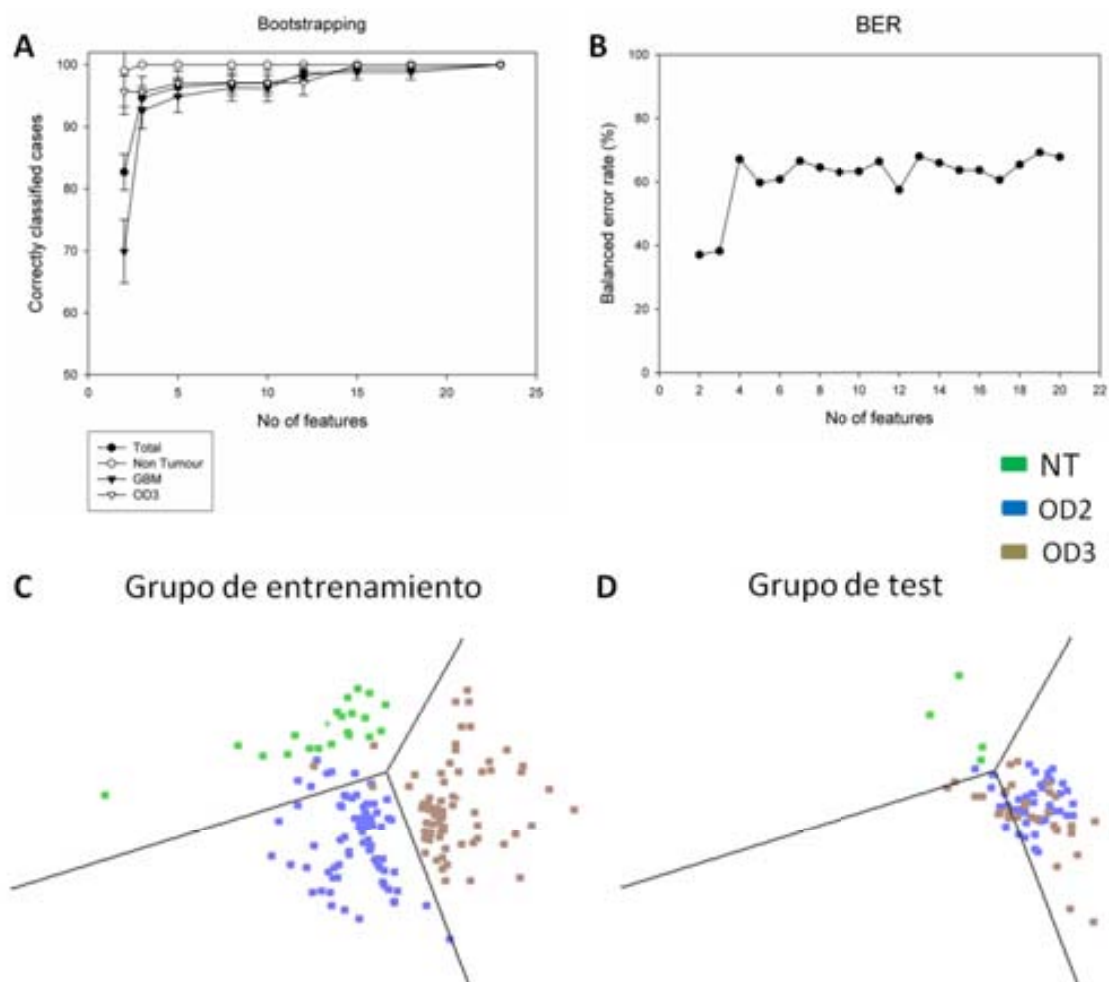


Figura 4.39. En A se muestran los resultados del *Bootstrapping* para evaluar el grupo de entrenamiento del clasificador en el que se muestran el resultado global, la curva del tejido no tumoral, la curva de los OD2 y de los OD3. En B se muestra la curva BER para evaluar el grupo

de test. Los puntos más bajos de la curva BER se obtienen seleccionando 2 variables (37,1 %) y 3 variables (38,2 %). En las imágenes de abajo se muestra la distribución de los casos para el grupo de entrenamiento (C) y de test (D) seleccionando 3 variables. NT: no tumoral; OD2, oligodendroglioma grado II; OD3: oligodendroglioma grado III.

En la figura 4.40 se muestran los espectros promedio de los grupos estudiados en este clasificador y las variables seleccionadas por el mismo en verde.

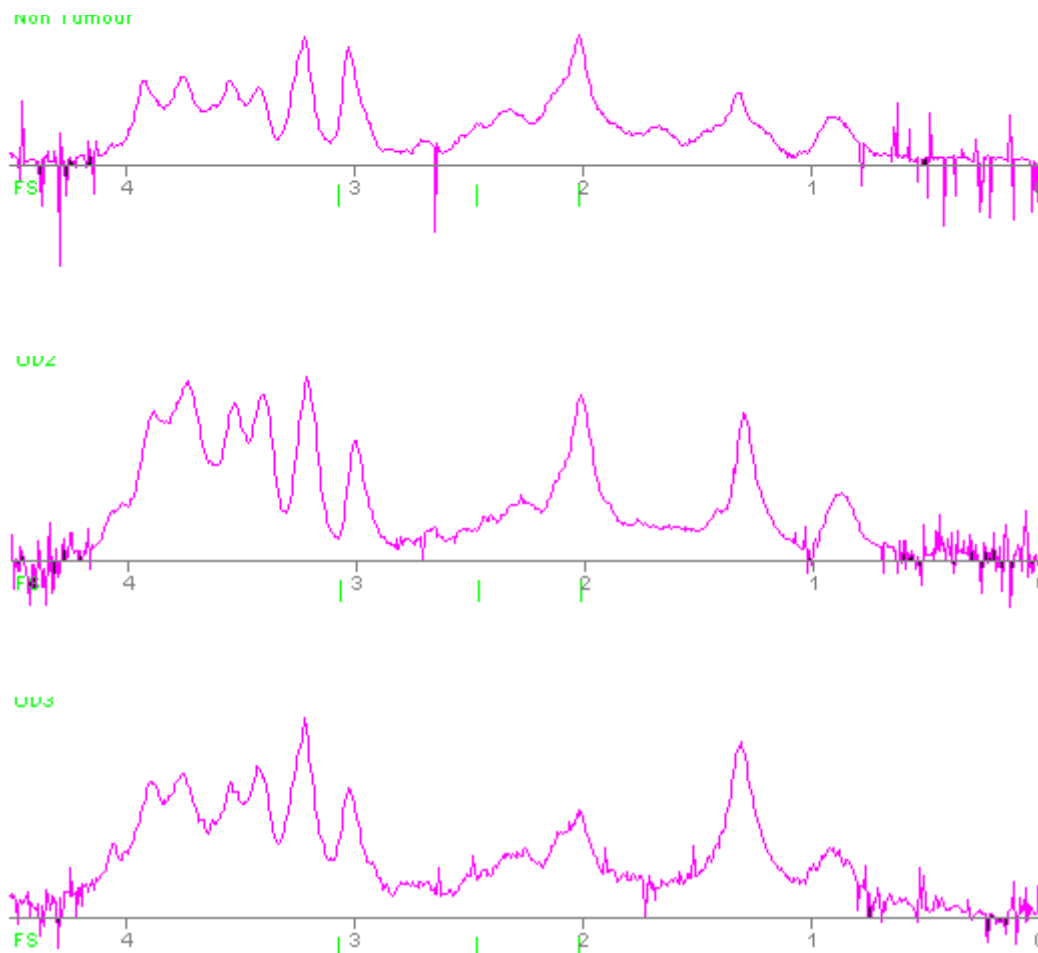


Figura 4.40. Espectros promedio de las muestras no tumorales (imagen superior), OD2 (imagen del centro) y OD3 (imagen inferior). En verde están marcadas las 3 variables seleccionadas por el clasificador (FS, *feature selection*).

En la figura 4.41 se muestran los resultados de grupo de test en forma de mapa nosológico. Utilizando el clasificador de 3 variables todas las regiones no tumorales introducidas en el clasificador se clasifican correctamente. Respecto a la clasificación

de las zonas tumorales tanto el OD2 como el OD3 son identificados por el clasificador mayoritariamente como OD3.

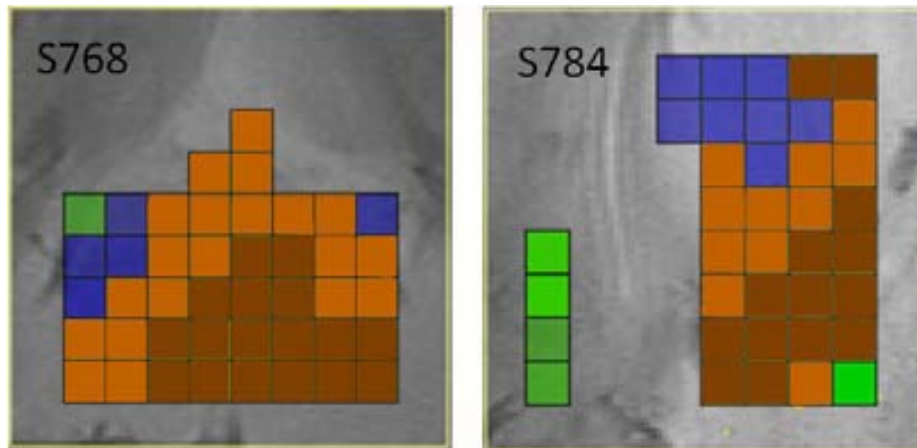


Figura 4.41. Imágenes de T_{2w} de la zona cerebral seleccionada para ubicar el VOI para IERM de 2 de los ratones investigados con las imágenes nosológicas obtenidas del clasificador para las zonas seleccionadas como tumorales o tejido sano. Se muestran los resultados de la clasificación del grupo de test del ratón con OD2 (S768) y del ratón OD3 (S784). El color verde corresponde a las zonas que el clasificador etiquetaría como tejido normal, en azul las zonas que corresponderían a OD2 y en marrón las zonas que corresponderían a OD3.

En la figura 4.42 se muestra la distribución de aciertos y errores tanto del grupo de entrenamiento como del grupo de test y en donde se puede apreciar que en ambos grupos y en los tres tipos de tejido estudiado (OD2, OD3 y NT) el porcentaje de acierto es muy superior al de error en el grupo de entrenamiento, pero en el grupo de test los OD2 se reconocen mal, sugiriendo sobreentrenamiento en el desarrollo del clasificador.

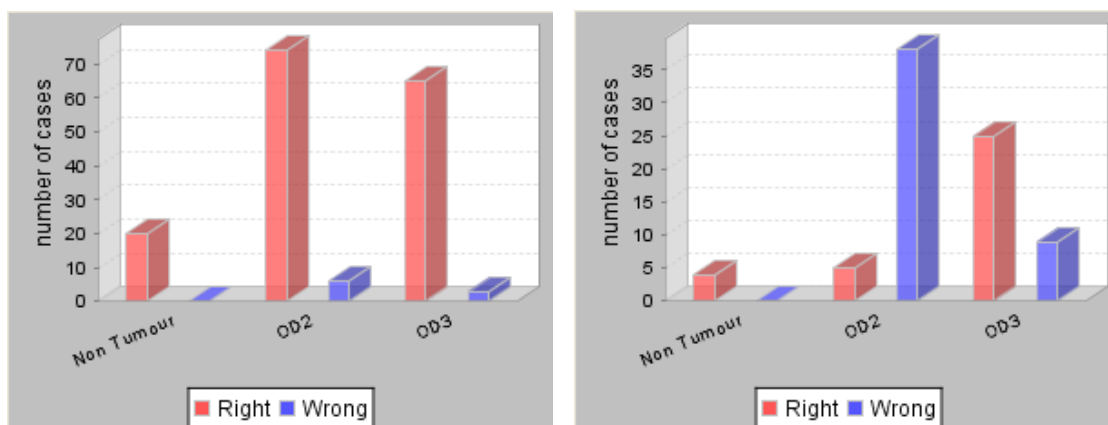


Figura 4.42. Distribución de errores y aciertos del grupo de entrenamiento (izquierda) y del grupo de test (derecha) del clasificador OD3 vs OD3 vs NT.

4.2.5 Discusión de los resultados de los clasificadores para tipo y grado de tumores cerebrales preclínicos

Los resultados presentados en las secciones 4.2.1-4.2.4 demuestran que es posible desarrollar clasificadores robustos para reconocer patrones espectrales de GBM, OD2 y tejido no tumoral, así como de GBM, OD3 y tejido no tumoral en modelos preclínicos murinos basados en datos de IERM, de una manera rápida y semi-automática y utilizando un grupo de test independiente para evaluarlos. Todo ello ha sido posible utilizando el *software* de acceso libre *SpectraClassifier* 3.0 [172, 185]. Por otra parte, en el caso del clasificador desarrollado para diferenciar GBM, OD2, OD3 y tejido no tumoral habría que seguir realizando pruebas para intentar mejorar la clasificación y eliminar los problemas existentes de sobreentrenamiento. En ese sentido, se podría intentar aumentar el tamaño de los grupos de OD2 y OD3, ya que se ha descrito que tamaños desiguales entre grupos puede afectar a la optimización del entrenamiento de los clasificadores. Además, los OD2 y OD3 tienen patrones espectrales promedio bastante parecidos, lo que entraña una mayor dificultad a la hora de separar estos dos grupos, y es por eso probablemente que OD3 y OD2 no se clasifican correctamente en el grupo de test del clasificador 4 (figura 4.39 y tabla 3.7). Para evitar el sobreentrenamiento que suele producirse al seleccionar demasiadas características para el cálculo de un ADL [197, 198], es decir, generar un clasificador con un buen resultado para un conjunto de datos específicos pero que no resulte útil a la hora de clasificar nuevos casos independientes, el número de características seleccionadas debe ser, aproximadamente, la tercera parte que el de casos spv en el grupo más pequeño del conjunto de entrenamiento [156]. Sin embargo, el criterio

definitivo acerca de la robustez de los clasificadores siempre fue el resultado obtenido con el conjunto de test independiente [162]. A pesar de que los clasificadores fueron diseñados con un número elevado de variables y pocos casos, el elevado número de spv por tipo/grado tumoral investigado les permitió ser descriptivos (CCC, *correctly classified cases*) y predictivos (BER) en el caso de los clasificadores descritos en 4.2.1 y 4.2.2, mientras que en los clasificadores descritos en 4.2.3 y 4.2.4 probablemente sería necesario revisar la proporción de spv de cada grupo y las variables seleccionadas y, en todo caso, aumentar el número de casos del conjunto de entrenamiento para evitar el sobreentrenamiento descrito.

Anteriormente se habían descrito métodos de representación de imágenes nosológicas para datos de IERM clasificados mediante ADL, en tumores cerebrales humanos explorados a 1,5 T. El primer caso publicado por De Edelenyi y colaboradores [152], utilizó métodos de clasificación muy similares a los descritos por Preul y colaboradores [151]: seis áreas de resonancias de metabolitos normalizadas además de la intensidad media del agua normalizada (obtenida a partir de secuencias de IRM T_{2w}) fueron utilizadas como características para la producción de imágenes nosológicas mediante reconocimiento de patrones con un ADL. Posteriormente, Simonetti y colaboradores [41] utilizaron el sistema de análisis de componentes principales (PCA) con un conjunto de entrenamiento basado en siete características extraídas de espectros de IERM y cuatro características de IRM. Esta estrategia fue también seguida por De Vos y colaboradores [167] y Luts y colaboradores [51, 199]. Ambos autores utilizaron áreas integradas de picos como características de IERM, aunque Luts y colaboradores [199] subrayaron también la relevancia de utilizar métodos objetivos de selección de características para el desarrollo de DSS en aplicaciones clínicas.

En nuestro caso, las imágenes nosológicas obtenidas no contienen ninguna característica extraída de secuencias de IRM sino solamente de secuencias IERM. Por lo tanto, nuestro modelo podría mejorar potencialmente incluyendo parámetros de este tipo. Sin embargo, es necesario mencionar que en nuestro caso se aplicó un método de selección automático (SFFS) que no requiere un análisis previo cuantitativo de los datos, como se propone en [199], lo que contribuye a que el desarrollo del clasificador sea semi-automático.

En lo referente al desarrollo de los clasificadores, hemos utilizado el mismo método que en [41, 151, 152]: el ADL. De Edelenyi y colaboradores [152] utilizaron como método de asignación de píxels a una clase determinada el siguiente umbral: el

cociente entre el más alto y el segundo más alto. Los píxels por debajo de este valor quedaron sin clasificar. Simonetti y colaboradores [41] también utilizaron un umbral, en su caso basado en el criterio de la distancia de Mahalanobis, para calcular la probabilidad de los diferentes píxels de pertenecer a una clase y otra, así como para identificar casos solapados entre clases que fueron definidos como de clase desconocida. En nuestro caso, la probabilidad de pertenencia a una clase fue codificada como el nivel de intensidad de ese color, siendo los píxeles con menor intensidad los menos probables de pertenecer a una clase determinada (bajo nivel de confianza en la predicción). Quizás sería conveniente incorporar en un futuro el concepto de clasificación “dudosa” mediante algún tipo de umbral como los arriba mencionados para así intentar reducir los errores de predicción en patrones limítrofes entre clases o en el caso de “*outliers*”.

Otra limitación potencial de nuestro sistema es que en los métodos de clasificación basados en ADL utilizados, hemos considerado todos los vóxeles pertenecientes al mismo ratón como casos independientes entre sí. En el caso de los spv mal clasificados (spv “*outliers*”) pero rodeados de spv correctamente etiquetados sería interesante que la imagen nosológica tuviese en cuenta esta información, por ejemplo etiquetando la propuesta de asignación a clase de dicho spv/vóxel como dudosa. A este respecto, los sistemas desarrollados por De Vos y colaboradores [167], Luts y colaboradores [51] y Laudadio y colaboradores [200] se basan en el análisis de correlación canónica (CCA) en vez de en el ADL y tienen en cuenta el efecto de los vóxeles vecinos al producir las imágenes nosológicas y por tanto, cuentan con la información espacial de las matrices de IERM. Así mismo, técnicas de reconocimiento de patrones para la detección de “*outliers*” [201] pueden resultar útiles en este caso. Esto último unido a la inclusión de características de IRM podría ayudar a una mejor delimitación de los diferentes tejidos, especialmente cuando hay muchas clases incluídas en el clasificador (tipos, grados y/o subtipos) o cuando se trabaja con regiones heterogéneas o limítrofes entre dos tipos de tejido, como en el caso de los tumores gliales infiltrantes [200, 202]. Todo esto nos serviría, por ejemplo, en la clasificación de regiones que muestran características de dos tipos diferentes de tejido, como es el caso del ODG en transición (S768), el cual tiene características de grado II y IV.

En resumen, los patrones de IERM de parénquima cerebral normal de ratón, GBM y OD2 son fácilmente diferenciables mediante el reconocimiento de patrones semiautomático y, en ese sentido, refuerzan los resultados iniciales del grupo descritos en [186] pero mostrando su robustez para un número mayor de animales investigados.

Resultados y discusión

En el caso de querer distinguir NT, GBM y OD3, los resultados de clasificación son algo peores que para el clasificador anterior, ya que parece haber algo de sobreentrenamiento, pero se obtienen resultados aceptables en el grupo test cuando se estudian las imágenes nosológicas frente a los resultados del clasificador (figura 4.31). Finalmente cuando se intentan distinguir simultáneamente los cuatro grupos de tejido a la vez, el clasificador es descriptivo pero poco predictivo y necesita mejorar por tanto su robustez.

5. CONCLUSIONES

- 5.1. Se han producido 4 lotes de gotículas lipídicas artificiales (AOB) basados en oleosina y 3 lotes basados en caleosina por metodologías de DNA recombinante, expresando las proteínas de interés en *E. coli* y purificándolas de manera preparativa según protocolos previamente desarrollados en el grupo del profesor Jason Tzen (Universidad Chung Hsing, Taiwán).
- 5.2. Los diámetros promedio de los AOBs de oleosina preparados a lo largo de esta tesis medidos por microscopía confocal han sido de 780 ± 580 nm (n=1.096 AOBs de 4 muestras independientes); mientras que las gotículas de caleosina, medidas por microscopía electrónica de transmisión, han sido de 240 ± 293 nm (n=230 AOBs de 2 muestras independientes).
- 5.3. Se han estudiado diversos lotes de AOBs de oleosina (n=4) y de caleosina (n=3) por HR-MAS a 37 °C y girando entre 500 y 15.000 Hz.
- 5.4. El área de los ML de los AOBs investigados por HR-MAS aumenta significativamente (1,4 veces) entre 500 y 3.000 Hz, manteniéndose estables para velocidades de giro superiores.
- 5.5. El aumento de diámetro promedio de los AOBs libres entre 240 nm (con caleosina) y 780 nm (con oleosina) no produce diferencias significativas en la capacidad de movilización de los ML por HR-MAS.
- 5.6. Los resultados obtenidos con los AOBs estudiados sugieren que parte del *pool* de las cadenas de los ácidos grasos de lípidos neutros dentro de gotículas lipídicas citosólicas girando libremente en células tumorales podría ser invisible por HR-MAS a baja velocidad (500 Hz) mientras que por HR-MAS a velocidad moderada (3.000 Hz) podría desvelarse dicho contenido.
- 5.7. Se han inmovilizado AOBs de caleosina y de oleosina en una matriz sólida de Sephacryl S-1000, principalmente de manera covalente, pero con una contribución (de entre el 30 y el 43 %) de retención inespecífica, posiblemente de tipo hidrofóbico.
- 5.8. La inmovilización de AOBs en Sephacryl S-1000 reduce la capacidad “visibilizadora” del HR-MAS para los AOBs de oleosina y la elimina para los de caleosina.

- 5.9. Los resultados obtenidos con el estudio por HR-MAS de AOBs libres e inmovilizados sugieren que cuanto más pequeñas sean dichas gotículas de lípidos neutros (AOBs o gotículas citosólicas celulares) menos “movilizable” será su contenido de TAG para su detección por HR-MAS.
- 5.10. El estudio por HR-MAS a 37°C de células C6 de glioma de rata en fase exponencial (4 días) y postconfluente (7 días) girando entre 500 y 15.000 Hz demuestra una visibilización de los ML (hasta 4,6 veces) y de fosfatidilcolina (hasta 7,2 veces) con la velocidad de giro, mientras que los metilenos de ácidos grasos de los ML no llegan a estabilizarse en cuanto a su “visibilización” ni a 15.000 Hz.
- 5.11. Los resultados obtenidos por HR-MAS a 37°C de AOBs, células C6 y liposomas multilamelares sugieren una contribución importante de orgánulos celulares de tipo endosoma multilamelar (por ejemplo autofagosomas) al aumento del área de la fosfatidilcolina descrito para células C6. En cambio, dicho orgánulos no contribuirían más de un 9 % al aumento de área de los ML a 1,28 ppm con la velocidad de giro.
- 5.12. Los resultados obtenidos con AOBs, liposomas multilamelares y células C6 estarían de acuerdo en que una inmovilización de gotículas citosólicas, por ejemplo mediante motores moleculares que las anclen al citoesqueleto celular, reduciría parcialmente su visibilidad inducida por la adquisición en condiciones HR-MAS, mayor reducción cuanto más pequeñas fueran dichas gotículas.
- 5.13. En resumen, para explicar el aumento aparente de ML descrito previamente en el GABRMN para células C6 en cultivo [80] deberían considerarse como factores que explicarían una reducción de señal detectable: la inmovilización de gotículas lipídicas pequeñas de diámetro inferior a 240 nm por asociación al citoesqueleto; mientras que explicaría un aumento de señal detectable: una fusión de gotículas pequeñas asociadas a citoesqueleto produciendo gotículas grandes de diámetro mayor de 240 nm y, preferentemente, sin asociación al citoesqueleto, y por lo tanto, con capacidad de libre giro.
- 5.14. Se han desarrollado 4 clasificadores de tipo y grado tumoral nuevos para tumores cerebrales preclínicos en ratón mediante el uso del programa *Spectra Classifier* aplicado a matrices de datos de imagen espectroscópica (IERM) en condiciones de hipotermia (30°C) e hiperglicemia transitoria.

Conclusiones

- 5.15. Se ha mejorado la robustez de un discriminador trilateral entre glioblastoma (GBM), oligodendroglioma de grado II (OD2) y parénquima cerebral normal.
- 5.16. Los patrones de IERM de parénquima cerebral normal de ratón, GBM y oligodendroglioma son fácilmente diferenciables mediante el reconocimiento de patrones semiautomático.
- 5.17. Los patrones de IERM de OD2 y oligodendroglioma anaplásico (OD3) son difíciles de diferenciar con el conjunto de entrenamiento disponible y necesitan mejorarse.
- 5.18. Las imágenes de tipo nosológico basadas en los clasificadores desarrollados revelan una heterogeneidad intratumoral que puede tener correlación histológica a evaluar en futuros estudios en alguno de los casos de tumores preclínicos evaluados.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestles, O.H., Cavenee, W.K., Butger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
2. Bernstein, M.B., editor, *Neuro-Oncology The essentials*. 2001: Thieme New York.
3. Kaye, A., LE editor, *Brain tumours*. 2ª Edición ed. 2001, Churchill Livingstone, USA.
4. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestles, O.H., Cavenee, W.K., *WHO classification of tumours of the central nervous system*. IARC, Lyon Press, 2007.
5. <http://globocan.iarc.fr/>, *International Agency for Research on Cancer*.
6. Nakada, M., Nakada, S., Demuth, T., Tran, N.L., Hoelzinger, D.B., Berens, M.E., *Molecular targets of glioma invasion*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(4): p. 458-478.
7. Stewart, B.W., KP editor, *Eds World Health Organization, World Cancer Report*, ed. I. Press. 2003, Lyon.
8. Shetty, P., Moiyadi, A., Pantvaidya, G., Arya, S., *Cystic metastasis versus brain abscess: role of MR imaging in accurate diagnosis and implications on treatment*. J Cancer Res Ther, 2010. **6**(3): p. 356-358.
9. Khan, S.H., Buwenbo, J.E., Li, Q., *Concurrence of glioma and multiple sclerosis*. Can J Neurol Sci, 2005. **32**(3): p. 349-351.
10. Doolittle, N.D., Abrey, L. E., Bleyer, W. A., Brem, S., Davis, T. P., Dore-Duffy, P., Drewes, L. R., Hall, W. A., Hoffman, J. M., Korfel, A., Martuza, R., Muldoon, L. L., Peereboom, D., Peterson, D. R., Rabkin, S. D., Smith, Q., Stevens, G. H., Neuwelt, E. A., *New frontiers in translational research in neuro-oncology and the blood-brain barrier: report of the tenth annual Blood-Brain Barrier Disruption Consortium Meeting*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(2 Pt 1): p. 421-428.
11. Essig, M., Rohrer, M., Giesel, F., Tuttonberg, J., Weber, M. A., Michaely, H., Gerigk, L., Voth, M., *Human brain tumor imaging with a protein-binding MR contrast agent: initial experience*. Eur Radiol, 2009. **20**(1): p. 218-226.
12. Brandes, A.A., Tosonik A., Franceschi, E., Reni, M., Gatta, G., Vecht, C., *Glioblastoma in adults*. Crit Rev Oncol Hematol, 2008. **67**(2): p. 139-152.
13. Hlaiheli, C., Guilloton, L., Guyotat, J., Streichenberger, N., Honnorat, J., Cotton, F., *Predictive value of multimodality MRI using conventional, perfusion, and spectroscopy MR in anaplastic transformation of low-grade oligodendrogliomas*. J Neurooncol, 2010. **97**(1): p. 73-80.
14. Attenberger, U.I., Runge, V.M., Morelli, J.N., Williams, J., Jackson, C.B., Michaely, H.J., *Evaluation of gadobutrol, a macrocyclic, nonionic gadolinium chelate in a brain glioma model: comparison with gadoterate meglumine and gadopentetate dimeglumine at 1.5 T, combined with an assessment of field dependence, specifically 1.5 versus 3T*. J Magn Reson Imaging, 2010. **31**(3): p. 549-555.
15. Nelson, S.J., *Assessment of therapeutic response and treatment planning for brain tumors using metabolic and physiological MRI*. NMR in Biomedicine, 2011. **24**(6): p. 734-749.
16. Favre, J., Taha, J.M., Burchiel, K.J., *An analysis of the respective risks of hematoma formation in 361 consecutive morphological and functional stereotactic procedures*. Neurosurgery, 2002. **50**(1): p. 48-56.
17. Field, M., Witham, T.F., Flickinger, J.C., Kindziolka, D., Lunsford, L.D., *Comprehensive assessment of hemorrhage risks and outcomes after stereotactic brain biopsy*. J Neurosurg, 2001. **94**(4): p. 545-551.
18. Shastri-Hurst N, T.M., Robson DK, Lowe JS, Macarthur DC, *Stereotactic brain biopsy: An audit of sampling reliability in a clinical case series*. Br J Neurosurg, 2006. **20**(4): p. 222-226.

Bibliografía

19. Julia-Sape, M., Coronel, I., Majos, C., Candiota, A. P., Serrallonga, M., Cos, M., Aguilera, C., Acebes, J. J., Griffiths, J. R., Arus, C., *Prospective diagnostic performance evaluation of single-voxel 1H MRS for typing and grading of brain tumours*. NMR Biomed, 2012. **25**(4): p. 661-673.
20. Rabi I, Z.J., Millman S, Kusch P, *A new method of measuring nuclear magnetic moment*. Phys Rev, 1938. **53**: p. 318.
21. Purcell EM, T.H., Pound RV, *Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid*. Phys Rev, 1946. **69**: p. 37-38.
22. Bloch F, H.W., Packard ME, *Nuclear induction*. Phys Rev, 1946. **69**: p. 127.
23. Lauterbur, P., *Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance*. Nature, 1973. **242**: p. 190-191.
24. Mansfield P, G.P., *NMR "diffraction" in solids?* J phys C: solid state phys, 1973. **6**: p. L422-L427.
25. Gadian, D.G., *NMR and its applications to living systems*: Oxford Science Publications.
26. García Segura, J.M., *Espectroscopía in vivo por resonancia magnética nuclear*. 1991, Madrid: Eudema S.A.
27. <http://www.cem.msu.edu/~reusch/OrgPage/nmr.htm>. Michigan State University, Department of Chemistry. [cited].
28. <ftp://156.35.59.102/Programas/IM/rmn1-parametros10.pdf>, Arias, S.
29. Cheng LL, M.M., Becerra L, Ptak T, Tracey I, Lacjner A, González RG, *Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997. **94**(12): p. 6408-6413.
30. Millis KK, M.W., Cory DG, Singer S, *Gradient, high-resolution, magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy of human adipocyte tissue*. Magn Reson Med, 1997. **38**(3): p. 399-403.
31. Griffin JL, B.M., Nicholson JK, Bhadoo K, *Spectral profiles of cultured neuronal and glial cells derived from HRMAS 1H NMR spectroscopy*. NMR Biomed, 2002. **15**: p. 375-384.
32. Martínez-Bisbal, M.C., Esteve, V., Martínez-Granados, B., Celda, B., *Magnetic resonance microscopy contribution to interpret high-resolution magic angle spinning metabolomic data of human tumor tissue*. J Biomed Biotechnol, 2011.
33. Sitter B, B.T., Tessem M, Gribbestad I, *High-resolution magic angle spinning (HR-MAS) MR spectroscopy in metabolic characterization of human cancer*. J Prog Nucl Magn Reson Spectrosc, 2009. **54**(3): p. 239-254.
34. Andrew, E.R., Newing, R.A., *The narrowing of nuclear magnetic resonance spectra by molecular rotation in solids*. Proc Physical Society, 1985. **72**: p. 959-972.
35. Lowe, I.J., *Free induction decays of rotating solids*. Phys Rev Lett, 1959. **2**: p. 285-287.
36. Valverde, D., Quintero, M. R., Candiota, A. P., Badiella, L., Cabanas, M. E., Arus, C., *Analysis of the changes in the 1H NMR spectral pattern of perchloric acid extracts of C6 cells with growth*. NMR Biomed, 2006. **19**(2): p. 223-30.
37. Lindon JB, O.P., E. Holmes, and J.K. Nicholson, *High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy: application to biomedical studies*. J Prog Nucl Magn Reson Spectrosc, 2009. **5**(2): p. 79-100.
38. Alam, T.M., Jenkins, J.E. *HR-MAS NMR spectroscopy in Material Science*. Advanced Aspects of Spectroscopy 2012 [cited; Available from: http://cdn.intechopen.com/pdfs/38536/InTech-Hr_mas_nmr_spectroscopy_in_material_science.pdf].
39. Tate, A.R., Underwood, J., Acosta, D.M., Julia-Sape, M., Majos, C., Moreno-Torres, A., Howe, F.A., van der Graaf, M., Lefournier, V., Murphy, M.M., Loosemore, A., Ladroue, C., Wesseling, P., Luc Bosson, J., Cabañas, M.E., Simonetti, A.W., Gajewics, W., Calvar, J., Capdevila, A., Wilkins, P.R., Bell, B.A., Remy, C., Heerschap, A., Watson, D., Griffiths, J.R., Arus, C., *Development of a decision support system for diagnosis and grading of*

Bibliografía

- brain tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra*. NMR Biomed, 2006. **19**(4): p. 411-434.
40. Gili Planas, J., A., editor, *Resonancia Magnética: Centre Diagnòstic Pedralbes*, ed. B. DL. 1992.
 41. Simonetti, A.W., Melssen, W.J., van der Graaf, M., Postma, G.J., Heerschap, A., Buydens, L.M., *A chemometric approach for brain tumor classification using magnetic resonance imaging and spectroscopy*. Anal Chem, 2003. **75**(20): p. 5352-5361.
 42. Howe, F.A., Opstad, K.S., *¹H-NMR spectroscopy of brain tumours and masses*. NMR Biomed, 2003. **16**: p. 123-131.
 43. Sibtain, N.A., Howe, F.A., Saunders, D.E., *The clinical value of proton magnetic resonance spectroscopy in adult brain tumours*. Clin Radiol, 2007. **62**(2): p. 109-119.
 44. Majos, C., Alonso, J., Aguilera, C., Serrallonga, M., Perez-Martín, J., Acebes, J.J., Arus, C., Gili, J., *Proton magnetic resonance spectroscopy (¹H MRS) of human brain tumours: assessment of differences between tumour types and its applicability in brain tumour categorization*. Eur Radiol, 2003. **13**(3): p. 582-591.
 45. Westbrook, C., *MRI at a Glance*. 2002: Blackwell Science Ltd.
 46. CK, C.W., *MRI in practice*. 2nd ed ed. 1998, Oxford: Blakwell Science Ltd, Osney Mead.
 47. Brown TR, K.B., Ugurbil K, *NMR chemical shift imaging in three dimensions*. Proc Natl Acad Sci USA, 1982. **79**(11): p. 3523-3526.
 48. Segebarth CM, B.D., Luyten PR, den Hollander JA, *Detection of metabolic heterogeneity of human intracranial tumors in vivo by ¹H NMR spectroscopic imaging*. Magn Reson Med, 1990. **13**(1): p. 62-76.
 49. Grütter, R., *Automatic, localized in vivo adjustment of all first- and second-order shim coils*. Magn Reson Med, 1993. **29**(6): p. 804-811.
 50. PohmannR, R.E., von Kienlin M, *Beyond k-space: spectral localization using higher order gradients*. J Magn Reson, 1999. **141**(2): p. 197-206.
 51. Luts J, L.T., Idema AJ, Simonetti AW, Heerschap A, Vandermeulen D, Suykens JA, van Huffel S, *Nosologic imaging of the brain: segmentation and classification using MRI and MRSI*. NMR Biomed, 2009. **22**(4): p. 374-390.
 52. Simoes, R.V., Candiota, A.P., Julià-Sapé, M., Arús, C., *In vivo magnetic resonance spectroscopic imaging and ex vivo quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy*, in *Neuromethods*. 2012, Springer Science+Business Media. p. 329-365.
 53. Ziegler, A., von Kienlin, M., Decorps, M., Remy, C. , *High glycolytic activity in rat glioma demonstrated in vivo by correlation peak ¹H magnetic resonance imaging*. Cancer Res, 2001. **61**: p. 5595-5600.
 54. von Kienlin, M., Ziegler, A., Le Fur, Y., Rubin, C., Decorps, M., Remy, C., *2D-spatial/2D-spectral spectroscopic imaging of intracerebral gliomas in rat brain*. Magn Reson Med, 2000. **43**: p. 211-219.
 55. García-Martín, M.L., Herigault, G., Rémy, C., Farion, R., Ballesteros, P., Coles, J.A., Cerdán, S., Siegler, A., *Mapping extracellular pH in rat brain gliomas in vivo by ¹H magnetic resonance spectroscopic imaging: comparison with maps of metabolites*. Cancer Res, 2001. **61**: p. 6524-6531.
 56. Provent, P., Benito, M., Hiba, B., Farion, R., Lopez-Larrubia, P., Ballesteros, P., Remy, C., Segebarth, C., Cerdan, S., Coles, J.A., García-Martín, M.L., *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, 2007. **67**: p. 7638-7645.
 57. Liimatainen, T.J., Erkkila, A.T., Valonen, P., Vidgren, H., Lakso, M., Wong, G., Grohn, O.H., Yla-Herttuala, S., Hakumaki, J.M., *¹H MR spectroscopic imaging of phospholipase mediated membrane lipid release in apoptotic rat glioma in vivo*. Magn Reson Med, 2008. **59**: p. 1232-1238.

Bibliografia

58. Heerschap, A., et al., *Nuclear magnetic resonance in laboratory animals*. Methods Enzymol, 2004. **385**: p. 41-63.
59. Misayaka, N., Yakahashi, K., Hetherington, H.P., *1H NMR spectroscopic imaging of the mouse brain at 9.4 T*. J Magn Reson Imaging, 2006. **24**: p. 908-913.
60. Boska, M.D., Lewis, T. B., Destache, C. J., Benner, E. J., Nelson, J. A., Uberti, M., Mosley, R. L., Gendelman, H. E., *Quantitative 1H magnetic resonance spectroscopic imaging determines therapeutic immunization efficacy in an animal model of Parkinson's disease*. J Neurosci, 2005. **25**(7): p. 1691-1700.
61. Nelson, J.A., Dou, H., Ellison, B., Uberti, M., Xiong, H., Anderson, E., Mellon, M., Gelbard, H.A., Boska, M., Gendelman, H.E., *Coregistration of quantitative proton magnetic resonance spectroscopic imaging with neuropathological and neurophysiological analyses defines the extent of neuronal impairments in murine human immunodeficiency virus type-1 encephalitis*. J Neurosci Res, 2005. **80**: p. 562-575.
62. Weiss, K., Melkus, G., Jakob, P. M., Faber, C., *Quantitative in vivo 1H spectroscopic imaging of metabolites in the early postnatal mouse brain at 17.6 T*. MAGMA, 2009. **22**(1): p. 53-62.
63. Simoes, R.V., Delgado-Goni, T., Lope-Piedrafita, S., Arus, C., *1H-MRSI pattern perturbation in a mouse glioma: the effects of acute hyperglycemia and moderate hypothermia*. NMR Biomed, 2010. **23**(1): p. 23-33.
64. Diekmann, C., Simoes, R.V., Pohman, R., Cerdán, S., Arús, C., *Proton chemical shift imaging of mouse brain tumors at 7 T*, in *Bruker spin report*, H. WE, Editor. 2006, Gerd Wolff, Bruker Biospin GmbH: Bermann. p. 18-21.
65. Day, S.E., Kettunen, M. I., Gallagher, F. A., Hu, D. E., Lerche, M., Wolber, J., Golman, K., Ardenkjaer-Larsen, J. H., Brindle, K. M., *Detecting tumor response to treatment using hyperpolarized 13C magnetic resonance imaging and spectroscopy*. Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1382-1387.
66. Hakumäki JM, K.R., *1H NMR visible lipids in the life and death of cells*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**: p. 357-362.
67. Chen JH, E.B., Weybright P, Campbell N, Dorfman D, Fletcher CD, Cory DG, Singer S, *Biochemical correlates of thiazolidinedione-induced differentiation by high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy*. Magn Reson Med, 2002. **48**(4): p. 10-602.
68. Barba I, C.M., Arús C, *The relationship between nuclear magnetic resonance visible lipids, lipid droplets, and cell proliferation in cultured C6 cells*. Cancer Res, 1999. **59**: p. 1861-1868.
69. Carlotti, C., Aussenac, F., Dufourc, E. J., *Towards high-resolution 1H-NMR in biological membranes: magic angle spinning of bicelles*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1564**(1): p. 156-164.
70. Hakumäki, J.M., Kauppinen, R.A., *1H NMR visible lipids in the life and death of cells*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**: p. 357-362.
71. Mountford CE, R.G., Grossmanand G, Fox RM, *Characterization of transformed cells and tumours bu proton nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Cancer Res, 1982. **42**: p. 2270-2276.
72. Mountford CE, W.L., *Organization of lipids in the plasma membranes of malignant and stimulated cells: a new model*. Trends Biochem Sci, 1988. **13**: p. 623-628.
73. De Stasio, G., Casalbore, P., Pallini, R., Gilbert, B., Sanita, F., Ciotti, M. T., Rosi, G., Festinesi, A., Larocca, L. M., Rinelli, A., Perret, D., Mogk, D. W., Perfetti, P., Mehta, M. P., Mercanti, D., *Gadolinium in human glioblastoma cells for gadolinium neutron capture therapy*. Cancer Res, 2001. **61**(10): p. 4272-4277.
74. Ferretti, A., Knijn, A., Iorio, E., Pulciani, S., Giambenedetti, M., Molinari, A., Meschini, S., Stringaro, A., Calcabrini, A., Freitas, I., Strom, R., Arancia, G., Podo, F., *Biophysical*

Bibliografía

- and structural characterization of *1H-NMR-detectable mobile lipid domains in NIH-3T3 fibroblasts*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1438**(3): p. 329-348.
75. Murphy, D.J. and J. Vance, *Mechanisms of lipid-body formation*. *Trends Biochem Sci*, 1999. **24**(3): p. 109-15.
 76. Callies, R., Sri-Pathmanathan, R.M., Ferguson, D.Y., Brindle, K.M., *The appearance of neutral lipid signals in the 1H NMR spectra of a myeloma cell line correlates with the induced formation of cytoplasmic lipid droplets*. *Magn Reson Med*, 1993. **29**(4): p. 546-550.
 77. Rémy, C., Fouilhé, N., Barba, I., Sam-Laï, E., Lahrech, H., Cucurella, M.G., Izquierdo, M., Moreno, A., Ziegler, A., Massarelli, R., Décorps, M., Arús, C., *Evidence that mobile lipids detected in rat brain glioma by 1H nuclear magnetic resonance correspond to lipid droplets*. *Cancer Res*, 1997. **57**(3): p. 407-414.
 78. Valdearcos, M., Esquinas, E., Meana, C., Gil-de-Gómez, L., Guijas, C., Balsinde, J., Balboa, M.A., *Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages*. *J Immunol*, 2011. **186**: p. 6004-6013.
 79. Pérez, Y., Lahrech, H., Cabañas, M.E., Barnadas, R., Sabes, M., Rémy, C., Arús, C., *Measurement by nuclear magnetic resonance diffusion of the dimensions of the mobile lipid compartment in C6 cells*. *Cancer Res*, 2002. **62**: p. 5672-5677.
 80. Quintero, M., M.E. Cabanas, and C. Arus, *A possible cellular explanation for the NMR-visible mobile lipid (ML) changes in cultured C6 glioma cells with growth*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1771**(1): p. 31-44.
 81. Traikia, M., Langlais, D.B., Cannarozzi, G.M., Devaux, P.F., *High-resolution spectra of liposomes using MAS NMR. The case of intermediate-size vesicles*. *J Magn Reson*, 1997. **125**: p. 140-144.
 82. Quintero, M., Cabañas, M.E., Arús, C., *¹³C-labelling studies indicate compartmentalized synthesis of triacylglycerols in C6 rat glioma cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1801**(7): p. 693-701.
 83. Franke, W.W., Hergt, M., Grund, C., *Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules*. *Cell*, 1987. **49**: p. 131-141.
 84. Aoki, T., Hagiwara, H., Fujimoro, T., *Peculiar distribution of fodrin in fat-storing cells*. *Experimental cell research*, 1997. **234**: p. 313-320.
 85. Boström, P., Rutberg, M., Ericsson, J., Holmdahl, P., Andersson, L., Frohman, M.A., Borén, J., Olofsson, S-O, *Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**: p. 1945-1951.
 86. Marcinkiewicz, A., Gauthier, D., Garcia, A., Brasaemle, D.L., *The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion*. *J Biol Chem*, 2006. **281**: p. 11901-11909.
 87. Targett-Adams, P., Chambers, D., Gledhill, S., Hope, R. G., Coy, J. F., Girod, A., McLauchlan, J., *Live cell analysis and targeting of the lipid droplet-binding adipocyte differentiation-related protein*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(18): p. 15998-6007.
 88. Andersson, L., Bostrom, P., Ericson, J., Rutberg, M., Magnusson, B., Marchesan, D., Ruiz, M., Asp, L., Huang, P., Frohman, M. A., Boren, J., Olofsson, S. O., *PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 11): p. 2246-2257.
 89. Hirakawa, J., Maruyama, K., Kohl, N.E., Kodama, T., Ruley, H.E., *Massive accumulation of neutral lipids in cells conditionally transformed by an activated H-ras oncogene*. *Oncogene*, 1991. **6**: p. 289-295.
 90. Fox, J.C., Hay, R.V., *Eicosapentaenoic acid inhibits cell growth and triacylglycerol secretion in McA-RH7777 rat hepatoma cells culture*. *Biochemical Journal*, 1992. **286**: p. 305-312.

Bibliografía

91. Delikatny, E.J., Lander, C.M., Hunter, J.C., Hancock, R., Mountford C.E., *Modulation of MR-visible mobile lipids levels by cell culture conditions and correlations with chemostatic response*. International Journal of Cancer, 1996. **65**: p. 238-245.
92. Roman, S.K., Jeitner, T.M., Hancock, R., Cooper, W.A., Rideout, D.C., Delikatny, E.J., *Induction of magnetic resonance-visible lipid in a transformed human breast cell line by tetraphenylphosphonium chloride*. International Journal of Cancer, 1997. **73**: p. 570-579.
93. Finstad, H.S., Drevon, C.A., Kulseth, M.A., Synstad, V.S., Knudsen, E., Kolset, S.O., *Cell proliferation, apoptosis and accumulation of lipid droplets in U937-1 cells incubated with eicopentaenoic acid*. Biochemical Journal, 1998. **336**: p. 451-459.
94. Barba, I., Mann, P., Cabañas, M.E., Arús, C., Gasparovic, C., *Mobile lipid production after confluence and pH stress in perfused C6 cells*. NMR Biomed, 2001. **14**: p. 33-40.
95. Jackowski, S., *Coordination of membrane phospholipid synthesis with the cell cycle*. The Journal of Biological Biochemistry, 1994. **39**: p. 31-43.
96. Jackowski, S., *Cell cycle regulation of membrane phospholipid metabolism*. The Journal of Biological Biochemistry, 1996. **271**: p. 20219-20222.
97. Peleck, S.L., Vance, D.E., *Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis*. Biochim Biophys Acta, 1984. **779**: p. 271-251.
98. Peleck, S.L., Cook, H.W., Paddon, H.B., Vance, D.E., *Membrane bound CTP-phosphocholine cytidyltransferase regulates the rate of phosphatidylcholine synthesis in HeLa cells treated with unsaturated fatty acids*. Biochim Biophys Acta, 1984. **795**: p. 433-440.
99. Jackowski, S., Wang, J., Barburina, I., *Activity of the phosphatidylcholine biosynthetic pathway modulates the distribution of fatty acids into glycerolipids in proliferating cells*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1483**: p. 301-315.
100. Mountford, C.E., Mackinnon, W.B., Russell, P., Rutter, A., Delikatny, E.J., *Human cancers detected by proton MRS and chemical shift imaging ex vivo*. Anticancer research, 1996. **16**: p. 1521-1532.
101. May, G.L., Wright, L.C., Holmes, K.T., Williams, P.G., Smith, I.C.P., Wright, P.E., Fox, R.M., Mountford, C.E., *Assignment of methylene proton resonance in NMR spectra of embryonic and transformed cells to plasma membrane triglyceride*. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**: p. 3048-3053.
102. Veale, M.F., Dingley, .A.J., King, G.F., King, N.J.C., *¹H-NMR visible neutral lipids in activated T lymphocytes: relationship to phosphatidylcholine cycling*. Biochim Biophys Acta-Bioenerg, 1996. **1303**(3): p. 215-221.
103. Knijn, A., Ferretti, A., Zhang, P.J., Giambenedeti, M., Molinari, A., Meschini, S., Pulciani, S., Podo, F., *Lower levels of ¹H MRS-visible mobile lipids in H-Ras transformed tumorigenic fibroblast with respect to their untransformed parental cells*. Cellular and Molecular Biology, 1997. **43**: p. 691-701.
104. Podo, F. and J.D. de Certaines, *Magnetic resonance spectroscopy in cancer: phospholipid, neutral lipid and lipoprotein metabolism and function*. Anticancer Res, 1996. **16**(3B): p. 1305-15.
105. Podo, F., Ferretti, A., Knijn, A., Zhang, P., Ramoni, C., Barletta, B., Pini, C., Baccarini, S., Pulciani, S., *Detection of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in NIH-3T3 fibroblasts and their H-ras transformants: NMR and immunochemical studies*. Anticancer Res, 1996. **16**(3B): p. 1399-412.
106. Freitas, I., Pontiggia, P., Barni, S., Bertone, V., Parente, M., Novarina, A., Roveta, G., Gerzeli, G., Stoward, P., *Histochemical probes for the detection of hypoxic tumour cells*. Anticancer Res, 1990. **10**(3): p. 613-622.
107. Freitas, I., *Lipid accumulation: the common feature to photosensitizer-retaining normal and malignant tissues*. J Photochem Photobiol B, 1990. **7**: p. 359-361.

Bibliografia

108. Greenspan, P., E.P. Mayer, and S.D. Fowler, *Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets*. J Cell Biol, 1985. **100**(3): p. 965-73.
109. Bilheimer, D.W., et al., *Fatty acid accumulation and abnormal lipid deposition in peripheral and border zones of experimental myocardial infarcts*. J Nucl Med, 1978. **19**(3): p. 276-83.
110. Kotitschke, K., Tonn, J. C., Goldbrunner, R., Bogdahn, U., Haase, A., *¹H NMR investigations of tumor spheroids grown from a human glioma biopsy or from a human malignant glioma cell line*. J Magn Reson B, 1995. **109**(1): p. 39-43.
111. Galons, J.P., Job, C, Gillies, R.J., *Increases in GCP levels in cultured mammalian cells during acidosis. A ³¹P MR spectroscopy study using a continuous bioreactor system*. Magnetic Resonance in Medicine, 1995. **33**: p. 422-426.
112. Podo, F., *Tumour phospholipid metabolism*. NMR Biomed, 1999. **12**: p. 413-439.
113. Blankenberg, F.G., Katsikis, P. D., Storrs, R. W., Beaulieu, C., Spielman, D., Chen, J. Y., Naumovski, L., Tait, J. F., *Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Blood, 1997. **89**(10): p. 3778-3786.
114. Hakumäki, J.M., Poptani, H., Sandmair, A.M., Ylä-Herttuala, S., Kauppinen R.A., *¹H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the in vivo detection of apoptosis*. Nature Medicine, 1999. **5**: p. 1323-1327.
115. Sathasivam, N., Brammah, S., Wright, L.C., Delikatny, E.J., *Inhibition of tetraphenylphosphonium induced NMR visible lipid accumulation by chlorpromazine*. Proceedings of the International Society of Magnetic Resonance in Medicine, 1999. **2**: p. 1383.
116. Nadal, L., Leray, G., Desbarats, C., Darcel, F., Bansard, J. Y., Bondon, A., de Certaines, J. D., *Proton and phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy of human brain tumor extracts with automatic data classification: a preliminary study*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1997. **43**(5): p. 659-73.
117. Lavietes, B.B., Coleman, P.J., *The role of lipid metabolism in neoplastic differentiation*. Journal of Theoretical Biology, 1980. **85**: p. 523-542.
118. Parlo, R.A. and P.S. Coleman, *Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria. The truncated Krebs cycle and other metabolic ramifications of mitochondrial membrane cholesterol*. J Biol Chem, 1984. **259**(16): p. 9997-10003.
119. DiAgustine, R.P., Schaeffer, J.M., Fouts, J.R., *Hepatic lipid droplets. Isolation, morphology and composition*. Biochemical Journal, 1973. **132**: p. 323-327.
120. Schneeberger, E.E., Lynch, R.D., Geyer, R.P., *Formation and disappearance of thiglyceride droplets in strain L fibroblasts. An electron microscopic Study*. Experimental Cell Research, 1971. **69**: p. 193-206.
121. Nygren, C., von Holst, H., Mansson, J. E., Fredman, P., *Increased levels of cholesterol esters in glioma tissue and surrounding areas of human brain*. Br J Neurosurg, 1997. **11**(3): p. 216-20.
122. Dessi, S., Batetta, B., Pulisci, D., Spano, O., Lanfranco, G., Tessitore, L., Costelli, P., Baccino, F.M., Anchisi, C, *Altered pattern of lipid metabolism in patients with lung cancer*. Oncology, 1992. **49**(6): p. 436-441.
123. Sabine, J.R., *Metabolic control in precancerous liver-VII. Time course of loss dietary feed-back control of cholesterol synthesis during carcinogen treatment*. European Journal of Cancer, 1976. **12**(4): p. 299-303.
124. Ericksson, S.K., Cooper, A.D., Barnard, G.F., Havel, C.M. Watson, J.A., Feingold, K.R. Moser, A. H., Hughes-Fulford, M., Siperstein, M.D., *Regulation of cholesterol metabolism in a slow growing hepatoma in vivo*. Biochimica et Biophysica Acta, 1988. **960**(2): p. 131-138.

Bibliografia

125. Schroeder, K., Kier, A.B., Olson, C.D., Dempsey, M.E., *Correlation of tumor metastasis with sterol carrier protein and plasma membrane sterol levels*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1984. **124**: p. 283-289.
126. Cantafora, A., Blotta, I., *Neutral lipids production, transport, utilization*. Anticancer Res, 1996. **16**(3B): p. 1441-1449.
127. Campbell, P.N., Smith, A.D., *Biochemistry Illustrated*. 1994, Edinburg: Churchill livingstone.
128. Dessi, S., Batetta, B., Anchisi, C., Pani, P., Tessitore, G., BrocciaAmd, L., Costelli, P., Baccino, F.M., *Cholesterol metabolism in normal and neoplastic cell proliferation*. Archives of Gerontology and Geriatrics, 1991. **Suppl 2**: p. 563-568.
129. Gebhard, R.L., Clayman, R.V., Prigge, V.F., Figenshau, R., Staley, N.A., Reese, C. Bear, A., *Abnormal cholesterol metabolism in renal clear cell carcinoma*. Journal of Lipid Research, 1987. **28**(10): p. 1177-1184.
130. MCArthur, M.J., Frolox, B.P. Atshaves Ans, A., Foxworth, W.D., Kier, A.B., Schoeder, F., *Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids*. Journal of Lipid Research, 1999. **40**: p. 1371-1383.
131. Benda P, L.J., Sato G, Levine L, Sweet W, *Differentiated rat glial cell strain in tissue culture*. Science, 1968. **161**: p. 370-371.
132. Schmidek, H.H., Nielsen, S.L., Schiller, A.L., Messer, J., *Morphological studies of rat brain tumors induced by N-nitrosomethylurea*. J Neurosurg, 1971. **34**(3): p. 335-340.
133. Schlegel, J., Piontek, G., Kersting, M., Schuermann, M., Kappler, R., Scherthan, H., Weghorst, C., Buzard, G., Mennel, H., *The p16/Cdkn2a/Ink4a gene is frequently deleted in nitrosurea- induced rat glial tumors*. Pathobiology, 1999. **67**: p. 202-206.
134. Asai, A., Miyagi, Y., Sugiyama, A, Gamanuma, M., Hong, S.H., Takamoto, S., Matsutani, M., Takamura, K., Kuchino, Y., *Negative effects of wild-type p53 and s-myc on cellular growth and tumorigenicity of glioma cells. Implication of the tumor suppressor genes for gene therapy*. J Neurooncol, 1994. **19**: p. 259-268.
135. Sibenaller, A.Z., Etame, A.B., Ali, M.M., Barua, M., Braun, T.A., Casavant, T.L., Ryken, T.C., *Genetic characterization of commonly used glioma cell lines in the rat animal model system*. Neurosurg Focus, 2005. **15**(4): p. 19.
136. Grobber, B., Deyn, P.P., Slegers, G., *Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion*. Cell Tissue Res, 2002. **310**(3): p. 257-270.
137. Zoula, S., Hérigault, G., Ziegler, A., Farion, R., Décorps, M., Rémy, C., *Correlation between the occurrence of 1H-MRS lipid signal, necrosis and lipid droplets during C6 rat glioma development*. NMR Biomed, 2003. **16**: p. 199-212.
138. Zoula, S., Rijken, P.F., Peters, J.P., Farion, R., der Sanden, B.P. Van, der Kogel, A.J. Van, Décorps, M., Rémy, C., *Pimonidazole binding in C6 rat brain glioma:relation with lipid droplet detection*. Br J Cancer, 2003. **88**: p. 1439-1444.
139. Chen, M.C., Chyan, C. L., Lee, T. T., Huang, S. H., Tzen, J. T., *Constitution of stable artificial oil bodies with triacylglycerol, phospholipid, and caleosin*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(12): p. 3982-3987.
140. Tai, S.S.K., Chen, M.C.M., Peng, C. C., Tzen, J. T.C., *Gene family of oleosin isoforms and their structural stabilization in sesame seed oil bodies*. Biosci Biotech Bioch, 2002. **66**(10): p. 2146-2153.
141. Peng, C.C., Lin, I. P., Lin, C. K., Tzen, J. T., *Size and stability of reconstituted sesame oil bodies*. Biotechnol Prog, 2003. **19**(5): p. 1623-6.
142. Tzen, J.T.C., Lie, G.C., Huang, A.H.C., *Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies*. J Biol Chem, 1993. **267**: p. 15626-15634.

Bibliografía

143. Chen, J.C.F., Tsai, C.C.Y., Tzen, J.T.C., *Cloning secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium binding protein in oil bodies of plant seeds*. *Plant Cell Physiol*, 1999. **40**: p. 1079-1086.
144. Newcomb, E.W., Zagzag, D., *The murine GL261 glioma experimental model to assess novel brain tumor treatments*, in *Cancer Drug Discovery and development*. 2009, CNS Cancer. p. 227-241.
145. Gutmann, D.H., Baker, S.J., Giobannini, M., Garbow, J., Weiss, W. , *Mouse models of human cancer consortium symposium on nervous system tumors*. *Cancer Res*, 2003. **63**(11): p. 3001-3004.
146. Weiss, W.A., Burns, M. J., Hackett, C., Aldape, K., Hill, J. R., Kuriyama, H., Kuriyama, N., Milshcheyn, N., Roberts, T., Wendland, M. F., DePinho, R., Israel, M. A., *Genetic determinants of malignancy in a mouse model for oligodendroglioma*. *Cancer Research*, 2003. **63**(7): p. 1589-1595.
147. Fomchenko, E.I., Holland, E.C., *Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(18): p. 5288-5297.
148. Negendank, W., *Studies of human tumors by MRS: a review*. *NMR Biomed*, 1992. **5**: p. 303-324.
149. Duda, R.O., Hart, P.E., Stork, D.G., *Pattern classification*. Second ed, ed. J.W. Sons. 2001, New York.
150. Wijtes, H., Simonetti, A.W., Buydens, L., *Better brain imaging with chemometrics*. *Anal Chem*, 2001. **73**(19): p. 548A-556A.
151. Preul, M.C., Caramanos, Z., Collins, D.L., Villemure, J.G., Leblanc, R., Olivier, A., Pokrupa, R., Arnold, D.L., *Accurate, noninvasive diagnosis of human brain tumors by using proton magnetic resonance spectroscopy*. *Nat Med*, 1996. **2**(3323-325).
152. De Edelenyi, F.S., Rubin, C., Esteve, F., Grand, S., Decorps, M., Lefournier, V., Le Bas, J.F., Remy, C., *A new approach for analyzing proton magnetic resonance spectroscopic images of brain tumors: nosologic images*. *Nat MEd*, 2000. **6**(11): p. 1287-1289.
153. Bathen, T.F., Geurts, B., Sitter, B., Fjosne, H. E., Lundgren, S., Buydens, L. M., Gribbestad, I. S., Postma, G., Giskeodegard, G. F., *Feasibility of MR metabolomics for immediate analysis of resection margins during breast cancer surgery*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e61578.
154. Sjobakk, T.E., Vettukattil, R., Gulati, M., Gulati, S., Lundgren, S., Gribbestad, I. S., Torp, S. H., Bathen, T. F., *Metabolic profiles of brain metastases*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(1): p. 2104-18.
155. Fisher, R.A., *The use of multiple measurements in taxonomic problems*. *Annals of Eugenics*, 1936. **7**(2): p. 179-188.
156. Tate, A.R., Griffiths, J.R., Martínez-Pérez, I., Moreno, A., Barba, I., Cabañas, M.E., Watson, D., Alonso, J., Bartumeus, F., Isamat, F., Ferrer, I., Vila, F., Ferrer, E., Capdevila, A., Arús, C., *Towards a method for automated classification of 1H MRS spectra from brain tumours*. *NMR Biomed*, 1998. **11**(4-5): p. 177-191.
157. Ortega-Martorell, S., *On the use of advanced pattern recognition techniques for the analysis of MRS and MRSI data in neuro oncology*, in *Departamento de ingeniería de la información y la comunicación*. 2012, Universitat Autònoma de Barcelona.
158. Garcia-Gomez, J.M., Luts, J., Julia-Sape, M., Krooshof, P., Tortajada, S., Robledo, J. V., Melssen, W., Fuster-Garcia, E., Olier, I., Postma, G., Monleon, D., Moreno-Torres, A., Pujol, J., Candiota, A. P., Martinez-Bisbal, M. C., Suykens, J., Buydens, L., Celda, B., Van Huffel, S., Arus, C., Robles, M., *Multiproject-multicenter evaluation of automatic brain tumor classification by magnetic resonance spectroscopy*. *MAGMA*, 2009. **22**(1): p. 5-18.
159. Efron, B., Tibshirani, R.J., *An introducton to the Bootstrap*, in *Monographs on Statistics and Applied probability*, 57. 1998, Chapman & Hall.

Bibliografía

160. Fawcett, T., *An introduction to ROC analysis*. Pattern Recognition Letters, 2006. **27**(8): p. 861-874.
161. Obuchowski, N.A., *Receiver operating characteristic curves and their use in radiology*. Radiology, 2003. **229**(1): p. 3-8.
162. Altman, D.G., Royston, P., *What do we mean by validating a prognostic model?* Stat Med, 2000. **19**(4): p. 453-473.
163. Wijnen, J.P., Idema, A. J., Stawicki, M., Lagemaat, M. W., Wesseling, P., Wright, A. J., Scheenen, T. W., Heerschap, A., *Quantitative short echo time 1H MRSI of the peripheral edematous region of human brain tumors in the differentiation between glioblastoma, metastasis, and meningioma*. J Magn Reson Imaging, 2012. **36**(5): p. 1072-82.
164. Hattingen, E., et al., *(1)H MRSI and progression-free survival in patients with WHO grades II and III gliomas*. Neurol Res. **32**(6): p. 593-602.
165. Hagberg, G., Burlina, A. P., Mader, I., Roser, W., Radue, E. W., Seelig, J., *In vivo proton MR spectroscopy of human gliomas: definition of metabolic coordinates for multi-dimensional classification*. Magn Reson Med, 1995. **34**(2): p. 242-252.
166. Usenius, J.P., Tuohimetsa, S., Vainio, P., Ala-Korpela, M., Hiltunen, Y., Kaupinnen, R.A., *Automated classification of human brain tumours by neural network analysis using in vivo 1H magnetic resonance spectroscopic metabolite phenotypes*. NeuroReport, 1996. **7**: p. 1597-1600.
167. De Vos, M., Laudadio, T., Simonetti, A.W., Heerschap, A., Van Huffel, S., *Fast nosologic imaging of the brain*. J Magn Reson, 2007. **184**(2): p. 292-301.
168. Simoes, R.V., Martinez-Aranda, A., Martin, B., Cerdan, S., Sierra, A., Arus, C., *Preliminary characterization of an experimental breast cancer cells brain metastasis mouse model by MRI/MRS*. MAGMA, 2008. **21**(4): p. 237-49.
169. <http://azizu.uab.es/INTERPRET>. INTERPRET project. [cited.
170. Julia-Sape, M., et al., *A multi-centre, web-accessible and quality control-checked database of in vivo MR spectra of brain tumour patients*. MAGMA, 2006. **19**(1): p. 22-33.
171. <http://gabrmn.uab.es/dss>. INTERPRET DSS, Decision Support System, v3.0. [cited.
172. Ortega-Martorell, S., Olier, I., Julia-Sape, M., Arus, C., *SpectraClassifier 1.0: a user friendly, automated MRS-based classifier-development system*. BMC Bioinformatics, 2010. **11**(106).
173. Greenspan, P., Fowler, S.D., *Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red*. Journal of Lipid Research, 1985. **26**(7): p. 781-789.
174. Peng, C.C., Chen, C.C.F., Shuy, D.J.H., Chen, M.J., Tzen, T.C., *A system for purification of recombinant proteins in Escherichia coli via artificial oil bodies constituted with their oleosin-fused polypeptides*. Journal of Biotechnology, 2004. **111**: p. 51-57.
175. Murphy, S., S. Martin, and R.G. Parton, *Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 441-447.
176. Khaleque, M.A., Okumura, Y., Yabushita, S., Mitani, M., *Detachable immobilization of liposomes on polymer gel particles*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2004. **37**(1-2): p. 35-42.
177. GE Healthcare Life Sciences. [cited; Available from: <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/es/GELifeSciences-es/17047601>.
178. Cha, S., Johnson, G., Wadghiri, Y. Z., Jin, O., Babb, J., Zagzag, D., Turnbull, D. H., *Dynamic, contrast-enhanced perfusion MRI in mouse gliomas: correlation with histopathology*. Magn Reson Med, 2003. **49**(5): p. 848-855.
179. Simoes, R.V., Garcia-Martin, M. L., Cerdan, S., Arus, C., *Perturbation of mouse glioma MRS pattern by induced acute hyperglycemia*. NMR Biomed, 2008. **21**(3): p. 251-64.

Bibliografía

180. Ostertag, C.B., Volk, B., Shibata, T., Bueger, P., Kleihues, P., *The monoclonal antibody Ki-67 as a marker for proliferating cells in stereotactic biopsies of brain tumours*. Acta Neurochirurgica, 1987. **89**: p. 117-121.
181. Gruetter, R., *Automatic, localized in vivo adjustment of all first- and second-order shim coils*. Magn Reson Med, 1993. **29**(6): p. 804-11.
182. Dept. Radiology, C.U. <http://hatch.cpmc.columbia.edu/public/3DiCSI>. [cited.
183. <http://gabrmn.uab.es/dmpm>. *Dynamic MRSI Processing Module (DMPM)*. [cited.
184. Tate, A.R., Majos, C., Moreno, A., Howe, F. A., Griffiths, J. R., Arus, C., *Automated classification of short echo time in in vivo 1H brain tumor spectra: a multicenter study*. Magn Reson Med, 2003. **49**(1): p. 29-36.
185. <http://gabrmn.uab.es/sc>. *Spectra Classifier*. [cited.
186. Simoes, R.V., Ortega-Martorell, S., Delgado-Goni, T., Le Fur, Y., Pumarola, M., Candiota, A. P., Martin, J., Stoyanova, R., Cozzone, P. J., Julia-Sape, M., Arus, C., *Improving the classification of brain tumors in mice with perturbation enhanced (PE)-MRSI*. Integrative Biology, 2012. **4**(2): p. 183-91.
187. Julià-Sapé, M., Acosta, D., Majós, C., Moreno-Torres, A., Wesseling, P., Acebes, J.J., Griffiths, J.R., Arús, C., *Comparison between neuroimaging classifications and histopathological diagnoses using an international multicenter brain tumor magnetic resonance imaging database*. Journal of Neurosurgery, 2006. **105**(1): p. 6-14.
188. Hall, M.A., *Correlation-based subset selection for machines learning*, in *Department of Computer Science*. 1999, The University of Waikato: Hamilton, New Zealand.
189. Liu TH, C.C., Li FY, Tzen JT, *Stability of artificial oil bodies constituted with recombinant caleosins*. J Agric Food Chem, 2009. **57**: p. 2308-2313.
190. Hevonoja T, P.M., Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M, *Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1488**(3): p. 189-210.
191. Vuorela, T., Catte, A., Niemela, P. S., Hall, A., Hyvonen, M. T., Marrink, S. J., Karttunen, M., Vattulainen, I., *Role of lipids in spheroidal high density lipoproteins*. PLoS Comput Biol, 2010. **6**(10): p. e1000964.
192. Deese, A.J., Dratz, E. A., Hymel, L., Fleischer, S., *Proton NMR T1, T2, and T1 rho relaxation studies of native and reconstituted sarcoplasmic reticulum and phospholipid vesicles*. Biophys J, 1982. **37**(1): p. 207-216.
193. Shapiro, Y., *The paramagnetic hydrophilic probing of colloidal systems by NMR spectroscopy*. Russ Chem Rev, 1988. **57**: p. 1253-1272.
194. Griffin, J.L., Lehtimäki, K. K., Valonen, P. K., Grohn, O. H., Kettunen, M. I., Ylä-Herttuala, S., Pitkanen, A., Nicholson, J. K., Kauppinen, R. A., *Assignment of 1H nuclear magnetic resonance visible polyunsaturated fatty acids in BT4C gliomas undergoing ganciclovir-thymidine kinase gene therapy-induced programmed cell death*. Cancer Res, 2003. **63**(12): p. 3195-3201.
195. Valverde-Saubi, D., Candiota, A. P., Molins, M. A., Feliz, M., Godino, O., Davila, M., Acebes, J. J., Arus, C., *Short-term temperature effect on the HRMAS spectra of human brain tumor biopsies and their pattern recognition analysis*. MAGMA, 2010. **23**(4): p. 203-15.
196. Opstad, K.S., Bell, B. A., Griffiths, J. R., Howe, F. A., *An assessment of the effects of sample ischaemia and spinning time on the metabolic profile of brain tumour biopsy specimens as determined by high-resolution magic angle spinning (1)H NMR*. NMR Biomed, 2008. **21**(10): p. 1138-47.
197. Bishop, C.C., *Pattern Recognition and Machine Learning*, ed. springer. 2006, New York.
198. R.O.H., D., Stork, *Pattern Classification*. 2nd ed, ed. J.W. Sons. 2001, New York.
199. Luts, J., Heerschap, A., Suykens, J.A., Van Huffel, S.A., *A combined MRI and MRSI based multiclass system for brain tumour recognition using LS-SVMs with class probabilities and feature selection*. Artif Intell Med, 2007. **40**(2): p. 87-102.

Bibliografía

200. Laudadio, T., Martínez-Bisbal, M.C., Celda, B., Van Huffel, S., *Fast nosological imaging using canonical correlation analysis of brain data obtained by two-dimensional turbo spectroscopic imaging*. NMR Biomed, 2008. **21**(4): p. 311-321.
201. Vellido, A., Lisboa, P.J., *Handling outliers in brain tumour MRS data analysis through robust topographic mapping*. Comput Biol Med, 2006. **36**(10): p. 1049-1063.
202. Wright, A.J., Fellows, G., Byrnes, T.J., Opstad, K.S., McIntyre, D.J., Griffiths, J.R., Bell, B.A., Clark, C.A., Barrick, T.R., Howe, F.A., *Pattern recognition of MRSI data shows regions of glioma growth that agree with DTI markers of brain tumor infiltration*. Magn Reson Med, 2009. **62**(6): p. 1646-1651.

7. ANEXOS

7.1 Clasificación WHO de tumores del sistema nervioso

WHO Classification of Tumours of the Nervous System

TUMOURS OF NEUROEPITHELIAL TISSUE

Astrocytic tumours

Diffuse astrocytoma	9400/3 ¹
Fibrillary astrocytoma	9420/3
Protoplasmic astrocytoma	9410/3
Gemistocytic astrocytoma	9411/3
Anaplastic astrocytoma	9401/3
Glioblastoma	9440/3
Giant cell glioblastoma	9441/3
Gliosarcoma	9442/3
Pilocytic astrocytoma	9421/1
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1

Oligodendroglial tumours

Oligodendroglioma	9450/3
Anaplastic oligodendroglioma	9451/3

Mixed gliomas

Oligoastrocytoma	9382/3
Anaplastic oligoastrocytoma	9382/3 ²

Ependymal tumours

Ependymoma	9391/3
Cellular	9391/3
Papillary	9393/3
Clear cell	9391/3
Tanycytic	9391/3
Anaplastic ependymoma	9392/3
Myxopapillary ependymoma	9394/1
Subependymoma	9383/1

Choroid plexus tumours

Choroid plexus papilloma	9390/0
Choroid plexus carcinoma	9390/3

Glial tumours of uncertain origin

Astroblastoma	9430/3
Gliomatosis cerebri	9381/3
Chordoid glioma of the 3 rd ventricle	9444/1

Neuronal and mixed neuronal-glial tumours

Gangliocytoma	9492/0
Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	9493/0
Desmoplastic infantile astrocytoma / ganglioglioma	9412/1
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Ganglioglioma	9505/1
Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Central neurocytoma	9506/1
Cerebellar liponeurocytoma	9506/1
Paraganglioma of the filum terminale	8680/1

Neuroblastic tumours

Olfactory neuroblastoma (Aesthesioneuroblastoma)	9522/3
Olfactory neuroepithelioma	9523/3
Neuroblastomas of the adrenal gland and sympathetic nervous system	9500/3

Pineal parenchymal tumours

Pineocytoma	9361/1
Pineoblastoma	9362/3
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3

Embryonal tumours

Medulloepithelioma	9501/3
Ependymblastoma	9392/3
Medulloblastoma	9470/3
Desmoplastic medulloblastoma	9471/3
Large cell medulloblastoma	9474/3
Medullomyoblastoma	9472/3
Melanotic medulloblastoma	9470/3
Supratentorial primitive neuroectodermal tumour (PNET)	9473/3
Neuroblastoma	9500/3
Ganglioneuroblastoma	9490/3
Atypical teratoid/rhabdoid tumour	9508/3

TUMOURS OF PERIPHERAL NERVES

Schwannoma

(Neurilemmoma, Neurinoma)	9560/0
Cellular	9560/0
Plexiform	9560/0
Melanotic	9560/0

¹ Morphology code of the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) and the Systematized Nomenclature of Medicine (SNOMED). Behaviour is coded /0 for benign tumours, /1 for low or uncertain malignant potential or borderline malignancy, /2 for in situ lesions) and /3 for malignant tumours.

² The italicised numbers are provisional codes proposed for the third edition of ICD-O. They should, for the most part, be incorporated into the next edition of ICD-O, but they are subject to change.

Neurofibroma	9540/0	Chondrosarcoma	9220/3
Plexiform	9550/0	Osteoma	9180/0
Perineurioma	9571/0	Osteosarcoma	9180/3
Intraneural perineurioma	9571/0	Osteochondroma	9210/0
Soft tissue perineurioma	9571/0	Haemangioma	9120/0
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)	9540/3	Epithelioid haemangioendothelioma	9133/1
Epithelioid	9540/3	Haemangiopericytoma	9150/1
MPNST with divergent mesenchymal and / or epithelial differentiation	9540/3	Angiosarcoma	9120/3
Melanotic	9540/3	Kaposi sarcoma	9140/3
Melanotic psammomatous	9540/3	Primary melanocytic lesions	
		Diffuse melanocytosis	8728/0
		Melanocytoma	8728/1
		Malignant melanoma	8720/3
		Meningeal melanomatosis	8728/3
TUMOURS OF THE MENINGES		Tumours of uncertain histogenesis	
Tumours of meningotheial cells		Haemangioblastoma	9161/1
Meningioma	9530/0		
Meningothelial	9531/0	LYMPHOMAS AND HAEMOPOIETIC NEOPLASMS	
Fibrous (fibroblastic)	9532/0	Malignant lymphomas	9590/3
Transitional (mixed)	9537/0	Plasmacytoma	9731/3
Psammomatous	9533/0	Granulocytic sarcoma	9930/3
Angiomatous	9534/0		
Microcystic	9530/0	GERM CELL TUMOURS	
Secretory	9530/0	Germinoma	9064/3
Lymphoplasmacyte-rich	9530/0	Embryonal carcinoma	9070/3
Metaplastic	9530/0	Yolk sac tumour	9071/3
Clear cell	9538/1	Choriocarcinoma	9100/3
Chordoid	9538/1	Teratoma	9080/1
Atypical	9539/1	Mature	9080/0
Papillary	9538/3	Immature	9080/3
Rhabdoid	9538/3	Teratoma with malignant transformation	9084/3
Anaplastic meningioma	9530/3	Mixed germ cell tumours	9085/3
Mesenchymal, non-meningothelial tumours		TUMOURS OF THE SELLAR REGION	
Lipoma	8850/0	Craniopharyngioma	9350/1
Angiolipoma	8861/0	Adamantinomatous	9351/1
Hibernoma	8880/0	Papillary	9352/1
Liposarcoma (intracranial)	8850/3	Granular cell tumour	9582/0
Solitary fibrous tumour	8815/0		
Fibrosarcoma	8810/3	METASTATIC TUMOURS	
Malignant fibrous histiocytoma	8830/3		
Leiomyoma	8890/0		
Leiomyosarcoma	8890/3		
Rhabdomyoma	8900/0		
Rhabdomyosarcoma	8900/3		
Chondroma	9220/0		

7.2 Información de los plásmidos

7.2.1 Plásmido que contiene oleosina

GenBank: AF302807.1

Sesamum indicum oleosin mRNA, complete cds

LOCUS AF302807 808 bp mRNA linear PLN 10-JUN-2004

DEFINITION Sesamum indicum oleosin mRNA, complete cds.

ACCESSION AF302807

VERSION AF302807.1 GI:10834826

KEYWORDS .

SOURCE Sesamum indicum (sesame)

ORGANISM [Sesamum indicum](#)

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
asterids; lamiids; Lamiales; Pedaliaceae; Sesamum.

REFERENCE 1 (bases 1 to 808)

AUTHORS Tai,S.S.K., Chen,M.C.M., Peng,C.C. and Tzen,J.T.C.

TITLE Gene family of oleosin isoforms and their structural stabilization
in sesame seed oil bodies

JOURNAL Biosci. Biotechnol. Biochem. 66 (10), 2146-2153 (2002)

PUBMED [12450125](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 808)

AUTHORS Tai,S.S.K. and Tzen,J.T.C.

TITLE Molecular cloning of sesame oleosin genes

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 3 (bases 1 to 808)

AUTHORS Tai,S.S.K. and Tzen,J.T.C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (05-SEP-2000) Graduate Institute of Agricultural
Biotechnology, National Chung-Hsing University, Taichung 40227,
Taiwan

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..808

/organism="Sesamum indicum"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:[4182](#)"

[CDS](#) 24..524

/note="high form oleosin; 17 kDa"

Anexos

```
/codon_start=1
/product="oleosin"
/protein_id="AAG23840.1"
/db_xref="GI:10834827"
/translation="MADRDRPHPHQIQVHPQHPRHYEGGVKSLLPQKGPSTTQILAI
TLLPISGTLCLAGITLVGTLIGLAVATPVFVIFSPVLVPAAILIAGAVTAFLTSGAF
GLTGLSSLSWVLNSFRRATGQGPLEYAKRGVQEGTLYVGEKTKQAGEAIKSTAKEGGR
EGTART"
```

ORIGIN

```
1 ctccattca aatctctcc cccatggcgg accgcgaccg tccacacccc caccaaattc
61 aagtccaccc tcaacatccg caccgctatg aagggtggcgt caagtctctc ctccctcaa
121 agggcccctc caccaccag attctcgcca taatcacctc cttcccatc agcggcacgc
181 ttcttgctc agctgggatc acgctcgtcg ggaccctcat cggacttga gtcgccaccc
241 cagtctctg gatcttcagc cctgttctgg ttcccgcagc catactgata gccggcgcg
301 tcacggcgtt ttgacgtcc ggggctttg ggctgacggg gcttctcgtc ctttctggg
361 ttctgaattc attcagacgg gcgacggggc aggggcccgt ggagtacgcg aagcgaggcg
421 tgcaggaggg gactttgat gtgggagaga agacgaagca agcgggcgaa gcgattaaga
481 gcacagccaa ggaaggaggg cgagaaggga ctgcacggac ttgaagaata tgggtgaagc
541 tgcatgcatc cgtggccggg aaacatatca ataatgacgc agaattggta tttatttgt
601 atctctagtt ttgatgtgt gtgtgtgtga gtgctggtgc tggctgctgt gtggggaagt
661 tttaatttt ttgtgggtt tgtgtagaat gtgatggatg gtccatgata gaatatttgt
721 aaatcacttt gctggaaatc aatgaaaata ggtgggatgg ggctggtcct ccttggtatt
781 ctccgctta aaaaaaaaaa aaaaaaaaa
```

7.2.2 Plásmido que contiene caleosina

GenBank: AF109921.1

Sesamum indicum caleosin mRNA, complete cds

LOCUS AF109921 1030 bp mRNA linear PLN 17-AUG-2001

DEFINITION Sesamum indicum caleosin mRNA, complete cds.

ACCESSION AF109921

VERSION AF109921.1 GI:6478217

KEYWORDS .

SOURCE Sesamum indicum (sesame)

ORGANISM [Sesamum indicum](#)

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;

Anexos

asterids; lamiids; Lamiales; Pedaliaceae; Sesamum.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1030)

AUTHORS Chen,J.C., Tsai,C.C. and Tzen,J.T.

TITLE Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds

JOURNAL Plant Cell Physiol. 40 (10), 1079-1086 (1999)

PUBMED [10589521](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1030)

AUTHORS Chen,J.C.F. and Tzen,J.T.C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (27-NOV-1998) Graduate Institute of Agricultural Biotechnology, National Chung-Hsing University, Taichung 40227, Taiwan

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1030
/organism="Sesamum indicum"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:[4182](#)"
/tissue_type="seed oil body"

[CDS](#) 40..777
/note="27 kDa calcium-binding protein"
/codon_start=1
/product="caleosin"
/protein_id="[AAF13743.1](#)"
/db_xref="GI:6478218"

/translation="MATHVLA AAAAERNAALAPDAPLAPVTMERPVRTDLETSIPKP YM

ARGLVAPDMDHPNGTPGHVHDNLSVLQQHCAFFDQDDNGIIPWETYSGLRQIGFNVI

ASLIMAIVINVALSYPTLPGWIPSPFFPIYLYNIHKAKHGS DSGTYDTEGRYLPMNFE

NLFSKHARTMPDRLTLGELWSMTEANREAFDIFGW IASKMEWTL LYILARDQDGFLSK

EAIRRCYDGSLFEYCAKMQRGAEDKMK"

ORIGIN

1 ggcacgagag agaaaaagg tgatttgtc aagggaata tggcaactca tgtttggct
61 gctgcgggcg agagaaatgc tgcgtggcg ccggacgcc cgcttgctcc ggtgactatg
121 gagcgccag tgcgcactga cttggagact tcgatcccga agccctatat ggcaagagga
181 ttggttgac ctgatatgga tcacccaac ggaacaccag gccatgtgca tgataattg
241 agtgtgctgc aacagcattg tgctttctt gatcaggatg ataacggaat catctatcca
301 tgggagactt actctggact tcgcaaatt ggttcaatg tgatagcttc ccttataatg
361 gctatcgta ttaatgtggc gctgagttat cctactctcc cgggttgat tccttctcct
421 ttttccca tatattgta caacatacac aaggccaaac atggaagcga ctccggaacc

Anexos

481 tatgatactg aaggaaggta cctacctatg aatittgaga acctgttcag caagcatgcc
541 cggacaatgc cccataggct cactctaggg gagctatgga gcatgactga agctaacaga
601 gaagcatttg acatttcgg ctggatcgca agcaaatgg agtggactct cctctacatt
661 cttgcaagag accaggacgg ttcctgtcg aaagaagcca tcaggcgggtg ttacgatggc
721 agttgttcg agtactgtgc aaagatgcaa aggggagccg aggacaagat gaaatgaagg
781 aaatcggcta tcgcggtagg tgtaagtat gatgtggtgt gtatgatgga ttgaaagtgc
841 cagtgcctaa gttgtgtgc agagtctgt gtaataacct ttgtgtacag atttaaggtc
901 tcggaattgg tgtaactgtg gagaagatgt tgactcctgt tttgttcaa taagtccaac
961 tcttgacatt tggttggtt gcagggaaag atggggaatt ttgtttccg aaaaaaaaaa
1021 aaaaaaaaaa

7.3 Programas de pulsos de las secuencias empleadas

7.3.1 Pulso y adquisición

```
;zg  
  
;avance-version (06/11/09)  
  
;1D sequence  
  
;  
  
"acqt0=-p1*2/3.1416"  
  
1 ze  
  
2 30m  
  
d1  
  
p1 ph1  
  
go=2 ph31  
  
30m mc #0 to 2 F0(zd)  
  
exit  
  
ph1=0 2 2 0 1 3 3 1  
  
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1  
  
;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)  
  
;p1 : f1 channel - high power pulse  
  
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1  
  
;NS: 1 * n, total number of scans: NS * TD0  
  
;$Id: zg,v 1.9 2006/11/10 10:56:44 ber Exp $
```

7.3.2 Pulso y adquisición con presaturación del agua

```
;zgpr
;avance-version (06/11/09)
;1D sequence with f1 presaturation
;
"d12=20u"
"acqt0=-p1*2/3.1416"
1 ze
2 30m
d12 pl9:f1
d1 cw:f1 ph29
4u do:f1
d12 pl1:f1
p1 ph1
go=2 ph31
30m mc #0 to 2 F0(zd)
exit
ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph29=0
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
```

Anexos

;d12: delay for power switching [20 usec]

;NS: 1 * n, total number of scans: NS * TD0

;\$Id: zgpr,v 1.9 2006/11/10 10:56:44 ber Exp \$

7.4 Variables seleccionadas en los clasificadores

En la siguiente tabla se muestran las resonancias seleccionadas como variables para los cuatro clasificadores que se han probado. En rojo se resaltan las resonancias que corresponden a la región de los lípidos móviles.

Variables	GBM vs OD2 vs NT	GBM vs OD3 vs NT	GBM vs OD2 vs OD3 vs NT	OD2 vs OD3 vs NT
1	1,30 ppm	1,30 ppm	1,31 ppm	2,01 ppm
2	3,51 ppm	3,11 ppm	2,01 ppm	3,03 ppm
3	2,01 ppm	2,01 ppm	3,52 ppm	2,46 ppm
4	2,34 ppm	1,32 ppm	3,10 ppm	1,05 ppm
5	1,45 ppm	2,05 ppm	2,34 ppm	3,38 ppm
6	3,85 ppm	3,12 ppm	1,43 ppm	2,03 ppm
7	2,47 ppm	1,97 ppm	3,85 ppm	2,46 ppm
8	1,47 ppm	3,05 ppm	1,32 ppm	1,05 ppm
9	1,95 ppm	4,04 ppm	2,47 ppm	3,85 ppm
10	1,28 ppm	1,29 ppm	2,03 ppm	3,28 ppm
11	3,53 ppm	3,10 ppm	3,11 ppm	2,31 ppm
12	4,08 ppm	2,34 ppm	3,54 ppm	3,12 ppm
13	2,14 ppm	2,00 ppm	3,15 ppm	1,31 ppm
14	3,53 ppm	3,15 ppm	4,05 ppm	3,02 ppm
15	2,03 ppm	3,54 ppm	2,00 ppm	1,94 ppm
16	3,52 ppm	1,31 ppm	2,34 ppm	1,00 ppm
17	2,47 ppm	2,08 ppm	3,06 ppm	2,47 ppm
18	1,42 ppm	3,11 ppm	1,29 ppm	1,09 ppm
19	4,06 ppm	1,90 ppm	2,31 ppm	3,40 ppm
20	3,67 ppm	1,44 ppm	1,05 ppm	2,00 ppm
21	2,03 ppm	3,02 ppm	1,45 ppm	2,48 ppm
22	1,47 ppm	2,39 ppm	3,12 ppm	3,10 ppm
23	1,86 ppm	3,13 ppm	2,46 ppm	2,45 ppm

7.5. Artículos

Influence of the spinning rate in the HR-MAS pattern on mobile lipids in C6 glioma cells and in artificial oil bodies

J. Martín-Sitjar, T. Delgado-Goñi, M.E. Cabañas, J. Tzen, C. Arús.

Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine (2012) 25(6):487-496.

Improving the classification of brain tumors in mice with perturbation enhanced (PE)-MRSI

R.V. Simoes, S. Ortega-Martorell, T. Delgado-Goñi, Y. Le Fur, M. Pumarola, A.P.

Candiona, J. Martín, R. Stoyanova, P.J. Cozzone, M. Julià-Sapé, C. Arús.

Integrative Biology. (2012) 4; 183-191.

Dimethyl sulfoxide (DMSO) as a potential contrast agent for brain tumors

T. Delgado-Goñi, J. Martín-Sitjar, R.V. Simoes, M. Acosta, S. Lope-Piedrafita, C. Arús..

NMR in biomedicine (2012) 26(2):173-84.

Assessment of a ¹H high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy procedure for free sugars quantification in intact plant tissue.

T. Delgado, S. Campo, J. Martín-Sitjar, M.E. Cabañas, B. San Segundo, C. Arús.

Planta (2013). Online