



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Preservación del patrón metabolómico de tejidos mediante fijación por irradiación con microondas focalizadas.

Aplicación al estudio del tejido cerebral normal y patológico mediante espectroscopía HRMAS y metodologías de reconocimiento de patrones

TESIS DOCTORAL
Myriam Dávila Huerta



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Preservación del patrón metabolómico de tejidos mediante fijación por irradiación con microondas focalizadas.

Aplicación al estudio del tejido cerebral normal y patológico mediante espectroscopía HRMAS y metodologías de reconocimiento de patrones.

**Myriam Dávila Huerta
Noviembre 2013**

Tesis doctoral



Universitat Autònoma de Barcelona

Preservación del patrón metabólico de tejidos mediante fijación por irradiación
con microondas focalizadas.

Aplicación al estudio del tejido cerebral normal y patológico mediante
espectroscopía HRMAS y metodologías de reconocimiento de patrones.

Memoria presentada por Myriam Dávila Huerta para optar al grado de
Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Tesis adscrita al programa de doctorado en Bioquímica, Biología Molecular i
Biomedicina en el Departamento de Bioquímica i Biología Molecular de la
Universitat Autònoma de Barcelona bajo la dirección del Dr. Carles Arús Caraltó y la
Dra. Ana Paula Candiota Silveira

Firma de los directores:

Dr. Carles Arús Caraltó

Dra. Ana Paula Candiota Silveira

Firma de la doctoranda:

Myriam Dávila Huerta

Cerdanyola del Vallès, Noviembre 2013

A mis padres, por estar siempre conmigo aún en la distancia, por hacer todo en la vida para que yo lograra mis sueños.

“El tiempo es un poco de vida que se inventa para sufrir o gozar según se quiera”.

Ydalio Huerta Escalante

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directores de tesis, el Prof. Carles Arús y la Dra. Ana Paula Candiota. Gracias por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento. Todo lo que he aprendido de ustedes ha contribuido enormemente a mi formación tanto científica como personal.

Al Dr. Joan Martí y la Dra. Elena Jiménez del grupo de investigación de la *Unitat de Malalties Vasculares Cerebrals del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* de Barcelona, por darme la oportunidad de trabajar con ellos en el interesante campo del Ictus. Especialmente a Elena, con la que compartí día a día el experimental del doctorado y aprendí entre otras cosas, que una colaboración científica puede ser la puerta a una amistad extraordinaria.

A mi grupo de investigación, con los que he compartido alegrías, dificultades, nervios y celebraciones a lo largo de la Tesis. A Margarida Juliá-Sapè, quien fue una de las primeras personas en acogerme en el grupo, siempre dispuesta a guiarme y asesorarme de la manera más positiva. A Teresa Delgado, mi “wikiteresa” por compartir sus conocimientos que combinados con su sonrisa brindaba paz en los momentos confusos de la investigación. A Magda Ciezka, por su apoyo, por recordarme siempre el lado divertido de la ciencia, gracias por siempre estar, por convertirse en parte de mi familia, México y Polonia nunca fueron tan parecidos. A Milena Acosta, por los indispensables momentos de desconexión en la tesis y la buena vibra que se mantenía en el laboratorio. A Juana Martín, por transmitirme sus conocimientos de HRMAS en la primera fase de mi tesis y los momentos compartidos. A Nuria Arias por el apoyo en la recta final, que terminó por convertirse en el fragmento de aliento necesario para finalizar. A Laura Ferrer, por el ánimo que inyectó al grupo con su llegada y, por su puesto, al equipo informático del grupo: a Alina García, por su incondicional apoyo, por compartir sus conocimientos informáticos y por ayudarme siempre en todo, todo. A Sandra Ortega por el desarrollo del SC, del que soy fan, además, por estar siempre dispuesta a esclarecer mis dudas y por la intención de colaborar conmigo. A Victor Mocioiu por su apoyo y la alegría que me transmitía en el último tramo y más difícil de la tesis. Gracias a todos los que ya no están en el grupo, pero que sin duda han dejado una

enseñanza invaluable: Daniel Valverde, Rui Simoes, Miriam Camisón, Iván Olier, Alex Perez, Edgar Villarraga, Josep Alemany, y en especial a Angeles Verdugo, la primer persona que conocí en la universidad, mi compañera de máster en aquel momento, la que me animaría a entrar a este grupo de investigación, hoy mi amiga y pieza fundamental de mi estancia en Barcelona, gracias por seguir paso a paso el trayecto de la tesis, por su apoyo y su cariño.

A todo el equipo del *Servei de Ressonància Magnètica Nuclear* de la UAB, en especial a Miquel Cabañas y Pau Nolis, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme a entender miles de conceptos y problemas prácticos de la RMN.

Al Dr. Martí Pumarola, por su valiosa colaboración en toda la tesis, por el asesoramiento con los diagnósticos histopatológicos, por su dedicación y esfuerzo en enseñarme mucho del tema, así como por su interés en el trabajo del grupo. Gracias también a Esther Blasco y Lola López por el trabajo realizado.

Al personal de Neurocirugía del *Hospital Universitari de Bellvitge*, especialmente el Dr. Acebes por su valiosa colaboración y al equipo de neurocirujanos y enfermeras que sin su ayuda en la recolección de muestras, esta tesis jamás hubiera sido posible.

Al *Servei d'Estabulari* de la UAB que ha estado presente durante estos años y sin el cual gran parte del experimental no se hubiera llevado a cabo.

Al *Servei de Microscòpia* de la UAB, en especial al Dr. Onofre Castell y Anna Tarruella que se involucraron con mucho interés en la parte de microscopía electrónica de esta tesis, por su paciencia y por enseñarme esta técnica fascinante.

A la Dra. María Antonia Molins del *Servei de Ressonància del Parc Científic* de Barcelona, por enseñarme la técnica del HRMAS y ayudarme en la primera etapa de la tesis.

Gracias al *Departamento de Bioquímica i Biología Molecular* de la UAB por concederme la beca, por darme la formación y hacerme parte del plantel docente de la institución. A mis compañeros PIFs, en especial David Pulido, Andrea Chicano y Julia Lorenzo por su infinito apoyo y valiosa colaboración, con ellos la docencia era el mejor complemento del doctorado y por supuesto, al soporte técnico imprescindible para mí: Santiago Canela y Magda Giralt. También quiero agradecer

a la gente del departamento, en especial a Salvador Bartolomé y Helena Carbó por compartir su experiencia y conocimientos, además de la buena vibra que siempre me animaba a continuar.

Gracias de corazón a mis amigos tanto en Barcelona como en México, a los que les he robado horas de compañía. Nombrar a todos sería muy extenso y podría cometer algún olvido injusto, por ello, gracias amigos por estar siempre ahí, por apoyarme, por hacerme reír y sobre todo, por creer en mí.

Gracias con todo cariño a la familia Outeiriño Sánchez, por su apoyo incondicional, por los consejos recibidos y todo el tiempo que han estado conmigo mientras mi cabeza estaba llena de los conceptos de la tesis. Gracias por hacerme sentir parte de la familia y como si estuviese en casa durante este tiempo.

Gracias a Liz Tinajero, porque aún en la distancia siempre ha permanecido intacta la amistad, indispensable para crecer tanto personal como profesionalmente. Gracias por su apoyo y por la colaboración en el diseño de esta tesis.

Y por encima de todo, y con todo mi amor, gracias a los míos por estar incondicionalmente conmigo durante estos años de tesis. Gracias a mis padres, Guillermo y Miriam, por transmitirme su fuerza y amor desde tan lejos; gracias a mis hermanos: a Ydalio, porque su presencia este año me lleno de vida, alegría, cariño y diversión, sin el aquí, la dificultad de las cosas se hubieran elevado a una potencia inexistente. A Javier y Guillermo, por su apoyo constante, sus consejos y por enviarme día a día las fuerzas necesarias para no abandonar nunca. A Amelia y mis sobrinos, Augusto y Santiago, por los indescriptibles momentos de ternura científica que me han animado muchísimo durante todo este tiempo. Y, finalmente a Antonio, por llegar a serlo todo; si enumerara lo que él ha significado todo este tiempo para mí y las cosas que tengo que agradecerle, cometería seguro algún despiste y también me extendería muchísimo, por ello gracias, porque esta etapa sería mil veces más difícil sin él.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XII
1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Historia breve y evolución de la resonancia magnética nuclear (RMN).....	3
1.1.1 El fenómeno de la resonancia.....	4
1.1.2 Parámetros básicos en RMN.....	7
1.1.2.1 Parámetros espectrales.....	7
1.1.2.2 Tiempos de relajación.....	11
1.2 Aplicaciones biomédicas de la Imagen y Espectroscopía por RMN.....	14
1.2.1 Imagen por resonancia magnética (IRM).....	14
1.2.2 Espectroscopía por resonancia magnética (ERM).....	15
1.2.2.1 Espectroscopía de alta resolución utilizando la técnica de rotación en ángulo mágico (<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i> , HRMAS).....	18
1.3 Neoplasias.....	23
1.3.1 Tumores cerebrales.....	24
1.3.1.1 Clasificación.....	25
1.3.1.2 Epidemiología y etiología.....	27
1.3.1.3 Diagnóstico.....	29
1.4 Uso de la irradiación por microondas focalizadas (<i>Focused microwave</i> , FMW) en la “fijación” de tejidos.....	35
1.5 Desarrollo de clasificadores de tumores cerebrales para la ayuda al diagnóstico mediante el análisis de patrones espectrales.....	38
1.6 Estudio de la patología cerebral en modelos preclínicos.....	43
2.OBJETIVOS.....	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51

3.1 ANIMALES Y LÍNEAS CELULARES INVESTIGADAS	53
3.2 GENERACIÓN DE TUMORES CEREBRALES EN RATÓN	54
3.3 MÉTODOS DE SACRIFICIO UTILIZADOS.....	55
3.3.1 Método de sacrificio por sobredosis de anestesia	55
3.3.2 Método de sacrificio por irradiación con microondas focalizadas (FMW)	56
3.4 Fijación de biopsias de tejido cerebral o tumoral (humano y ratón) por FMW	57
3.5 Obtención y almacenamiento de muestras.....	58
3.5.1 Biopsias de tumores cerebrales humanos.....	58
3.5.2 Muestras de tejido cerebral de rata	59
3.5.3 Muestras de tejido cerebral de ratón.	59
3.5.3.1 Evaluación de la influencia del método de sacrificio (irradiación por microondas focalizadas o sobredosis de anestesia), estudiado por espectroscopía HRMAS en el patrón espectral de cerebro de ratón.....	59
3.5.3.2 Evaluación de la Influencia del método de sacrificio por irradiación o sobredosis de anestesia por microondas focalizadas en el patrón espectral de tumores GL261 estudiado por espectroscopía HRMAS.....	59
3.5.3.3 Evaluación de la influencia de la irradiación por FMW en la minimización de los cambios en el patrón espectral de tumores GL261 durante experimentos de HRMAS a 37° C	60
3.6 Espectroscopía <i>high resolution magic angle spinning</i> (HRMAS)	60
3.6.1 Preparación de muestras y equipo utilizado.....	60
3.6.2 Ajuste del ángulo mágico y calibración de la temperatura de la muestra en el rotor	
3.6.3 Parámetros de adquisición de espectros HRMAS de biopsias.....	64
3.6.4 Parámetros de adquisición para los estudios <i>in vivo</i>	65
3.6.5 Procesamiento de los espectros de HRMAS adquiridos	66
3.7 Evaluación histopatológica de muestras después de su análisis por espectroscopía HRMAS	67
3.8 Microscopía electrónica de muestras después de su análisis por espectroscopía HRMAS....	67
3.9 Análisis estadístico de los datos	68
3.10 Análisis de los espectros de HRMAS mediante metodologías de reconocimiento de patrones	69
3.10.1 Control de calidad para la selección de los espectros a utilizar en el desarrollo de clasificadores	71
3.10.2 Desarrollo de los clasificadores.....	72
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	77
4.1 Ajuste del ángulo mágico y calibración de temperatura	79

4.2 Estudio de la influencia del método de sacrificio (irradiación con microondas focalizadas vs. sobredosis de anestesia) en el patrón espectral por HRMAS de cerebro de ratón	83
4.3 Uso de la técnica de irradiación por microondas focalizadas (FMW) como método de sacrificio para evitar el metabolismo <i>post mortem</i> del cerebro de rata (control y post-infarto cerebral)	86
4.4 Estudio de la minimización de los cambios en el patrón espectral de tumor GL261 durante experimentos de HRMAS a 37°C mediante la irradiación de las muestras obtenidas por FMW.	90
4.5 Estudio preliminar de la heterogeneidad del patrón espectral de tumores murinos GL261 detectado por HRMAS.....	100
4.6 Análisis mediante reconocimiento de patrones de biopsias de tumores cerebrales humanos estudiados por HRMAS.....	106
4.6.1 Clasificadores desarrollados para datos adquiridos a 11,7T	106
4.6.2 Clasificadores desarrollados para datos adquiridos a 9,4T.....	120
5. CONCLUSIONES	133
6. BIBLIOGRAFÍA.....	139
7. ANEXOS	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Espectro electromagnético.....	4
Figura 1.2. Alineamiento de los momentos magnéticos, de los núcleos con espín $\frac{1}{2}$ con el campo magnético externo B_0 en sus dos orientaciones posibles.....	5
Figura 1.3. Modelo simplificado de la magnetización microscópica.....	6
Figura 1.4. Obtención de un espectro desde la FID utilizando la Transformada de Fourier (TF).....	7
Figura 1.5. Posición de distintos grupos funcionales y su desplazamiento químico relativo en ppm.....	8
Figura 1.6. Representación esquemática de una señal de un espectro de RMN.....	9
Figura 1.7. Señal de un espectro de resonancia magnética mostrando la altura de la señal y del ruido.....	10
Figura 1.8. Esquema del origen de la multiplicidad de señal en un caso sencillo.....	11
Figura 1.9. Gráfico que representa la recuperación de la magnetización longitudinal de una sustancia a lo largo del tiempo.....	12
Figura 1.10. Gráfico que representa la pérdida de magnetización transversal en función del tiempo.....	13
Figura 1.11. Imágenes 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 y un corte en el plano axial.....	15
Figura 1.12. Espectro realizado con la secuencia PRESS a tiempo de TE corto (30 ms) de un cerebro humano de paciente voluntario sano (sin patología cerebral conocida) tomado del proyecto INTERPRET.....	16
Figura 1.13 “Angulo Mágico” formado dentro de la sonda HRMAS.....	19
Figura 1.14. Espectro de HRMAS de tejido de próstata adquirido a 14,1T (6000 Hz) con la secuencia pulso y adquisición a diferentes velocidades de rotación (a) 250 Hz, (b) 300 Hz y (c) 350 Hz.....	20
Figura 1.15. Sonda HRMAS que se utiliza dentro del imán del espectrómetro de RMN.....	21
Figura 1.16. Esquema de la progresión tumoral.....	24
Figura 1.17. Estimación de la incidencia y mortalidad debido a cáncer cerebral y del sistema nervioso central en adultos de ambos sexos en Europa en el año 2012.....	28
Figura 1.18. Imágenes por RM en plano axial de un mismo paciente diagnosticado de GBM.....	31
Figura 1.19 Campos histológicos típicos de un GBM.....	31
Figura 1.20. 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) en un GBM.....	33
Figura 1.21. Ejemplo de la comparación de la resolución mejorada en espectroscopía HRMAS adquirido con la secuencia pulso y adquisición a temperatura de 0° C (A), con respecto a ERM <i>in vivo</i> adquirida a 30ms (B) de un caso pediátrico de meduloblastoma. La IRM (C) nos muestra la localización anatómica de tumor.....	34
Figura 1.22. Espectro HRMAS de un tejido de cerebro de ratón normal,	

adquirido a 37° C y 9,4T con la secuencia de pulso y adquisición y una velocidad de giro de 6 kHz. (a) Espectro obtenido de tejido cerebral de ratón sacrificado por irradiación de microondas focalizadas y (b) de un ratón sacrificado por sobredosis de anestesia.....	38
Figura 1.23 Pantalla de la DSS v.3.0.1 de INTERPRET donde se muestra un ejemplo de clasificación de un espectro de GBM.....	40
Figura 1.24. Esquema de los pasos que se realizan para el uso del sistema de reconocimiento de patrones basado en <i>SpectraClassifier</i>	42
Figura 1.25. Diferentes pantallas del SC.	43
Figura 3.1 Imagen general del sistema estereotáctico de inyección utilizado para inocular células GL261 en el estriado de los ratones C57BL/6.....	55
Figura 3.2 A) El aparato de microondas focalizadas <i>Muromachi microwave fixation system</i> 5kw. B) Baño de agua re-circulante HAAKE DC10-K15. C) <i>Water – Jacketed mouse holder</i> , Muromachi, Kikai Co. LTD. Tokyo. D) Colocación del soporte dentro de la cámara de irradiación.	56
Figura 3.3 Esquema del posicionamiento correcto de la biopsia dentro del tubo criogénico.....	58
Figura 3.4 Esquema y fotos del rotor de HRMAS BL4 ZrO ₂ y sus accesorios para el análisis de muestras por espectroscopía de HRMAS.	61
Figura 3.5. Comparación de varios espectros obtenidos en el proceso de ajuste del ángulo mágico hasta llegar al óptimo	62
Figura 3.6. Ejemplo de una matriz de confusión	70
Figura 3.7. Esquema del desarrollo de clasificadores utilizando muestras irradiadas (FMW) y no irradiadas por FMW (N-FMW).	75
Figura 4.1. Espectro de ⁷⁹ Br, bromuro de potasio (KBr) sólido utilizado para el ajuste del ángulo mágico.....	79
Figura 4.2 Espectro de KBr utilizado para el ajuste del ángulo mágico realizado por (A) Hebrew University of Jerusalem y (B) el fabricante del espectrómetro de RMN.....	80
Figura 4.3. Espectros de calibración de la temperatura en el rotor HRMAS con etilenglicol y metanol.....	81
Figura 4.4. Gráficas representando la correlación entre la temperatura ajustada en el controlador de temperatura del espectrómetro de RMN para la sonda de HRMAS y la temperatura real.....	82
Figura 4.5. Espectros promedio ± SD de las muestras de tejido cerebral de ratones obtenidos a 37° C por HRMAS con algunas asignaciones de los principales metabolitos de interés.....	85
Figura 4.6. IRM <i>in vivo</i> ponderadas en T ₂ en plano axial del cerebro de una rata adquirida a 7T. Se muestra el tamaño del daño a un 1 día y 7 días post isquemia.....	87
Figura 4.7. Espectros promedio HRMAS ±SD de muestras de tejido cerebral de rata con infarto sacrificada por irradiación de FMW obtenidos a 37° C por HRMAS a 9,4T con algunas asignaciones de metabolitos de interés.....	88
Figura 4.8. Espectro promedio HRMAS ± SD de la zona contralateral de tejido cerebral de rata sacrificada por FMW. Se observa la presencia de PCr y Cr bien resueltos en el espectro de HRMAS.	89
Figura 4.9. IRM ponderadas en T ₂ adquiridas a 7T de tumores GL261 a día 15 de post inoculación de células.....	90
Figura 4.10. Espectro HRMAS adquirido de una muestra de tumor murino GL261. El espectro en negro corresponde a la primera adquisición en esta	

serie experimental (t = 34min) y el espectro en rojo corresponde a la última adquisición (t = 374min).....	91
Figura 4.11. Espectros HRMAS de muestras de tumor GL261 irradiadas con FMW y adquiridas a 37° C.	93
Figura 4.12. Gráficas relativas a los experimentos de HRMAS a 37° C a lo largo del tiempo, representándose los valores de las intensidades.....	97
Figura 4.13. Preparación histopatológica de 4 μm post HRMAS de muestras de tumor GL261.....	99
Figura 4.14. Espectros HRMAS adquiridos de diferentes muestras de tumor GL261.....	101
Figura 4.15. IRM ponderada en T ₂ del corte coronal de un tumor GL261 a 15 días de evolución.....	101
Figura 4.16. Espectros HRMAS adquiridos de una muestra de tumor murino GL261 correspondientes al centro y la periferia de dicho tumor.....	102
Figura 4.17. Expansión entre 3,30 ppm y 3,15 ppm de espectros de HRMAS representativos de muestras de tumores de ratones sacrificados por FMW y sobredosis de anestesia. Se muestran la periferia y el centro de dichos tumores.....	103
Figura 4.18. <i>Boxplots</i> de las alturas normalizadas a <i>unit length</i> calculadas para los metabolitos seleccionados en tumores GL261 de ratones sacrificados por sobredosis de anestesia y por FMW después de su análisis por HRMAS.....	104
Figura 4.19. Microscopía electrónica de muestras de tumor GL261 de ratón post HRMAS.	106
Figura 4.20. Patrones de HRMAS típicos obtenidos con la de secuencia pulso y adquisición en un glioblastoma y un meningioma a 2° C y 37° C con las asignaciones tentativas de los metabolitos de interés.....	107
Figura 4.21. Espacio latente resultado de la discriminación entre GBM y M, desarrollado mediante el sistema SC para comprobar la reproducibilidad del clasificador obtenido en estudios previos de nuestro grupo.....	108
Figura 4.22. Gráficas representando el porcentaje de acierto para el conjunto de entrenamiento y de testeo y el BER para la determinación de los posibles efectos discriminatorios a diferentes temperaturas, secuencias de adquisición y aumento en la población de casos.	110
Figura 4.23 Espectros HRMAS promedio de cada clase ±SD (GBM y M) visualizados con el programa SC (clasificador 2)	112
Figura 4.24. Espacio latente generado por el análisis LDA de los conjuntos de entrenamiento y testeo para los clasificadores desarrollados con el programa SC para la determinación de los posibles efectos discriminatorios a diferentes temperaturas, secuencias de adquisición y aumento en la población de casos.	113
Figura 4.25 Ejemplo de un espectro de HRMAS de GBM adquirido a 2° C a 11,7 T descartado en el control de calidad por resonancias extrañas, patrón espectral artefactual y anómalo.	114
Figura 4.26 Espacio latente resultado de la discriminación entre GBM y M desarrollado con el SC. A) Antes del filtrado de casos por aplicación del control de calidad y B) El mismo espacio latente obtenido después del filtrado de casos, con una codificación de colores que permite identificar los casos descartados.....	115
Figura 4.27 Espectros HRMAS promedio de cada clase ± SD (GBM y M) visualizados con el programa <i>SpectraClassifier</i> (clasificador 3)	117
Figura 4.28. Gráficas representando el porcentaje de acierto para el conjunto	

de entrenamiento y de testeo y el BER para la determinación de los posibles efectos discriminatorios a diferentes temperaturas, secuencias de adquisición con control de calidad.....	118
Figura 4.29 Espacio latente generado por el análisis LDA de los conjuntos de entrenamiento y testeo para los clasificadores desarrollados con el programa SC para la determinación de los posibles efectos discriminatorios a diferentes temperaturas, secuencias de adquisición con control de calidad.....	119
Figura 4.30 Casos clasificados erróneamente por los clasificadores desarrollados en el clasificador 3.....	120
Figura 4.31 Espectros HRMAS promedio de cada clase \pm SD (GBM y M) visualizados con el programa SC (clasificador 4)	122
Figura 4.32 Gráficas representando el porcentaje de acierto para el conjunto de entrenamiento y de testeo y el BER para la determinación de los posibles efectos discriminatorios a diferentes temperaturas, secuencias de adquisición y aumento en la población de casos FMW y N-FMW.....	124
Figura 4.33 Espacio latente generado por el análisis LDA del conjunto de entrenamiento y testeo de los clasificadores desarrollados con el programa SC para la determinación de los posibles efectos discriminatorios de muestras FMW y N-FMM.....	125
Figura 4.34 Espectros adquiridos a 9,4T y temperatura de 37° C de casos clasificados erróneamente por el sistema en los clasificadores del estudio 4....	125

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1.1. Relación entre la diferencia de energía entre estados del espín.....	6
Ecuación 1.2. Desplazamiento químico.....	8
Ecuación 1.3. Valor de las interacciones dipolares entre nucleo 1 y 2.....	19
Ecuación 3.1. Calibración de la temperatura para etilenglicol.....	63
Ecuación 3.2. Calibración de la temperatura para metanol.....	63
Ecuación 3.3. Normalización a <i>unit lenght</i> (UL2).....	66
Ecuación 3.4. <i>Balanced error rate</i> (BER).....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Metabolitos detectables en cerebro normal y en tumores cerebrales, su abreviatura, desplazamiento químico y multiplicidad.....	17
Tabla 3.1. Número de casos incluidos en el desarrollo del clasificador de reproducibilidad de estudios previos en el grupo mediante el programa <i>SpectraClassifier</i>	73
Tabla 3.2. Número de casos incluidos en el proceso de obtención de clasificadores desarrollados con distintas temperaturas y secuencias de adquisición.....	73
Tabla 3.3. Número de casos incluidos en el proceso de obtención de clasificadores desarrollados con la validación previa mediante diagnóstico post HRMAS y control de calidad.....	74
Tabla 3.4. Número de casos incluidos en el desarrollo de los clasificadores de biopsias cerebrales humanas con y sin irradiación de FMW.	75
Tabla 4.1. Cálculo del área normalizada a ML (0,9 ppm) \pm SD de las principales resonancias de metabolitos de interés en espectros de ambos grupos: sacrificados por irradiación de FMW y sacrificados por sobredosis de anestesia.....	84
Tabla 4.2. Factor de cambio observado (calculado por cocientes de alturas normalizadas a <i>unit length</i>), para la comparación de la variación a través del tiempo de adquisición a 37° C de espectros HRMAS de muestras irradiadas (FMW) y no irradiadas FMW (N-FMW)	98
Tabla 4.3. Factor de cambio observado (calculado con los cocientes de integración) para la comparación de la variación a través del tiempo de adquisición a 37° C de espectros HRMAS de muestras irradiadas (FMW) y no irradiadas FMW (N-FMW)	98
Tabla 4.4. Resultados del test estadístico t de Student para la comparación entre sacrificio por sobredosis de anestesia y por irradiación de FMW, teniendo en cuenta la zona de procedencia del tumor.	104
Tabla 4.5. Resultado del número de núcleos y autofagosomas observados en microscopía electrónica para una muestra de tumor glial GL261. Intensidad correspondiente a PtdCho.....	105
Tabla 4.6. Resumen de los resultados obtenidos con el desarrollo de clasificadores con distintas secuencias y temperaturas de adquisición.....	111
Tabla 4.7 Total de casos de “máxima calidad” utilizados en las clases GBM y M antes y después del filtro de control de calidad.....	115
Tabla 4.8. Resumen de los resultados obtenidos con el desarrollo de clasificadores con diferentes secuencias y temperaturas de adquisición después del filtrado de casos por control de calidad.....	117
Tabla 4.9. Resumen de los resultados obtenidos con el desarrollo de clasificadores para comprobar los posibles efectos discriminatorios en biopsias cerebrales humanas con y sin irradiación de FMW.	122

ABREVIATURAS

Ala	Alanina
ASCII	<i>American Standard Code for Information Interchange</i>
BER	<i>Balanced error rate</i>
CBATEG	<i>Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica de la UAB</i>
ChCCp	Compuestos que contienen el grupo trimetilamino de la colina
Cho	Colina
Cr	Creatina
DSC	<i>Discriminant score</i>
DSS	<i>Decision Support System</i>
ERM	Espectroscopía por resonancia magnética
FID	<i>Free induction decay</i>
FMW	Focused Microwave
GABA	ácido γ -amino butírico
GABRMN	Grupo de aplicaciones biomédicas de la resonancia magnética nuclear
GBM	Glioblastoma multiforme
GEM	<i>Genetically engineered mice</i>
Glu	Glutamato
Glx	Glutamato + Glutamina
Gly	Glicina
GPC	Glicerofosfolina
HE	Hematoxilina-eosina
HRMAS	<i>High resolution magic angle spinning</i>
IDH1	<i>Isocitrate dehydrogenase 1</i>
IRM	Imagen por resonancia magnética
Lac	Lactato
LDA	Análisis discriminante lineal

LOO	<i>Leave one out</i>
M	Meningioma
MA	Meningioma atípico
MAS	<i>Magic Angle Spinning</i>
MF	Meningioma Fibroso
ml	Mio-inositol
ML	Lípids móbiles
ML_A	Lípids móbiles apoptóticos
MM	Meningioma meningiotelial
MP	Meningioma Psamomatoso
MT	Meningioma transicional
NAA	N-acetil aspartato
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
OAS	Oligoastrocitoma
ODG	Oligodendroglioma
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PCB	<i>Parc Científic de Barcelona</i>
PCho	Fosfocolina
PRESS	<i>Point resolved spectroscopy sequence</i>
ppm	partes por millón
PtdCho	Fosfatidilcolina
RAM	<i>Random access memory</i>
RF	Radiofrecuencia
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
RPMI	<i>Medio Roswell Park Memorial Institute</i>
SeRMN UAB	<i>Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la UAB</i>
SC	<i>SpectraClassifier</i>

SFFS	<i>Sequential forward feature selection</i>
SNC	Sistema nervioso central
SNR	<i>Signal to noise ratio</i>
SSB	<i>Spinning Side Bands</i>
SV	<i>Single voxel</i>
Tau	Taurina
TE	Tiempo de eco
TF	Transformada de Fourier
TR	Tiempo de reciclaje
UAB	<i>Universitat Autònoma de Barcelona</i>
Val	Valina
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia breve y evolución de la resonancia magnética nuclear (RMN)

El fenómeno de la resonancia magnética nuclear (RMN) fue descrito por Isidor Rabi en sustancias gaseosas en 1938 [1], pero no fue hasta 1945, que dos grupos trabajando independientemente, uno de ellos dirigido por E.M. Purcell (Universidad de Harvard, Massachusetts), y el otro dirigido por Felix Bloch (Universidad de Stanford, California), aplicaron la técnica de resonancia magnética nuclear en líquidos y sólidos, compartiendo el Premio Nobel de física en 1952. A partir de esos años y hasta los años 80 del siglo pasado se observó una fuerte evolución de la técnica y actualmente la RMN es ampliamente utilizada como método no invasivo de obtención de imágenes clínicas y para el estudio del metabolismo [2]. En el año 2003 se otorgó el Premio Nobel de fisiología y medicina a Paul C. Lauterbur y Peter Mansfield por los descubrimientos hechos en el campo de la IRM reforzando así la importancia de esta técnica y su evolución a lo largo de los últimos años.

La RMN es una rama de la espectroscopía que trabaja en la región del espectro de frecuencias comprendida entre 10^7 y 10^9 Hz (zona de radiofrecuencias) como se muestra en la figura 1.1. La radiación electromagnética de radiofrecuencia penetra en los tejidos debido a que longitud de onda evita pérdidas de dispersión (*scattering*) [3]. Además, la radiación electromagnética que utiliza la RMN no tiene un efecto ionizante debido a su bajo contenido energético.

Esta técnica permite observar el fenómeno de la resonancia (ver también sección 1.1.1) con diferentes núcleos, obteniendo en cuanto al sistema biológico interrogado diferente tipo de información de cada uno de ellos:

- ^{31}P – asociado al metabolismo energético.
- ^1H – presente en la mayoría de muestras biológicas.
- ^{13}C – poco abundante pero permite marcar moléculas con éste isótopo y hacer un seguimiento de las mismas.
- ^{19}F – permite el seguimiento de determinados fármacos de interés.

- ^{23}Na , ^{17}O , ^{39}K – menos usados pero de interés para determinadas aplicaciones como por ejemplo para obtener información diferencial de las concentraciones de potasio y sodio intra y extra celulares.

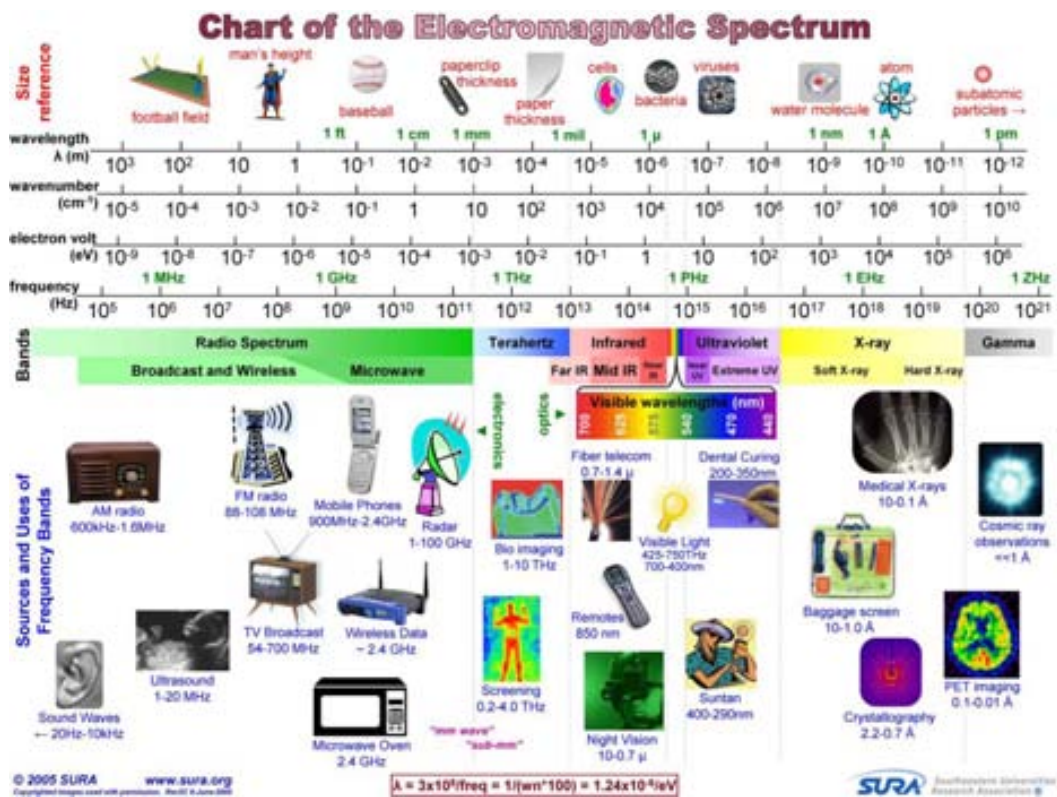


Figura 1.1. Espectro electromagnético. La RMN actúa en la zona de radiofrecuencia. Tomada de <http://www.sura.org/commercialization/terahertz.html>

1.1.1 El fenómeno de la resonancia

La resonancia magnética nuclear es un fenómeno físico basado en las propiedades magnéticas que poseen muchos núcleos atómicos. El uso de un campo magnético externo permite alinear los momentos magnéticos de los diferentes núcleos en la dirección del campo. La respuesta a este campo externo depende del tipo de núcleos que conforman la muestra a estudiar. Todos los núcleos que contienen un número impar de protones y neutrones tienen un momento magnético “ μ ” y un momento angular. De ésta forma, si una muestra conteniendo un tipo de núcleo con estas características se somete a un campo magnético (B_0) constante (figura 1.2), sus momentos magnéticos nucleares

individuales se alinearán principalmente a la dirección quasi paralela y en el mismo sentido a dicho campo. Además debido a las características mencionadas arriba, presentarán un movimiento de rotación sobre su propio eje y de rotación alrededor del eje principal del campo magnético externo, B_0 (figura 1.3).

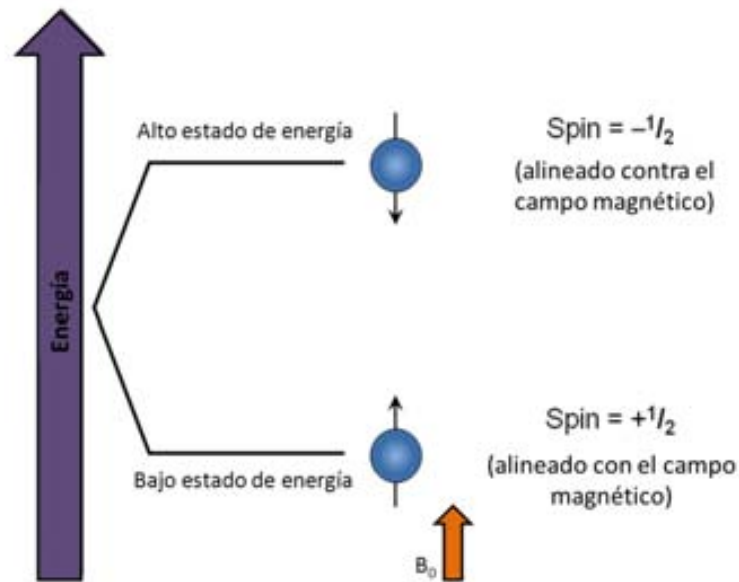


Figura 1.2. Alineamiento de los momentos magnéticos, de los núcleos con espín $\frac{1}{2}$ con el campo magnético externo B_0 en sus dos orientaciones posibles: paralela o anti paralela. Adaptada de <http://cnx.org/content/m43551/latest/>

En el caso de los núcleos de mayor interés biomédico, como el ^1H (espín $\frac{1}{2}$), dos orientaciones serán posibles. Por una parte, el campo magnético y el momento magnético pueden apuntar en la misma dirección, configuración que tendrá una energía mínima y será la predominante en situación de equilibrio termodinámico. Por la otra, ambos vectores pueden apuntar en direcciones opuestas, caso en el que la energía será ligeramente superior. La diferencia de energía entre estos estados se expresa según la ecuación 1.1, donde " γ " es la constante giromagnética (dependiente del núcleo que observemos), " h " es la constante de Planck, " B_0 " el campo magnético del imán, " ν " la frecuencia de Larmor (llamada también de resonancia) y " ω " la velocidad angular de giro de los momentos magnéticos (ver figura 1.3 (a)) alrededor del vector del campo magnético principal, B_0 .

$$\Delta E = h\nu = h \frac{\omega}{2\pi} = h \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

Ecuación 1.1. Relación entre la diferencia de energía entre estados del espín.

Ambos niveles estarán poblados según las leyes del equilibrio térmico. La diferencia de energía entre ellos es proporcional a la magnitud del campo magnético y está directamente relacionada con la frecuencia de Larmor o precesión del momento magnético del núcleo considerado. Se observa un ligero predominio en la orientación de menor energía, resultando una magnetización neta en este sentido ((figura 1.3)(b))..

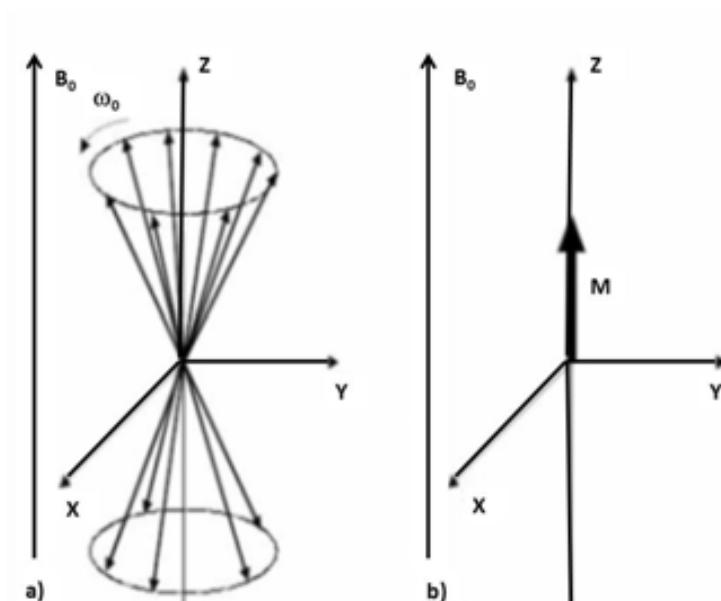


Figura 1.3. Modelo simplificado de la magnetización microscópica (a) de los núcleos como vectores individuales precesionando alrededor de \$B_0\$ y macroscópica (\$M\$) en (b) resultante de la suma de los diferentes vectores individuales.

Si un núcleo es perturbado mediante irradiación con la radiofrecuencia apropiada (frecuencia de Larmor), se producirá un fenómeno de resonancia; los núcleos que ocupan un estado de energía inferior absorberán dicha energía y se excitarán, saltando al estado de energía superior. Cuando cese el pulso de radiofrecuencia los núcleos volverán (se “relajarán”) a su estado inicial. El tiempo hasta el retorno a esta posición inicial es gobernado por el tiempo de relajación (ver 1.1.2.2). Las bobinas receptoras detectan la precesión de la magnetización

macroscópica de la muestra durante el período de relajación en forma de una corriente alterna inducida en ellas. Esta variación de intensidad de corriente se llama *free induction decay* (FID) y es una función exponencial decreciente (intensidad vs. tiempo). La transformada de Fourier permite transformar esta información al dominio de frecuencias (figura 1.4).

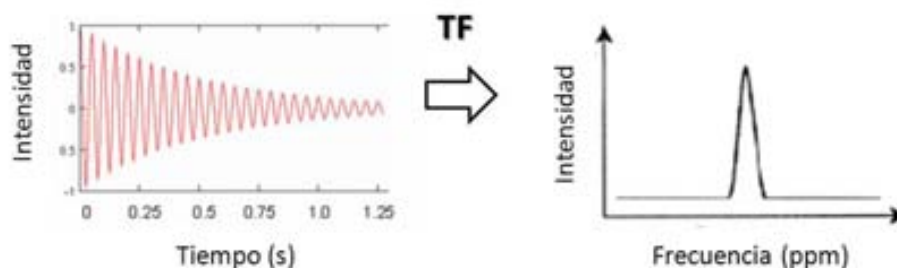


Figura 1.4. Obtención de un espectro (a la derecha) desde la FID (a la izquierda) utilizando la Transformada de Fourier (TF).

1.1.2 Parámetros básicos en RMN

1.1.2.1 Parámetros espectrales

Desplazamiento químico

El desplazamiento químico es la posición que ocupa una señal concreta en el espectro (figura 1.5). Cada núcleo tiene una frecuencia de resonancia concreta, y esto determina su posición en el espectro de RMN. Así, el desplazamiento químico de un núcleo en concreto dependerá básicamente del tipo núcleo y del entorno químico en que se encuentra dicho núcleo (ver ejemplo en la figura 1.5). Esta frecuencia absoluta (en Hz) varía según el campo magnético usado. Para hacer comparables los espectros adquiridos a diferentes campos magnéticos, el desplazamiento químico relativo (δ) se expresa como partes por millón (ppm) en relación a una frecuencia de referencia (ecuación 1.2).

$$\delta = \frac{\nu_s - \nu_R}{\nu_R} \times 10^6 \quad \text{Ecuación 1.2. Desplazamiento químico}$$

Donde ν_s es la frecuencia de resonancia en Hz del núcleo de la molécula de interés en el campo magnético (B_0), y ν_R es la frecuencia de una sustancia concreta de referencia a la que se asigna un determinado valor (p.e 0 ppm).

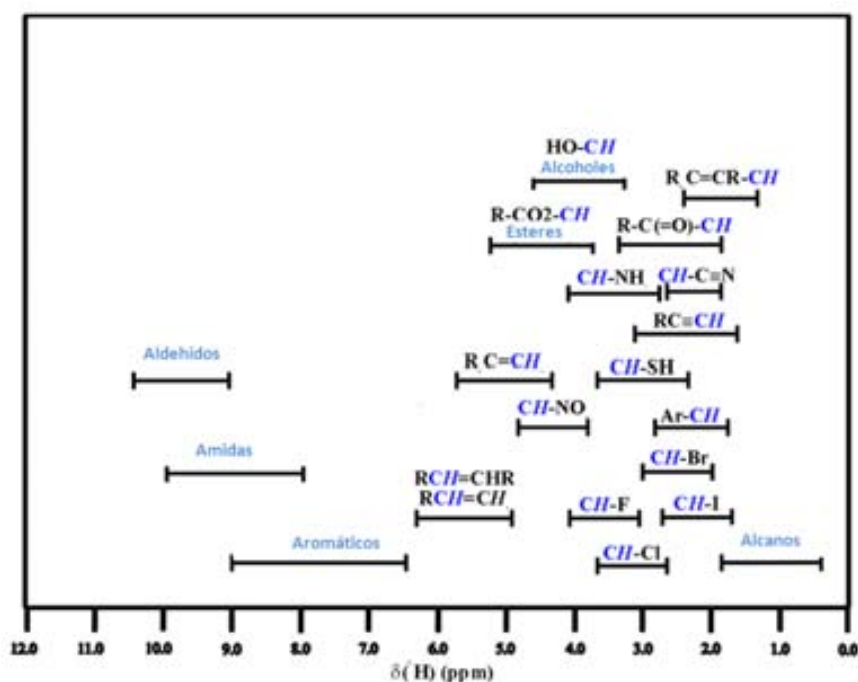


Figura 1.5. Posición de distintos grupos funcionales (en azul) y su desplazamiento químico relativo en ppm. Adaptada de [4].

Intensidad de la señal y cociente señal ruido

La intensidad de señal se refiere al área bajo la curva de dicha señal y está directamente relacionada con la concentración de núcleos que la generan. La anchura de la señal a la mitad de la altura de ésta nos proporciona una idea de las condiciones en las que se ha adquirido un espectro. Por ejemplo, cuanto más estrecha sea la anchura de la señal, mejor será la homogeneidad de la muestra en la adquisición, es decir, será un espectro de mejor calidad (figura 1.6). Este parámetro puede optimizarse experimentalmente, mejorando la homogeneidad del

campo magnético sobre la muestra con el “shimming”, pero debemos tener en cuenta que factores como la temperatura, la intensidad del campo magnético y el tiempo de relajación transversal (ver sección 1.1.2.2) también lo afectan directamente, y en el caso de la relajación transversal ésta puede variar entre tipos de moléculas de la misma muestra.

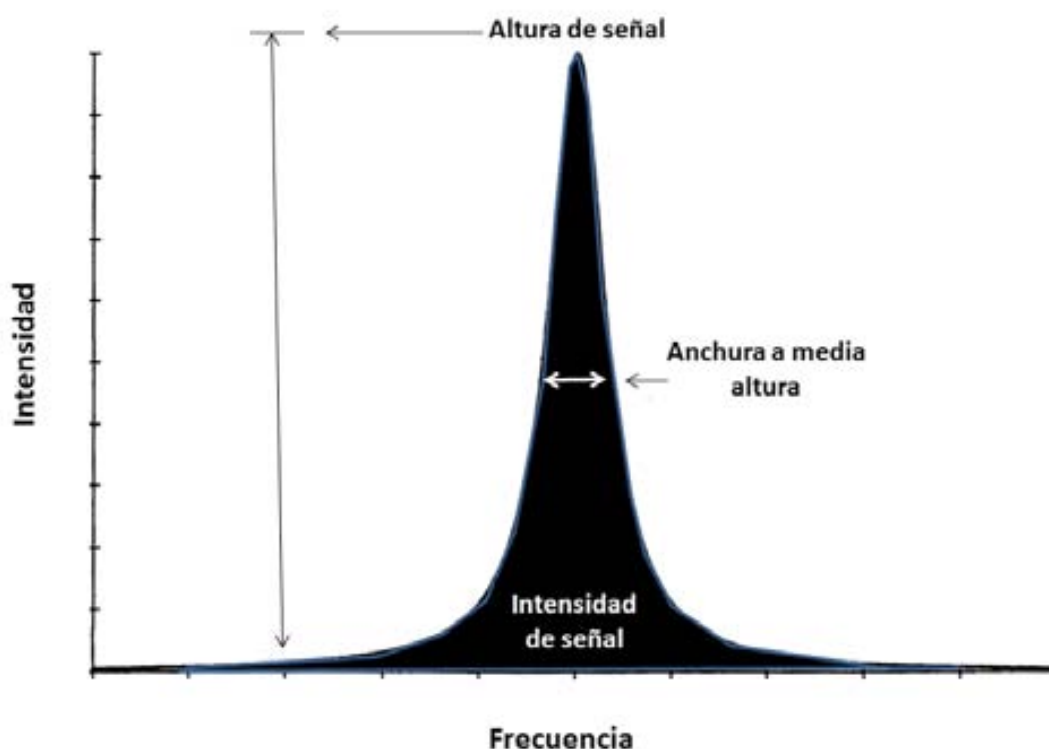


Figura 1.6. Representación esquemática de una señal de un espectro de RMN mostrando la altura, intensidad (\approx área en negro) y anchura a media altura de una señal. Adaptada de [5].

La señal detectada por RMN tiene muy poca intensidad en relación al ruido térmico y eléctrico generado durante la adquisición. 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. (ver una representación esquemática en la figura 1.7). 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 aumento del número (n) de registros.

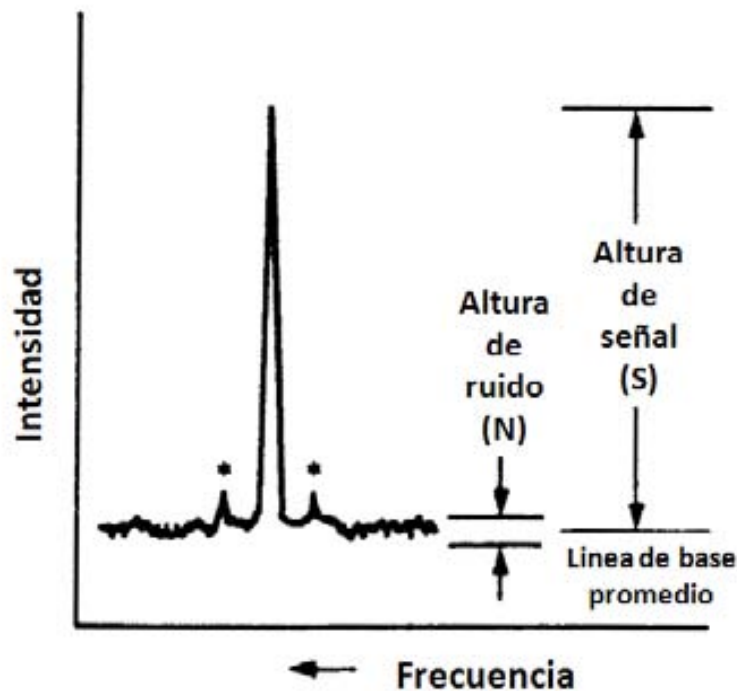


Figura 1.7. Señal de un espectro de resonancia magnética mostrando la altura de la señal y del ruido. Los asteriscos marcan, probablemente, "spinning side bands", y no son parte del ruido. Adaptada de [5].

Constante de acoplamiento

La forma (estructura fina) con la que aparece una señal en RMN puede verse alterada cuando un determinado núcleo interacciona con otros núcleos magnéticos en su entorno molecular más cercano (normalmente, hasta 3 enlaces). A este efecto se le denomina interacción espín - espín y se define como la influencia de espines vecinos en la multiplicidad de una determinada señal (figura 1.8).

La distancia entre señales de la resonancia de un núcleo y que surgen a resultas de la interacción con otro, es la medida de la magnitud con la que cada espín nuclear influencia al otro y se denomina constante de acoplamiento, cuyo símbolo es "J" y se mide en hertzios (Hz).

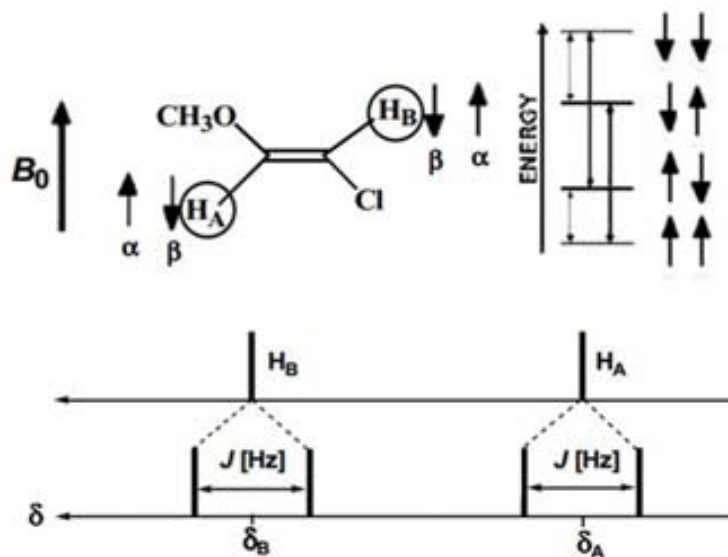


Figura 1.8. Esquema del origen de la multiplicidad de señal en un caso sencillo. Adaptada de http://web.uam.es/personal_pdi/ciencias/aurbano/determinacion_estructural/rmn/rmn_tema3.pdf.

Como se observa en la figura 1.8, debido a la presencia del campo magnético externo B_0 , cada uno de los protones A y B podrá estar en dos estados de espín diferentes α y β . El campo efectivo que va a sentir H_A va a ser diferente según H_B se encuentre en uno u otro estado de espín, por lo que H_A va a aparecer en dos desplazamientos distintos. Lo mismo ocurrirá con H_B . En términos energéticos, habrá 4 posibles transiciones electrónicas que darán lugar a 4 señales en el espectro, es decir cada señal se desdoblará en otras dos centradas alrededor del valor del desplazamiento químico original δ_B y δ_A y separadas por “J” Hz.

1.1.2.2 Tiempos de relajación

Una vez emitidos los pulsos de radiofrecuencia (RF) y excitados los núcleos de la muestra, se empiezan a producir procesos de relajación longitudinal y transversal descritos por las constantes de tiempo T_1 y T_2 , respectivamente. Los tiempos de relajación están fuertemente influenciados por el entorno químico en que se encuentra el núcleo [6] y también dependerán del campo magnético en el que se esté trabajando. Ambos tiempos de relajación se producen

simultáneamente, pero siempre T_2 será igual o inferior a T_1 . El resultado final es que la magnetización longitudinal crece a lo largo del eje Z (figura 1.3) hasta volver al valor inicial y mientras que la magnetización XY desaparece.

Tiempo de relajación longitudinal T_1

El tiempo de relajación longitudinal T_1 es la constante de velocidad con la que el sistema recupera la magnetización inicial después de un pulso de RF, que desplaza la magnetización del eje Z al eje XY. Dicha recuperación se observa gráficamente en la figura 1.9 y se ajusta a las ecuaciones a) o b) de dicha figura, según el caso. Puede visualizarse en la figura el valor de T_1 como el tiempo que corresponde a una recuperación del 63,2% de la magnetización longitudinal.

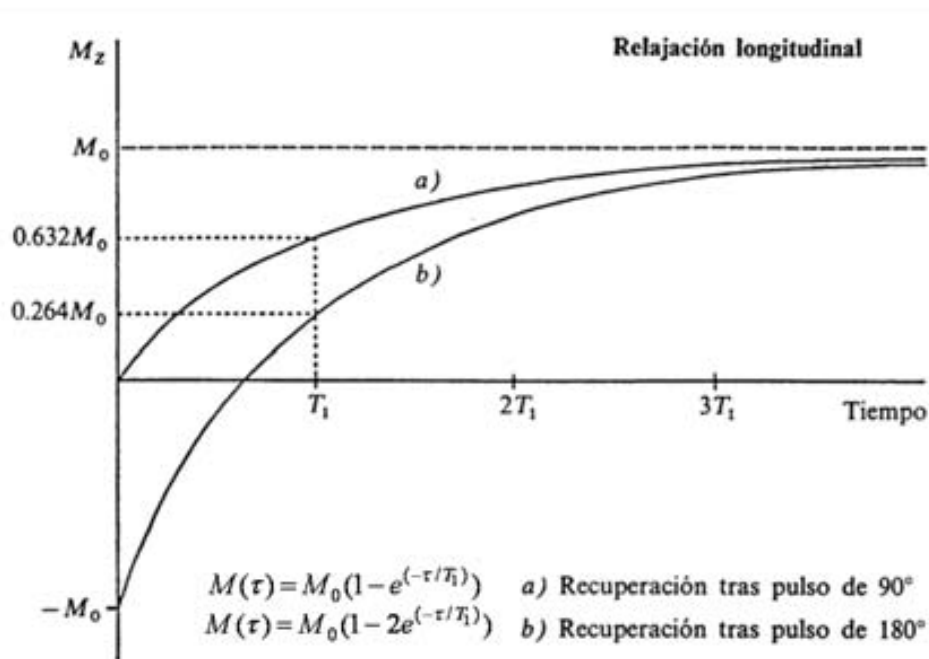


Figura 1.9. Gráfico que representa la recuperación de la magnetización longitudinal de una sustancia a lo largo del tiempo. El T_1 se ve representado como el punto temporal en el cual se ha recuperado el 63,2% de la magnetización longitudinal tras un pulso de excitación de 90° . Debajo del gráfico se muestran las fórmulas para calcular el T_1 tras la aplicación de un pulso de 90° (a) o de 180° (b), siendo $M(\tau)$ la magnetización longitudinal a un tiempo τ tras la aplicación de la RF de excitación y M_0 la magnetización inicial antes de aplicar dicho pulso.

Tiempo de relajación transversal T_2

El tiempo de relajación transversal T_2 se define como el tiempo que le lleva al sistema para que la magnetización transversal inicialmente producida por el pulso de excitación de la muestra en el plano XY decaiga hasta un 37% de su valor inicial. Es un valor propio de cada entorno molecular y muestra el tipo de función exponencial decreciente que puede visualizarse en la figura 1.10.

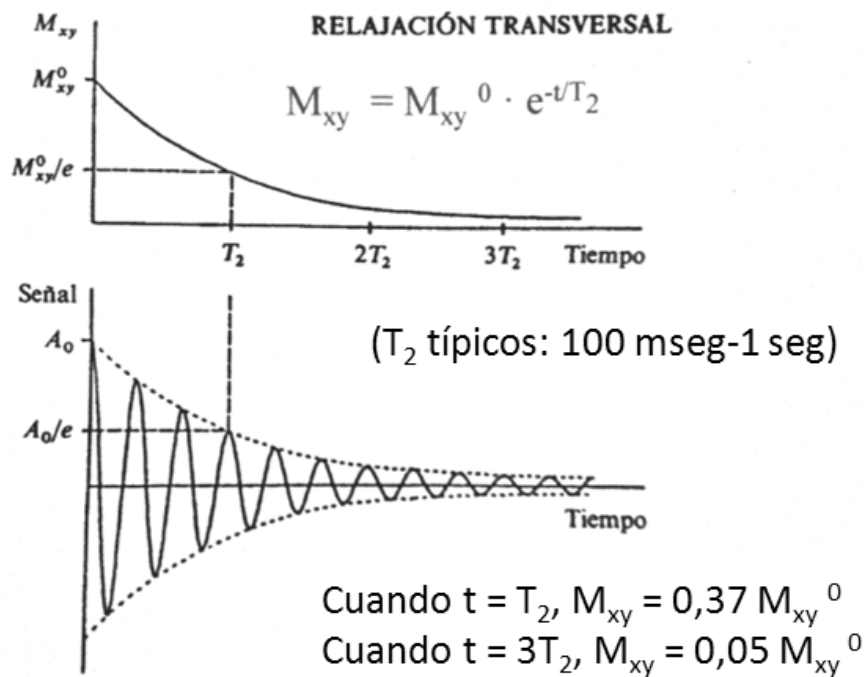


Figura 1.10. Gráfico que representa la pérdida de magnetización transversal en función del tiempo. El T_2 se representa como el punto temporal en el que sólo se detecta el 37% de la magnetización transversal inicial y sobre la primera gráfica se muestra la fórmula para calcularlo.

Es importante tener en cuenta los valores de T_2 ya que si el tiempo varía entre el pulso y la detección de la señal (variación del tiempo de eco), las señales con T_2 más corto pueden llegar a ser indetectables.

1.2 Aplicaciones biomédicas de la Imagen y Espectroscopía por RMN

La RMN presenta dos vertientes de estudio: por un lado la espectroscopía, quizá la más conocida en el campo de la química y la bioquímica, y por otro la imagen, más extendida en medicina y biomedicina [7]. Las aplicaciones biomédicas de la RMN comenzaron hacia 1972 cuando se siguió, por espectroscopía de carbono 13 (^{13}C), el metabolismo de la glucosa marcada con dicho isótopo, en una suspensión celular. En base a los resultados, se concluyó que esta técnica podía ser enormemente útil en el estudio de procesos bioquímicos. Por otro lado la espectroscopía de fósforo 31 (^{31}P) se utilizó para determinar el pH intracelular en una suspensión de eritrocitos y posteriormente en un músculo y casi simultáneamente se obtuvo la primera imagen de RMN [8].

La espectroscopía aporta información metabólica, mientras que la imagen aporta el referencial anatómico y, en combinación, pueden proporcionar información significativa sobre la composición de un tejido y la localización exacta de posibles cambios en dicha composición.

1.2.1 Imagen por resonancia magnética (IRM)

La imagen por resonancia magnética nuclear (IRM) del cuerpo humano está ampliamente difundida como método de diagnóstico no invasivo en los hospitales de los países desarrollados debido a su gran potencial en el análisis anatómico, como por ejemplo la detección de lesiones. Tiene un alto grado de diferenciación y detección de los distintos tejidos del cuerpo humano y una resolución espacial que no se compara con ninguna otra técnica actualmente disponible sobre todo para tejidos blandos [6].

El protón es el núcleo más utilizado en la IRM, principalmente por su abundancia en el cuerpo humano (en forma de agua) y, no menos importante, por su gran momento magnético (y, por ende, óptima intensidad de señal obtenida). La riqueza y detalle de la información obtenida por la IRM se debe al contraste intrínseco que se puede obtener con ella: zonas claras (hiperintensas) y las zonas oscuras (hipointensas), según los diferentes entornos biofísicos en que se encuentran los protones del agua y según los parámetros de adquisición utilizados.

Los factores importantes que determinan el contraste intrínseco de las imágenes por RMN son: T_1 , T_2 y la densidad protónica (concentración de agua esencialmente) en los tejidos de la muestra en estudio.

Dependiendo de la información que se desee obtener, hay diversidad de secuencias de pulsos para IRM, que se combinan de diferentes maneras: variando el tiempo de reciclaje (TR) (tiempo transcurrido entre los 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, la *free induction decay* (FID)). De esta forma se potencia el contraste intrínseco, seleccionando el parámetro en el que se va a ponderar la imagen obtenida. Por ejemplo, se dice que una imagen es ponderada en T_1 , cuando se potencian las diferencias entre los distintos tejidos debido a los valores de T_1 . Es un tipo de secuencia más sensible a los detalles anatómicos estándar. Una imagen ponderada en T_2 a su vez, es más sensible al contenido de agua y a la presencia de patología y potencia las diferencias de T_2 entre los distintos tejidos [9]. Ejemplos de imágenes ponderadas en T_1 , T_2 y densidad protónica se aprecian en la figura 1.11.

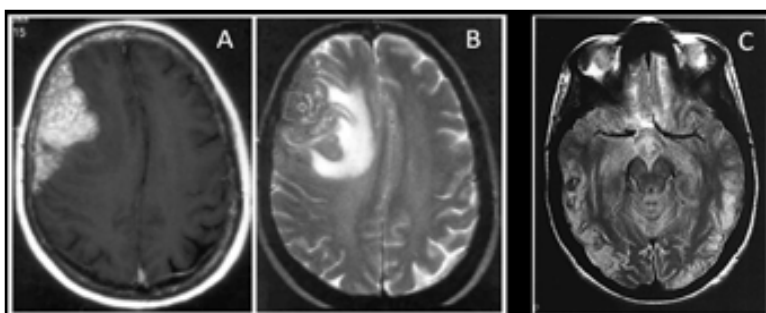


Figura 1.11. Las imágenes A y B, obtenidas a 1,5 T, muestran un corte en el plano axial del encéfalo de un paciente afectado por una metástasis en el lóbulo frontal derecho. Imagen ponderada en T_1 (A) post administración de contraste, imagen ponderada en T_2 (B) [10]. La figura C muestra un corte en el plano axial (a un nivel inferior que A y B) de un encéfalo normal, de una imagen ponderada en densidad protónica. Figura tomada de [11].

1.2.2 Espectroscopía por resonancia magnética (ERM)

Hoy en día, la espectroscopía está considerada como el método no invasivo que permite estudiar más adecuadamente el metabolismo de los seres vivos. Esta metodología puede determinar cualitativa y cuantitativamente una gran variedad de metabolitos en el tejido intacto, proporcionando una información extensa sobre su composición. Sin embargo, en el ámbito clínico la poca familiarización de los

profesionales con ésta técnica, su manejo e interpretación, ha limitado las aplicaciones diagnósticas de esta técnica a la neurooncología. Además, la utilización de campos magnéticos relativamente bajos en comparación con los campos disponibles para aplicaciones químicas, limita el número de metabolitos que se pueden identificar y la resolución obtenida (figura 1.12 y tabla 1.1). Muchas de estas limitaciones relativas a la resolución y la dispersión espectral se pueden superar si se realiza un estudio *in vitro* o *ex vivo*. Estas condiciones permiten emplear un campo magnético más alto en los análisis, lo que mejora notablemente la sensibilidad y resolución de la técnica, permitiendo distinguir un número superior de metabolitos. Si se usa un estándar adecuado también se puede obtener información cuantitativa. No obstante, se pierde la ventaja de la “no invasividad” de la ERM *in vivo*. Actualmente, muchos escáneres clínicos ya trabajan a 3T, lo que sin duda mejorará la detección y cuantificación de metabolitos *in vivo*.

En ERM se producen los mismos fenómenos descritos en la sección 1.1.1, es decir: excitación de núcleos ^1H de la muestra y detección de señal mientras éstos vuelven a su estado de equilibrio. Los parámetros que caracterizan cada señal en un espectro ERM incluyen la frecuencia de la resonancia (su desplazamiento químico), su intensidad y su anchura a media altura. Sin embargo, estos metabolitos están presentes en concentraciones relativamente bajas en comparación con el agua en el mismo tejido y por lo tanto, para este tipo de técnicas, es necesaria una presaturación selectiva sobre la señal del agua para disminuir la intensidad relativa de ésta. Por otro lado, los artefactos causados por la heterogeneidad del campo magnético o de la muestra son más evidentes a altos campos. Por lo tanto, un campo magnético homogéneo es indispensable para obtener un espectro de buena calidad.

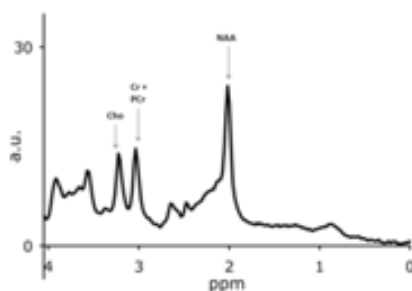


Figura 1.12. Espectro promedio realizado con la secuencia PRESS a tiempo de eco (TE) corto (30 ms) de cerebros humanos de voluntarios sanos (sin patología cerebral conocida) obtenido del proyecto INTERPRET. Figura tomada de [12].

Metabolito	Abreviatura	Desplazamiento químico (pm)	Multiplicidad
Lactato	Lac	1,35	Doblete
Alanina	Ala	1,47	Doblete
Acetato	Ac	1,92	Singlete
N-acetil aspartato	NAA	2,02	Singlete
Glutamato + Gutamina	Glx	2,10	Multiplete
Glutamato + Gutamina	Glx	2,14	Multiplete
Succinato	Succ	2,42	Singlete
Glutamina	Glx	2,46	Triplete
N-acetil aspartato	NAA	2,50	Doblete de dobletes
Creatina	Cr	3,03	Singlete
Colina	Cho	3,20	Singlete
Scyllo-inositol	sl	3,35	Singlete
Taurina	Tau	3,43	Triplete
Colina	Cho	3,52	Triplete
Myo-inositol	ml	3,55	Doblete de dobletes
Glicina	Gly	3,56	Singlete
Glutamato + Gutamina	Glx	3,77	Triplete
Glutamato + Gutamina	Glx	3,78	Triplete
Alanina	Ala	3,79	Cuadriplete
Creatina	Cr	3,93	Singlete

Tabla 1.1. Metabolitos principales detectables en cerebro normal y en tumores cerebrales, su abreviatura, desplazamiento químico y multiplicidad [13].

1.2.2.1 Espectroscopía de alta resolución utilizando la técnica de rotación en ángulo mágico (*High Resolution Magic Angle Spinning, HRMAS*)

La espectroscopía de alta resolución con giro en ángulo mágico, *High Resolution Magic Angle Spining* (HRMAS) se viene utilizando para estudiar muestras de tejido intacto *ex vivo* desde 1997. Los primeros estudios que la aplicaron al estudio de cáncer en humanos fueron el de Millis y col. y el de Cheng y col. [14,15]. Esta técnica posee un alto grado de reproducibilidad y su naturaleza no destructiva permite el estudio por microscopía de las muestras analizadas previamente por HRMAS y, por tanto, la comparación de datos espectroscópicos y morfológicos [16].

Andrew y col. [17] y Lowe y col. [18] describieron de manera independiente que la adquisición de espectros de RMN de una muestra sólida girando rápidamente (entre 4 y 6 kHz) en un ángulo de $54,7^\circ$ relativo al campo magnético principal (B_0), reduce la anchura de las señales detectadas en el espectro. Ello evita la pérdida de información causada por las interacciones dipolares, que son originadas por la heterogeneidad de la muestra y parámetros residuales anisotrópicos, que no pueden ser promediados por el movimiento Browniano en muestras sólidas tal como se observaría en una muestra líquida.

El espectro de RMN depende fuertemente del entorno microscópico de los núcleos investigados. Así, en las diferentes moléculas estudiadas podemos tener interacciones dipolares (entre dos núcleos con momento magnético), anisotropía de desplazamiento químico (entre núcleo y nube electrónica), y en caso de sólidos y semisólidos interacciones cuadrupolares. Si una muestra gira sobre su propio eje a altas velocidades manteniendo el ángulo mágico con B_0 (figura 1.13), las interacciones dipolo – dipolo se promedian resultando un valor de cero, es decir, se anulan (ver ecuación 1.3). Esto, desde un punto de vista práctico, lleva a la reducción de la anchura de banda efectiva de las resonancias de interés a valores comparables a los obtenidos con muestras líquidas.

$$B_{1 \rightarrow 2} = \left(\frac{\mu_1 \mu_0}{4\pi} \right) \times \frac{(3 \cos^2 \theta - 1)}{r^3}$$

Ecuación 1.3. Valor de las interacciones dipolares entre núcleos 1 y 2.

Siendo μ_0 = permeabilidad del vacío y μ_1 el momento magnético del núcleo 1.

Cuando $\theta = 54^\circ 74'$ (ángulo mágico), $3 \cos^2 \theta = 1$ y las interacciones dipolares del núcleo 1 sobre el 2 desaparecen.

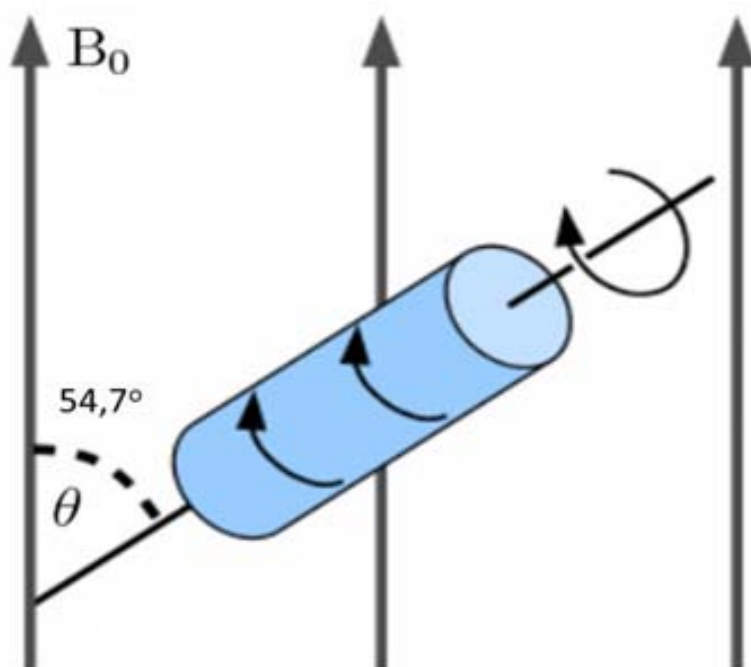


Figura 1.13 “Angulo Mágico” formado dentro de la sonda HRMAS entre la orientación de la turbina para el giro de la muestra alrededor del eje longitudinal de la turbina y el campo magnético principal (B_0).

En cambio, las interacciones debidas a la anisotropía del desplazamiento químico se promedian a un valor diferente a cero y la interacción cuadrupolar se promedia solo parcialmente dejando una interacción cuadrupolar residual secundaria. Así, en líquidos, las interacciones dipolares se promedian a cero gracias al rápido movimiento molecular de las moléculas en disolución que se produce. Este promedio a cero de las interacciones dipolares que se da en líquidos

es entonces “mimetizado” en sólidos y semisólidos por el uso de la técnica de *magic angle spinning* (MAS), con lo que se obtienen unas señales de anchura comparable a las de metabolitos en solución. Sin embargo, al girar la muestra en ángulo mágico se generan componentes de modulaciones a frecuencias correspondientes a la frecuencia de giro de la muestra y también de su múltiplo, conocidas como *Spinning Side Bands* (SSB), (figura 1.14) que pueden complicar la interpretación del patrón espectral si no se evita que aparezcan en el rango espectral de interés.

Una velocidad de giro moderada es suficiente para evitar efectos de ensanchamiento de señal y obtener espectros de alta resolución. Sin embargo, velocidades demasiado bajas pueden producir “SSB” de intensidad considerable en el rango de estudio que pueden enmascarar las señales de los metabolitos de interés. Por ello es importante determinar la velocidad óptima de giro (que depende del campo magnético externo) para evitar este problema [19] por ejemplo, una velocidad de giro de 3000 Hz para 9,4 T.

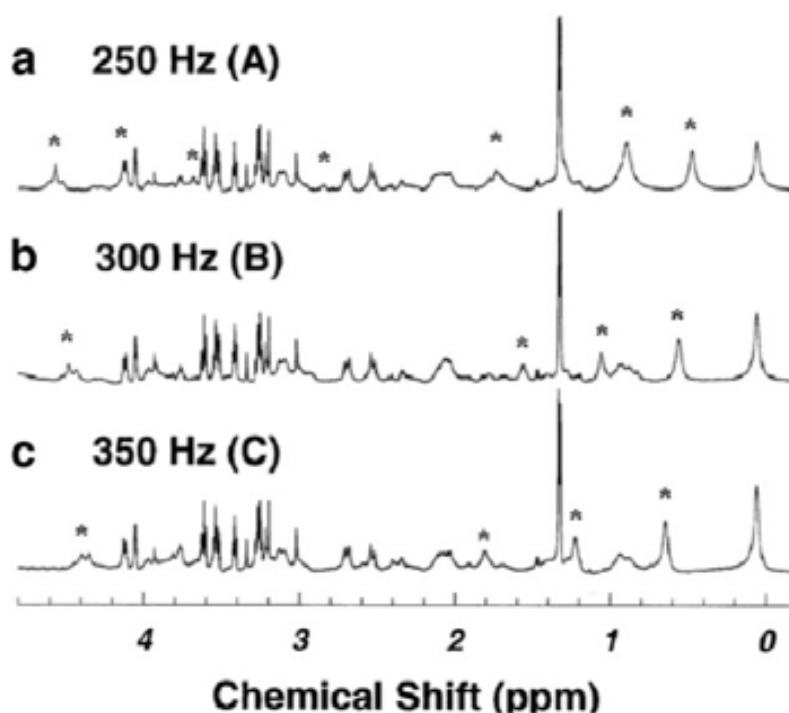


Figura 1.14. Espectro de HRMAS de tejido de próstata adquirido a 14,1T (6000 Hz) con la secuencia pulso y adquisición a diferentes velocidades de rotación (a) 250 Hz, (b) 300 Hz y (c) 350 Hz. Los asteriscos (*) muestran los *Spinning Side Bands* (SSB) del tejido y el estándar de silicona utilizado para referenciar a 0 ppm. Figura adaptada de [20].

La espectroscopía HRMAS consiste, entonces, en hacer girar una muestra a altas velocidades (1 – 15 KHz) en un ángulo de $54,7^\circ$ ($\cos^2\theta = 1/3$ ver ecuación 1.3 para más detalles), respecto a B_0 , llamado “Ángulo Mágico” (θ) (figura 1.13).

Las sondas HRMAS (figura 1.15) han sido diseñadas para realizar experimentos mientras gira la muestra en el llamado “ángulo mágico” y están ya doblemente (^1H y ^{13}C) o triplemente (^1H , ^{13}C y ^{15}N) sintonizadas a los rangos de frecuencias de interés. Éstas frecuencias de excitación/detección operan a través de una bobina solenoidal de transmisión/recepción localizada dentro de la turbina de giro de ángulo mágico.

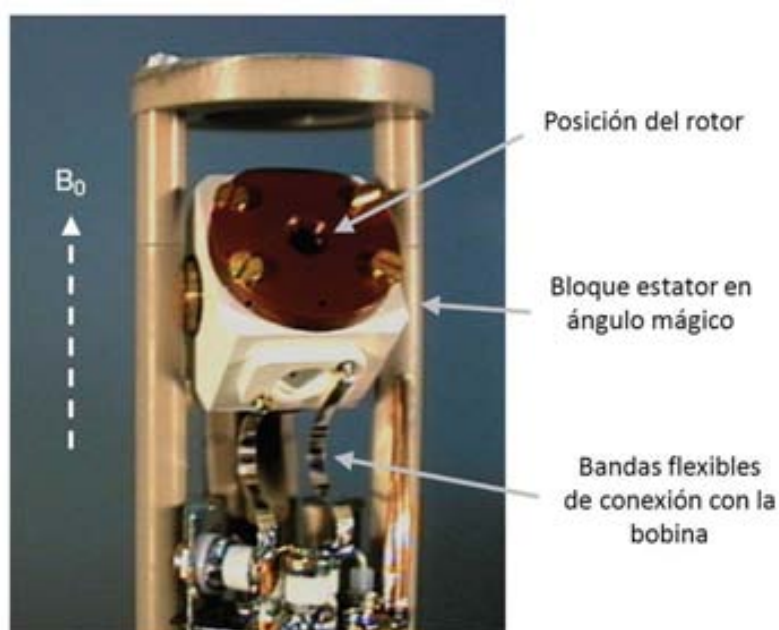


Figura 1.15. Sonda HRMAS que se utiliza dentro del imán del espectrómetro de RMN : El rotor que contiene la muestra se encuentra en el bloque estator inclinada en ángulo mágico de $54,7^\circ$ con respecto a B_0 . Figura adaptada de [21].

Diversos estudios en muestras de cerebro, próstata, mama y cáncer cervical han demostrado que la técnica de HRMAS es una herramienta importante en el diagnóstico y monitorización de la respuesta al tratamiento en el estudio del cáncer [22-25]. El tipo de información obtenido a partir del tejido tumoral estudiado con este método depende de los detalles del protocolo aplicado, desde la recolección y almacenamiento de la muestra hasta el post-procesamiento de los espectros adquiridos. El desarrollo tecnológico en la primera década de uso de la técnica ha

permitido la fabricación de mejores sondas, sistemas de control de temperatura más eficaces y rotores con nuevos diseños que permiten el análisis de muestras de tan solo 12 μ l de volumen [26]. La metodología de HRMAS sigue en constante optimización y cada vez se reconoce más el potencial de esta técnica como herramienta para estudios clínicos [16].

La técnica de HRMAS se lleva a cabo con una preparación sencilla de la muestra que evita el paso de extracción de los metabolitos (por ejemplo extractos con ácido perclórico para metabolitos solubles) aunque los experimentos de resonancia son prácticamente los mismos que se llevan a cabo con RMN de disoluciones. Los espectros obtenidos serían comparables a los adquiridos por ERM *in vivo* pero con mucha más resolución y sensibilidad.

Una de las ventajas de la técnica de HRMAS es que, al utilizar la muestra intacta, sin extracción previa, esta misma muestra se puede reutilizar para análisis posteriores, por ejemplo de histopatología, inmunohistoquímica, transcriptómica y proteómica. Estudios de anatomía patológica llevados a cabo con muestras provenientes de un análisis HRMAS [27] han demostrado que hay una correlación de los metabolitos presentes en tejidos con la apoptosis observada. Además, otros autores [28] han demostrado que no hubo alteración significativa de los resultados de estudios genómicos en muestras provenientes de un análisis de HRMAS. La espectroscopía de alta resolución *ex vivo* (con el uso de biopsias y tejidos) es usada también ampliamente para la ayuda en la interpretación de espectros *in vivo* de la muestra correspondiente [29].

Actualmente hay numerosos métodos para estimar la concentración de las señales de RMN. EL método más simple consiste en comparar las intensidades o áreas de las distintas señales. La cuantificación de los espectros HRMAS siempre ha sido un reto debido a las dificultades para encontrar un estándar adecuado y a la presencia de la superposición de algunas señales en los espectros aunque la resolución obtenida en los estudios de HRMAS es excelente. Estas dificultades llevan a realizar rutinas de post procesamiento manuales para el ajuste de las señales. Autores como Opstad y col. [27] y Valonen y col. [30] han descrito en sus

estudios el uso de agua y creatina como estándares internos para la cuantificación en muestras de tejido cerebral.

Otro método posible para la cuantificación de metabolitos en HRMAS es añadir a la muestra una solución como referencia externa, por ejemplo, el ácido trimetilsilil propiónico (TSP). Este compuesto ha sido usado como referencia para cuantificación en espectros de tejidos adquiridos por HRMAS [31,32] pero existen dudas acerca de su interacción con el tejido, debido a que puede unirse a algunos compuestos macromoleculares y volverse parcialmente invisible.

Distintos autores [33,34] han demostrado que los espectros HRMAS poseen características para realizar estudios sobre clasificación entre muestras de tejido tumoral y tejido normal, llevando esta técnica a ser considerada en algunos casos como una relevante herramienta clínica.

Para más detalles del desplazamiento químico de algunos de los principales metabolitos detectados por HRMAS, consultar anexo 1.

1.3 Neoplasias

Se denomina neoplasia a un grupo complejo de estados patológicos en los cuales las células presentan un crecimiento descontrolado y excesivo hasta invadir otros tejidos y órganos (figura 1.16). Generalmente, el término neoplasia se usa como sinónimo de tumor y éstos pueden ser de tipo maligno o benigno. Un tumor benigno es un tumor localizado, con una cápsula fibrosa, de crecimiento potencialmente limitado, forma regular y células bien diferenciadas. Este tipo de neoplasia no invade el tejido adyacente ni metastiza en órganos a distancia. Sólo causa daño por compresión y habitualmente no recurre después de la extirpación quirúrgica. Por otro lado, en un tumor maligno se encuentran células con anormalidades en su material cromosómico, que se multiplican sin control y pueden invadir los tejidos cercanos. Las células de neoplasias malignas también se pueden diseminar hasta otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo y el

sistema linfático, pudiendo reproducirse en otros órganos, dando lugar a la metástasis.

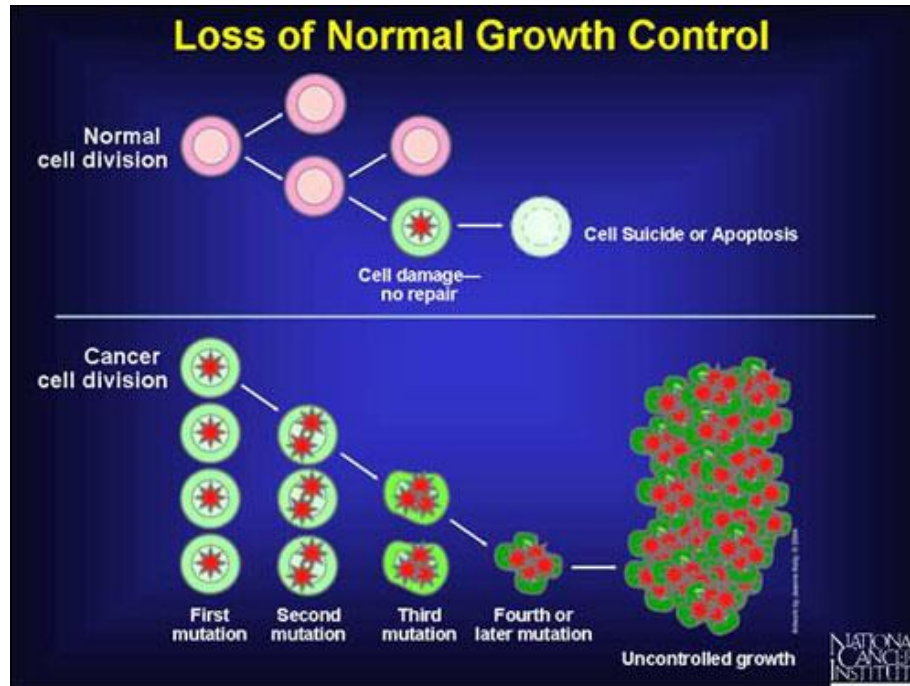


Figura 1.16. Esquema de la progresión tumoral (<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>).

1.3.1 Tumores cerebrales

Los tumores cerebrales se desarrollan dentro del sistema nervioso central (SNC) y pueden ser originados por células del mismo sistema nervioso, o bien tratarse de una metástasis con origen en un órgano distinto (por ejemplo: mama, pulmón). Sus grandes inconvenientes son el desarrollo dentro de un espacio cerrado y de difícil acceso (caja craneal) y también la proximidad a estructuras cerebrales vitales o que comprometan la locomoción, habla, equilibrio hormonal, en resumen la funcionalidad cerebral general.

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), pero a pesar de ello, constituyen una fuente importante de mortalidad y discapacidad [35].

No son por lo tanto los tumores de mayor incidencia en humanos, pero si son unos de los más relevantes cuando se consideran los años de vida perdidos [36] y por eso su diagnóstico y manejo son tan importantes.

Según Berstein y Berger [37], se ha producido un gran aumento de la incidencia y la mortalidad de los tumores cerebrales en países desarrollados en las últimas décadas, sobre todo en personas mayores. Probablemente sea porque determinados tipos de tumores cerebrales están ligados a la edad, así es posible que el aumento en la esperanza de vida tenga un peso importante en éste incremento. Por otra parte, la mejoría de los métodos de diagnóstico podría también haber contribuido a la mayor incidencia detectable.

1.3.1.1 Clasificación

Los tumores del sistema nervioso son siempre problemáticos, en general tienen mal pronóstico y requieren muchas veces tratamiento agresivo. Estos se pueden dividir en dos categorías: cáncer cerebral primario (se origina en células del sistema nervioso) y cáncer cerebral secundario o metastásico (proveniente de otras partes del cuerpo). 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 [37,38,35]. De ésta manera se conforma el sistema de clasificación actual:

- **Grado I (benigno):** Tumores con bajo potencial proliferativo, naturaleza difusa y posibilidad de cura mediante resección quirúrgica. Curación o supervivencia > 5 años.
- **Grado II (semi-benigno):** Tumores infiltrantes con bajo índice mitótico pero con potencial de recidiva. Algunos tienden a progresar hacia lesiones de alto grado. Supervivencia entre 3 y 5 años.

- **Grado III (maligno):** Evidencia histológica de malignidad generalmente en forma de actividad mitótica detectable, clara expresión de capacidad infiltrativa y anaplasia. Supervivencia entre 2 y 3 años.
- **Grado IV (altamente maligno):** Elevada actividad mitótica, necrosis y rápida evolución pre y post-operatoria. Supervivencia entre 6 y 15 meses.

De todos los tumores intracraneales primarios, la mayoría (60%) están originados por células gliales; el 28% derivan de las meninges y un 7,5% tienen localización en los nervios espinales y craneales. Los linfomas y tumores de líneas germinales constituyen aproximadamente un 4% y un 1% del total respectivamente [35].

Los tumores gliales son los más frecuentes, y se clasifican en diferentes grupos según el tipo celular que los origina, siendo los principales subgrupos astrocitomas (As, derivados de células precursoras de astrocitos), oligodendrogliomas (ODGs, derivados de células precursoras de oligodendrocitos) y oligoastrocitomas (OAs, tipo de tumor mixto derivado de células precursoras tanto de astrocitos como de oligodendrocitos).

El tipo predominante entre los gliomas es el astrocítico (A). Dentro de éste tipo, en general muy infiltrativo, también existen distintos grados de malignidad. La WHO describe los siguientes tipos de tumores astrocíticos cerebrales:

- **Astrocitoma Pilocítico (Grado I WHO)** es la neoplasia del sistema nervioso más frecuente en niños, estando localizado preferentemente en el cerebelo. Crece lentamente y tiene un pronóstico favorable.
- **Astrocitoma de bajo grado (difuso) (grado II WHO)** se presenta en adultos jóvenes, crece de manera difusa y en general no es totalmente extraíble por neurocirugía, tiende a progresar lentamente y tiene variantes de tipo fibrilar, protoplasmático y gemistocítico .

- **Astrocitoma anaplástico (grado III WHO)** evoluciona generalmente a partir de un astrocitoma de bajo grado, crece relativamente rápido y generalmente progresa a glioblastoma en 2 ó 3 años.
- **Glioblastoma (grado IV WHO)** es el tipo más frecuente de tumor maligno del sistema nervioso. Clínicamente se puede subdividir en secundario y primario (representando este último más del 80% de los casos). Se desarrolla sobre todo en personas de edad adulta (mayores de 55 años) con una supervivencia de cerca de un 1 año.

Actualmente, se conocen distintos perfiles transcriptómicos de glioblastomas como los proneurales, mesenquimatosos o proliferativos [39] que aunque histopatológicamente comparten características, contienen mutaciones y variantes genéticas distintas, mostrando alguno de ellos por ejemplo, el perfil proneural, una mutación específica en IDH1 [40].

Más detalles acerca del resto de tipos de tumores cerebrales humanos se pueden consultar en el anexo 2 [38].

1.3.1.2 Epidemiología y etiología

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) presentan una incidencia de alrededor de 7 casos para cada 100.000 habitantes y son responsables de aproximadamente 4 muertes por cada 100.00 habitantes en España (figura 1.17). Los niños menores de 15 años presentan una incidencia de esta patología no despreciable de alrededor del 25,4% [41]. Los tumores cerebrales tienen en su mayoría mal pronóstico y son un gran reto, tanto desde el punto de vista de diagnóstico como terapéutico. Algunos factores son muy importantes en la evolución de la enfermedad, como por ejemplo, la edad del paciente, la localización del tumor, las posibilidades de resección, el tipo histológico y el grado.

Por ejemplo, los astrocitomas pilocíticos son tumores de crecimiento lento con pronóstico favorable y tasas de supervivencia superiores a 5 años en más del 85% de los casos. Los astrocitomas difusos, sin embargo, no pueden ser

resecionados quirúrgicamente en su totalidad y tienden a evolucionar a estadíos más agresivos (grado III) siendo la tasa de supervivencia mayor o igual a 5 años del 60%. Por otro lado, los ODGs de bajo grado (II) y (III) tienen un pronóstico más favorable que los astrocitomas difusos y también una menor tendencia a progresar hacia estadíos más agresivos. La incidencia de los OAs 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 As. Su pronóstico y tendencia a la malignización dependen de las proporciones de los distintos tipos celulares que los constituyen. Estos tipos de glioma pueden transformarse en GBM (grado IV) [37], siendo este muy resistente a la quimio y radioterapia y sólo un 3% de los pacientes afectados sobrevive más de tres años [42].



Figura 1.17. Estimación de la incidencia y mortalidad debido a cáncer cerebral y del sistema nervioso central en adultos de ambos sexos en Europa en el año 2012. Imagen adaptada de EUCAN [43].

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 [37].

1.3.1.3 Diagnóstico

Algunas enfermedades cerebrales no tumorales pueden mimetizar los síntomas de los tumores cerebrales. El diagnóstico diferencial correcto debe permitir distinguir los tumores cerebrales de otras patologías que pueden presentar síntomas similares. Para ello se practica un examen físico, neurológico y del campo visual, así como pruebas no invasivas para la confirmación de la patología, como la exploración mediante la tomografía axial computarizada (TAC) o IRM, sabiendo que el nivel de detalle anatómico de ésta última para tejidos blandos es muy superior. Así, el diagnóstico diferencial de tumores se puede llevar a cabo mediante imagen por resonancia magnética (IRM) gracias a sus características morfológicas diferenciales. Existen sin embargo patologías cerebrales que no se pueden diferenciar bien de los tumores mediante la morfología, pero sí por otras características biológicas. De aquí el gran potencial de la espectroscopía por resonancia magnética (ERM) que puede contribuir muy bien al diagnóstico diferencial de la presencia o no de tumor en el caso de imágenes IRM similares. Este aspecto es muy importante porque el enfoque terapéutico puede variar según el tipo de patología en cuestión, y en caso de tratarse de tumor, según el grado tumoral.

Los síntomas y señales causados por un tumor cerebral dependen del lugar del cerebro donde se aloja el tumor, las funciones vitales controladas por esa parte del cerebro y el tamaño del tumor o su capacidad de compresión. Algunos de dichos síntomas pueden ser [44-46]:

- Dolor de cabeza matutino o dolor de cabeza que desaparece después de vomitar
- Náuseas y vómitos frecuentes

- Problemas de la vista, del oído o del habla
- Pérdida de equilibrio y problemas de estabilidad para caminar
- Debilidad en uno de los lados del cuerpo
- Somnolencia no habitual o cambio en los niveles de actividad habituales
- Cambios no habituales de personalidad o comportamiento
- Convulsiones

Actualmente, cuando hay una sospecha clínica de tumor cerebral, el diagnóstico es valorado inicialmente por IRM. En la práctica clínica, esta evaluación permite distinguir la medida de la masa anómala y determinar algunos parámetros morfológicos relevantes para un diagnóstico preliminar. La ERM puede ser de gran ayuda para distinguir un tumor de procesos no neoplásicos o para estimar el grado tumoral. Sin embargo, este diagnóstico muchas veces aún debe ser confirmado por análisis histopatológicos, que es considerada la técnica más fiable (de referencia), para la clasificación de tumores cerebrales [47].

Para una caracterización todavía más detallada por IRM de la patología que aqueja al paciente, además de los elementos de contraste endógeno, o intrínseco, mencionados en 1.1.2.2 y 1.2.1, se utilizan agentes de contraste exógenos, que se administran al paciente durante la exploración IRM. Lo más habitual en la clínica para el estudio de la patología cerebral son los agentes de contraste basados en gadolinio (Gd^{3+}). Estos agentes no pueden cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) cuando ésta se encuentra intacta, aunque sí lo pueden hacer cuando hay discontinuidad o rotura. En éste caso, el agente de contraste actúa reduciendo el tiempo de relajación de los protones del agua y de su entorno, y produce “realce” en la imagen, volviéndola más intensa (hiperintensa). Son los llamados “agentes de contraste positivos” (figura 1.18).

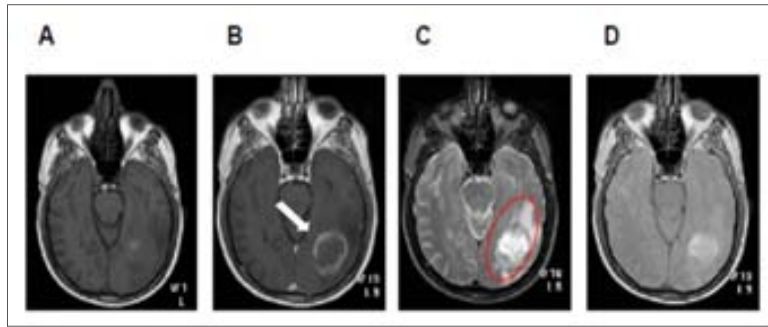


Figura 1.18. Imágenes por RM en plano axial de un mismo paciente diagnosticado con GBM ponderadas en: A) T₁, B) T₁ después de la administración de contraste basado en gadolinio (Gd³⁺), C) T₂, donde se muestra la zona tumoral (tumor + edema circundante) indicada por un ovalo rojo y C) densidad de protones. La flecha en “B” indica el anillo hipertenso debido al agente de contraste. Caso I0145 de la base de datos del proyecto Interpret [12,48].

Finalmente la confirmación definitiva del diagnóstico se realiza a partir de un análisis histopatológico (figura 1.19) realizado en una biopsia del tumor. Esto por supuesto tiene sus riesgos, tanto a nivel de mortalidad/morbilidad del paciente [49,50] como de diagnóstico, ya que se puede subestimar el grado del tumor dependiendo de la zona de la que se haya extraído la biopsia. Sería ideal disponer de una herramienta eficaz de diagnóstico no invasivo que pudiese evitar el procedimiento de biopsia, por lo menos en algunos casos.

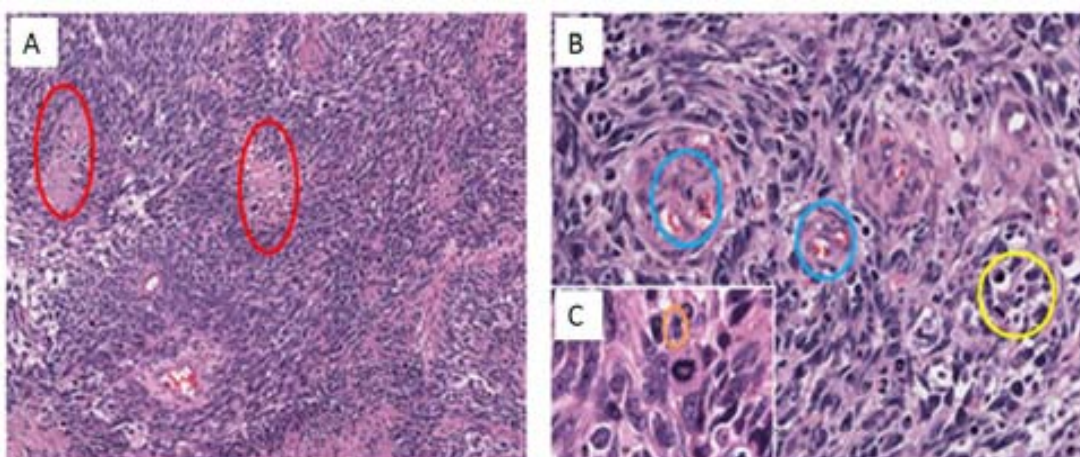


Figura 1.19 (A) Campo histológico típico de un GBM mostrando hiper celularidad y varias áreas de necrosis (círculos rojos) (x100). (B) Mayor aumento (x200) en un campo diferente del mismo tumor que revela atipia nuclear (círculo amarillo) y proliferación microvascular (círculos azules). En el recuadro (C) destacan mitosis (círculo naranja). Tinción con hematoxilina - eosina [51].

Uno de los métodos no invasivos prometedores para coadyuvar al diagnóstico de tumores cerebrales es la ERM de protón (^1H -ERM), que está considerada como un complemento muy útil de la IRM, y requiere pocos minutos que se añaden al final de la exploración (adquisición de espectros *single voxel* (SV) en imanes de 1,5 T) [12]. Los espectros se obtienen normalmente de volúmenes cúbicos conocidos como *voxels*, midiendo aproximadamente 2 - 4 cm^3 (dependiendo del tamaño de la lesión) y contienen información sobre metabolitos de interés, (figura 1.20 y tabla 1.1) algunas de las cuales se detallan a continuación:

- **Colina (Cho):** La “colina” también llamada “colina total” procede del grupo trimetilamina de un grupo de moléculas involucradas en la degradación y síntesis de membrana celular, principalmente de fosfocolina, glicerofosfocolina y colina libre. Se considera como un marcador de proliferación celular. Normalmente, los tumores neuroepiteliales altamente proliferativos verán aumentadas sus señales de estos metabolitos [52].
- **Creatina (Cr):** La “creatina” es en realidad, creatina total (tCr), la suma de creatina y fosfocreatina. Dichos metabolitos se refieren a compuestos relacionados con la bioenergética de los tejidos con demanda fluctuante de energía y la Cr se ve muchas veces disminuida en los tumores con respecto a parénquima cerebral normal [53].
- **N-acetil aspartato (NAA):** se considera como un marcador de viabilidad neuronal que suele ver disminuida su concentración en el caso de los tumores cerebrales [54], reflejando la afectación y en algunos casos la muerte neuronal.
- **Lactato (Lac):** Se asocia en general a alta actividad glicolítica y/o metabolismo anaeróbico. Su concentración suele aumentar en lesiones tumorales [16].
- **Lípidos móviles (ML):** éstos aumentan en algunos tipos de tumores, especialmente los de alto grado, siendo un indicador de mal pronóstico. Se suele asociar con necrosis (muerte celular) [54].

- **Glutamato/ Glutamina (Glx):** El glutamato es un importante neurotransmisor excitatorio en el SNC y se ve elevado en los oligodendrogliomas [55]. La glutamina en cambio puede aportar carbono al metabolismo anabólico tumoral [56].
- **Mio-inositol (mi):** Es un marcador de funcionalidad glial y parece estar relacionado con mecanismos de osmoregulación [57].
- **Acetato (Ac):** Marcador de metabolismo bacteriano en el caso de abscesos cerebrales in vivo [58]. También puede provenir de la degradación del NAA en biopsias *post mortem*.
- **Acido γ -amino butírico (GABA):** Actúa como principal neurotransmisor inhibitorio cerebral [59].

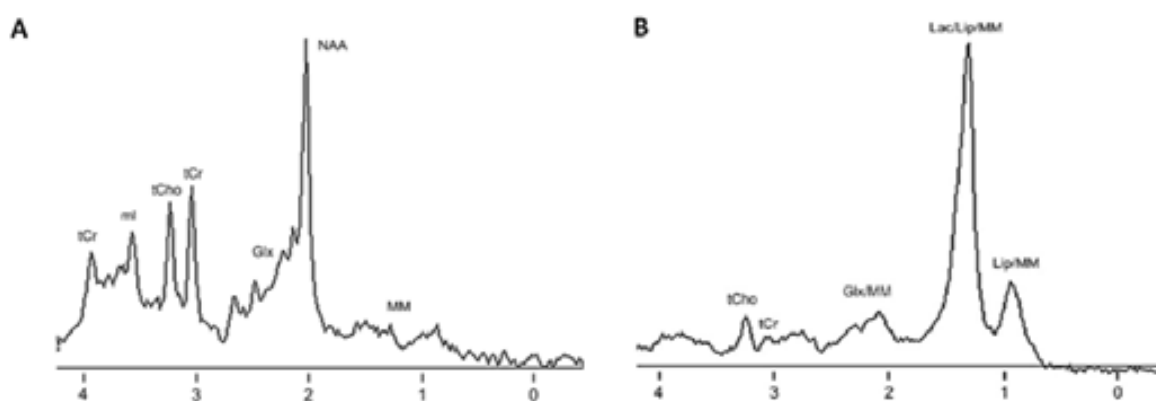


Figura 1.20. A) Espectro de ^1H (TE=30ms; TR=2000ms) de materia blanca de un voluntario sano. B) Espectro adquirido con los mismos parámetros que en A) de un GBM. Los principales metabolitos están marcados sobre sus resonancias correspondientes: creatina total (tCr) a 3,03 y 3,94 ppm; colina total (tCho) a 3,21 ppm; NAA a 2,02 ppm; mio-inositol (mi) a 3,56 ppm; glutamato y glutamina (Glx) entre 2,00 y 2,40 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 col. [60])

Aunque se trata de una manera valiosa de obtener información sobre el metabolismo de un tejido de una manera no invasiva, la ERM *in vivo* queda limitada por su relativamente baja resolución espectral, en comparación con la resolución que se puede llegar a obtener con los análisis *in vitro* [61] (figura 1.21).

Se está evaluando el uso conjunto de la ERM y la IRM para conseguir un diagnóstico más preciso en los estadios iniciales de la enfermedad y diferenciar mejor los diferentes tipos tumorales.

Para aumentar el valor de la ERM en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad *in vivo*, es importante tener una base previa *in vitro*, que nos permita comprender mejor el origen de las señales que se detectan con las técnicas *in vivo* [62]. Para este fin es relevante el uso de células y modelos preclínicos de la patología. También tiene importancia la evaluación *in vitro* de biopsias de tumores cerebrales humanos, bien sea mediante espectroscopía de alta resolución de sus extractos [63] o mediante el estudio de biopsias intactas mediante *high resolution magic angle spinning spectroscopy* (HRMAS) [64], con el objetivo final de mejorar el diagnóstico no invasivo y por lo tanto el mejor tratamiento posible de la enfermedad.

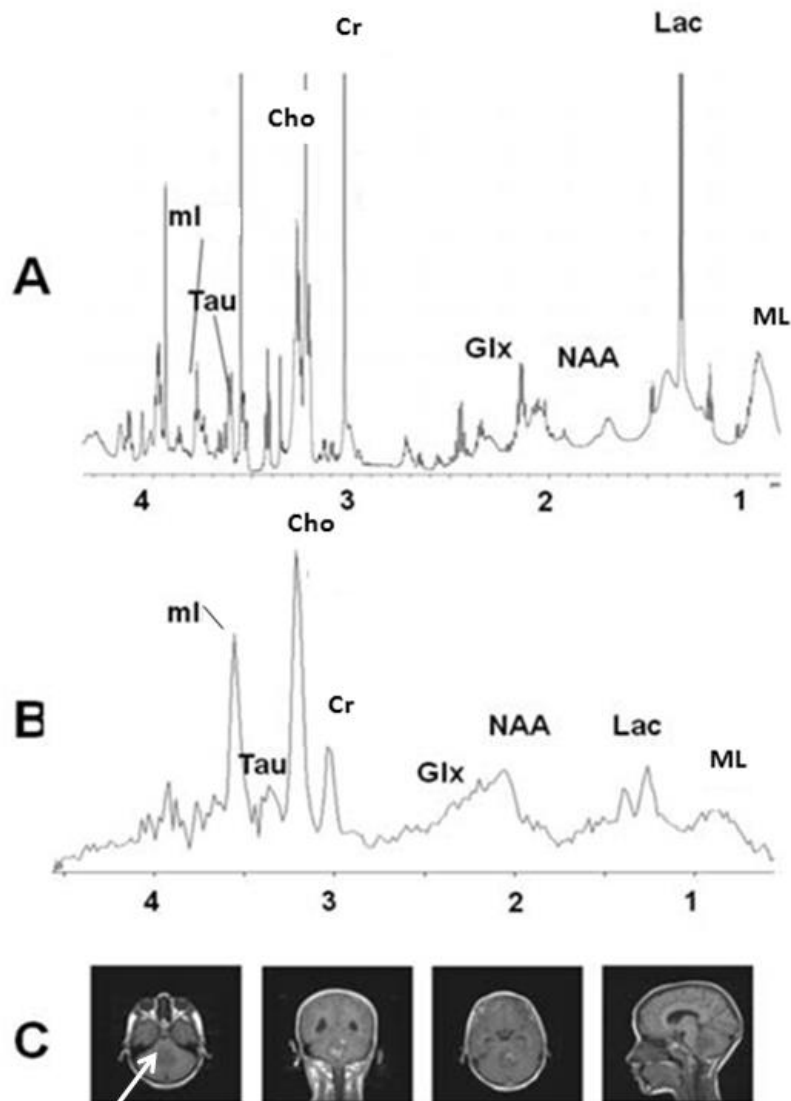


Figura 1.21. Ejemplo de la comparación de la resolución mejorada en espectroscopía HRMAS adquirido con la secuencia pulso y adquisición a temperatura de 0° C (A), con respecto a ERM *in vivo* adquirida a 30ms (B) de un caso pediátrico de meduloblastoma. La IRM (C) nos muestra la localización anatómica de tumor con una flecha. Figura adaptada de Cuellar-Baena y col. [22].

Para los análisis que se llevan a cabo con ERM de alta resolución *ex vivo* (por ejemplo HRMAS), es necesaria una biopsia recogida durante la cirugía del paciente. Por lo tanto, se trata de un procedimiento invasivo en contraposición a las exploraciones por ERM *in vivo*.

La subsecuente descongelación y análisis espectroscópico por HRMAS, aún siendo realizado a bajas temperaturas, puede llevar a la reactivación parcial de enzimas, dando lugar al metabolismo *post mortem* y cambios bioquímicos evidentes debidos a dicho metabolismo [65]. Dichos cambios podrían complicar la interpretación de los datos y, por lo tanto, serían de gran utilidad para la inactivación o ralentización de dicho metabolismo.

Una de las ventajas de la técnica HRMAS es que permite analizar los patrones espectroscópicos de tejido cerebral y tumoral en alta resolución sin tener que recurrir a la extracción por ácido perclórico de los metabolitos hidrosolubles [66,67] ya que con ellos, aparte de la mayor complejidad metodológica con respecto al HRMAS *ex vivo*, podemos perder información valiosa (por ejemplo, contribuciones de lípidos móviles o macromoléculas en el patrón espectral).

1.4 Uso de la irradiación por microondas focalizadas (*Focused microwave, FMW*) en la “fijación” de tejidos

Los cambios en el cerebro asociados con el metabolismo *post mortem* han sido reconocidos por años como un problema para el análisis *ex vivo* o *in vitro* del patrón metabólico tisular. En los años 20 del siglo pasado, los neuroquímicos reconocieron dicho problema y determinaron que la congelación del cerebro era el método más favorable para detener la degradación de algunas moléculas y la rápida formación de otras debido al metabolismo *post mortem*.

En 1925, McGinty y Gesell [68] notaron que una demora en la congelación de las muestras de cerebro aumentaba significativamente los niveles de lactato. Kinnersley y Peters [69] llegaron a la misma conclusión en su investigación con el tejido cerebral de palomas, observando que el lactato aumentaba durante la incubación *in vitro* y que la congelación *in situ* reducía la formación de lactato. En

1935, Kerr [70] demostró que la fosfocreatina disminuía rápidamente con los cambios *post mortem* y que sólo 30 segundos después de la muerte se perdía un 90% de esta molécula de creatina fosforilada. También describió que la desaparición de fosfocreatina era mucho más rápida en cerebro que en músculo, concluyendo que el cerebro era altamente susceptible a los cambios *post mortem*. Así, utilizando nitrógeno líquido para congelar el cerebro inmediatamente después de la muerte, se perdería menos nivel de fosfocreatina.

En los años 70, numerosos laboratorios notaron que la congelación del cerebro por sí sola no era suficiente para reducir las alteraciones químicas del cerebro. Es entonces cuando se comenzó con la experimentación con dos diferentes técnicas para contrarrestar dicho problema: la rápida congelación en nitrógeno líquido (*freeze-blowing*) y la irradiación por microondas focalizadas.

Ferredelli y col. [71] observaron en sus experimentos con muestras murinas que la fosfocreatina disminuía rápidamente con la isquemia al sacrificar los animales por decapitación y luego someterlos a congelación. Ellos determinaron que con la congelación de animales intactos se perdía menos fosfocreatina. Se demostró entonces que, al congelar el animal intacto y a continuación extirpar el cerebro, los niveles de ATP eran elevados y los niveles de lactato bajos, concluyendo que la “fijación” del cerebro tenía un impacto importante en la interrupción del metabolismo *post mortem*.

Schmidt y col. [72] describieron en sus experimentos con ratas que la irradiación por microondas del cuerpo entero del animal detenía la actividad de la acetilcolina esterasa, aumentando los niveles de acetilcolina cuando se utilizaba dicho método de irradiación, en comparación con el método de decapitación. Stavinoha y col. [73] describieron resultados similares: la irradiación por 4 s en rata y 2 s en ratón logrando una temperatura de 80° C interrumpían la actividad de la acetilcolina esterasa.

Estos estudios fueron seguidos por otros autores en donde ya se describía interferencia de la potencia de irradiación [74]. Es entonces cuando se describió que el tiempo y la potencia de focalización de las microondas eran factores importantes para llevar a cabo adecuadamente la técnica, por ejemplo en el caso de ratas. El tiempo de la irradiación debería ser de menos de 2 segundos y la

potencia utilizada entre 2 y 6 kW, y esos parámetros experimentales llevarían rápidamente el tejido a una temperatura de 82° C [75].

Es evidente que los métodos de manipulación de las muestras de tejido para su análisis son relevantes y pueden interferir en los resultados. La obtención, conservación y temperatura a la que están sometidas las muestras pueden ser determinantes y desencadenar metabolismo *post mortem*. A ese respecto, aunque no podamos incidir en dichos factores, por ejemplo en el tiempo de resección de la muestra, sí podemos actuar rápidamente inactivando cualquier metabolismo posterior durante el análisis con el uso de la irradiación por microondas focalizadas (FMW) [76].

Actualmente, la FMW se utiliza ampliamente para paralizar los procesos metabólicos y, en consecuencia, preservar el metaboloma inicial en las muestras de tejido. La aplicación de éste método, que eleva rápidamente la temperatura del tejido de interés, por ejemplo cerebro, hasta aproximadamente 82° – 85° C en pocos milisegundos, causa la inactivación de enzimas relacionadas con el metabolismo *post mortem* [77]. Por ejemplo, algunos autores afirman que el uso de FMW inactiva rápidamente las enzimas y previene la descomposición *post mortem* de nucleótidos de adenina y adenosina, permitiendo mediciones precisas de AMP, ADP, ATP, adenosina [78] y glucógeno [79] a partir de cerebro de rata. La irradiación de FMW también se ha utilizado en nuestro grupo como método de sacrificio para posterior cuantificación del contenido de glucosa en modelos preclínicos de tumores cerebrales de alto grado en secciones de dichos tumores [80]. Este método de preservación del metabolismo, no obstante, por razones obvias no es factible para los tumores cerebrales humanos, aunque es considerado actualmente uno de los recomendados en modelos preclínicos [77].

En el estudio con técnicas de ERM *ex vivo* como por ejemplo la adquisición de espectros HRMAS, es extremadamente importante prevenir los cambios en el patrón espectral y como consecuencia lograr la obtención de resultados que podamos correlacionar correctamente con los obtenidos por ERM *in vivo*. La figura 1.22 nos muestra la comparación entre un espectro HRMAS de tejido de cerebro de un ratón sacrificado por el sistema de fijación de microondas focalizadas y otro ratón sacrificado por sobredosis de anestesia. En esta figura se muestra la

presencia de la señal de fosfocreatina relacionada con la interrupción del metabolismo *post mortem* solo en el ratón sacrificado por FMW.

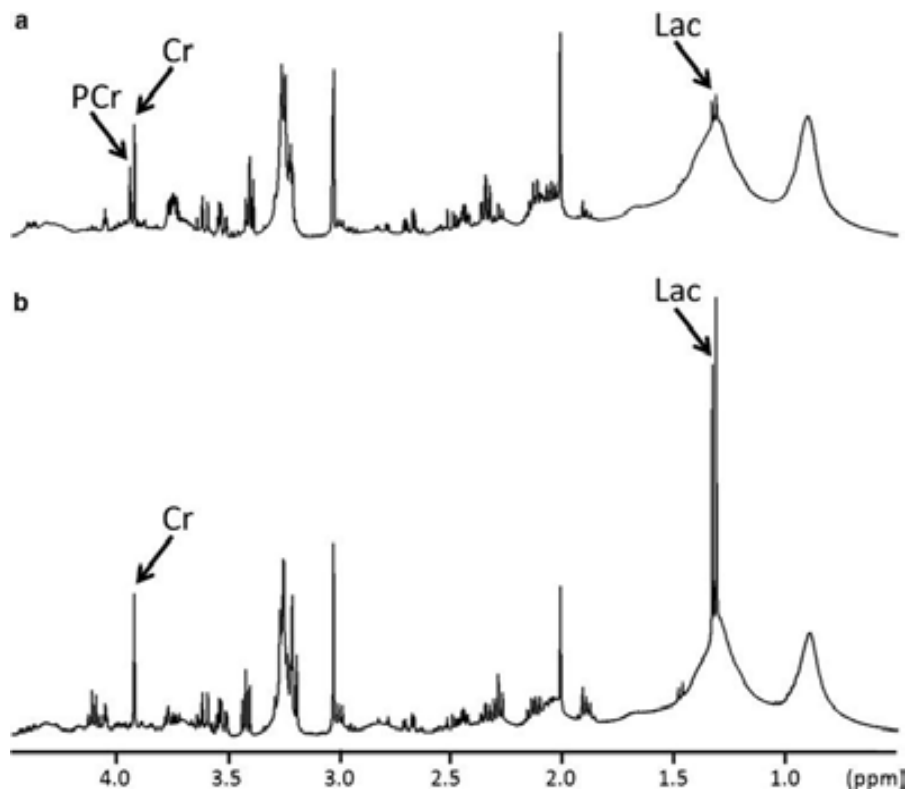


Figura 1.22. Espectro HRMAS de un tejido de cerebro de ratón normal, adquirido a 37° C y 9,4T con la secuencia de pulso y adquisición y una velocidad de giro de 6 kHz. Espectro obtenido de tejido cerebral de (a) ratón sacrificado por irradiación de microondas focalizadas y (b) de un ratón sacrificado por sobredosis de anestesia. Las diferencias en Cr a 3,93 ppm, PCr a 3,95 ppm y Lac a 1,32 ppm son señaladas por las flechas y varían según el método de sacrificio usado [81].

1.5 Desarrollo de clasificadores de tumores cerebrales para la ayuda al diagnóstico mediante el análisis de patrones espectrales

Una de las herramientas más robustas para el diagnóstico de tumores cerebrales, como ya se ha descrito, es la técnica de la resonancia magnética nuclear, en sus vertientes de estudio anatómico (IRM) y metabólico (ERM). La ERM puede adquirirse además a altos campos y con excelente resolución en su modalidad *ex vivo*, cuando se dispone de una muestra de tejido en forma de biopsia.

Sin embargo, aunque algunos profesionales como los radiólogos están altamente familiarizados con el manejo e interpretación de datos de IRM, lo mismo no se verifica con los datos ERM, que requieren otro tipo de práctica y conocimiento

para su procesado, identificación y cuantificación. Para facilitar su uso, una de las soluciones es diseñar sistemas informáticos que son capaces de analizar de manera reproducible y fiable los datos de ERM con la posibilidad, además, de realizar un proceso de clasificación automática basado en el análisis de reconocimiento de patrones espectrales.

En el caso de los espectros de tumores cerebrales obtenidos por ERM, el análisis de reconocimiento de patrones engloba dos conceptos: la categoría o clase a la que se asocia cada espectro tumoral, y el proceso matemático que cuantifica determinadas características de los espectros para asociarlas a una determinada categoría o clase [82]. En ese sentido El-Deredy aporta detallada revisión acerca de la explicación de las metodologías del reconocimiento de patrones en ERM [83].

El sistema INTERPRET (*Decision Support System v3.1.0, DSS*) (<http://gabrmn.uab.es/dss/>) es un sistema de ayuda al diagnóstico que fue desarrollado inicialmente durante el proyecto INTERPRET, financiado por la Unión Europea entre los años 2000 y 2002. El principal objetivo de este proyecto era desarrollar nuevas metodologías que permitiesen automatizar la clasificación de tumores cerebrales humanos utilizando datos de ERM. Este sistema permitiría a cualquier persona con un conocimiento mínimo de ERM, la entrada de datos adquiridos a 1,5T y su análisis para ayuda al diagnóstico de una masa cerebral anómala [12,84]. Para su desarrollo se utilizó una las herramientas fundamentales para el análisis de reconocimiento de patrones, en su caso el análisis discriminante lineal (*LDA linear discriminant analysis*). Dicha estrategia de análisis tiene dos objetivos principales: el descriptivo, que permite discriminar las diferencias entre los casos de los grupos almacenados en una base de datos interna, y el predictivo, que permite asignar el espectro de un nuevo caso a una de las categorías previamente establecidas. La función discriminante, en este análisis, intenta obtener la máxima separación entre patrones de clases de tumor diferentes y minimizar la separación ente patrones pertenecientes al mismo tipo tumoral. Los resultados se muestran en forma de “espacio latente” (figura 1.23) donde el patrón espectral de cada caso se muestra como un punto de dicho espacio latente.

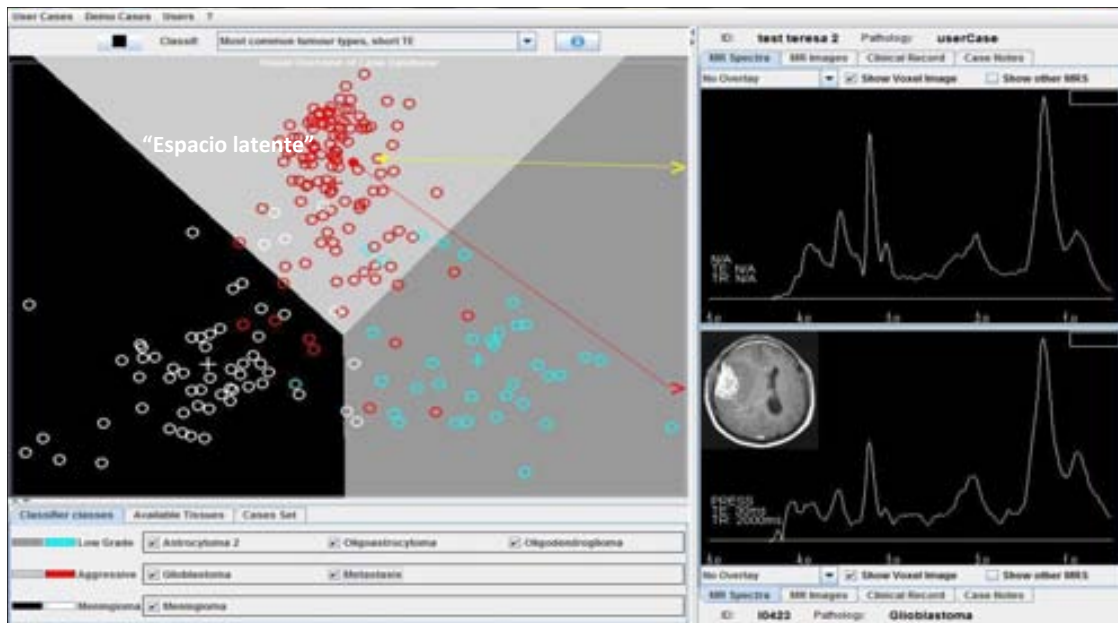


Figura 1.23 Pantalla de la DSS v.3.0.1 de INTERPRET donde se muestra un ejemplo de clasificación de un espectro de GBM (punto amarillo). En la pantalla de la izquierda se observa el espacio latente de la interfaz con tres de los tipos tumorales principales de los casos que se obtuvieron en INTERPRET, y con los cuales se desarrolló el clasificador representado en ese espacio latente. En rojo se representan los glioblastomas, en blanco los meningiomas, en azul los astrocitomas de bajo grado, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas y, finalmente, en amarillo el caso problema. A la derecha, en la parte superior se ve el espectro a TE corto del caso en estudio y en la parte inferior el espectro de un caso de GBM cercano al caso problema. Las similitudes son evidentes [84,85].

En resumen, la DSS INTERPRET fue diseñada para facilitar la incorporación de resultados de análisis de espectros de ERM en el proceso global de diagnóstico establecido para tumores cerebrales, permitiendo distinguir entre tres grupos principales de tumores: 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) [12]. Gracias a este sistema, los clínicos pueden manejar de manera más fácil y objetiva los datos de ERM, sin necesidad del aprendizaje bioquímico y físico necesario para un análisis mediante el post procesamiento individual de dichos datos de ERM.

Esto tiene el potencial de mejorar el diagnóstico por ERM de una masa de posible origen maligno [86] incluso antes de que el paciente se someta a la resección quirúrgica, por lo que la evaluación neuroradiológica es enriquecida con información adicional funcional y metabólica [12]. El uso extendido de este sistema permitiría prescindir de la biopsia en algunos casos muy concretos en el que por razones diversas, esta no fuera posible o recomendable [87].

Por otra parte, la cantidad cada vez mayor de datos biológicos generados por técnicas de metabolómica requieren una herramienta que permita la prueba de hipótesis rápida en estos datos. Esta herramienta proporcionaría varias técnicas para la reducción de dimensionalidad de datos (a través de la selección de las variables relevantes, o por medio de extracción de características), clasificación, visualización, y la evaluación de los resultados obtenidos [88-90].

Hagberg [91] describió en su revisión de estudios experimentales de ERM, que el estudio de la clasificación de tumores mediante reconocimiento de patrones es complejo debido a varias razones, por ejemplo: la complejidad del método de análisis de la muestra biológica (estudios *in vivo* o extractos de tejido *in vitro*) o también debido a la diversidad de muestras (tumores humanos o tumores inducidos en ratones). Sin embargo, ya en esa revisión llevada a cabo 15 años atrás, cuando los métodos de RP no estaban aún tan desarrollados como hoy, Hagberg concluía que la mayoría de los métodos basados en ERM lograban una buena clasificación y puntualizaba que la ERM era un elemento importante en la rutina clínica.

Investigadores como Metsis y colaboradores [92] están actualmente buscando formas eficientes y fiables para el diagnóstico temprano de tipos de tumores y detección de biomarcadores a través de expresión genética y HRMAS. Estos autores describen que el aprendizaje automático mediante algoritmos juega el papel más importante en los análisis heterogéneos donde se utilizan conjuntos de datos biomédicos y biológicos para clasificar los diferentes tipos de tumores cerebrales.

Con la finalidad de facilitar el desarrollo de clasificadores automáticos basados en ERM, se desarrolló el software *SpectraClassifier* (SC) (<http://gabrmn.uab.es/sc>) basado en *Java* [93]. El objetivo principal del SC es permitir al usuario con un mínimo de conocimientos de estadística realizar un análisis totalmente automatizado de reconocimiento de patrones siguiendo el esquema que se muestra en la figura 1.24. En el SC se incorporaron funciones como la selección de características por los métodos de *principal component analysis* (PCA), *Sequential Forward Feature Selection* (SFFS), *Sequential Backward Feature Selection* (SBSF), que se basan en una búsqueda *hill climbing* [94] que utiliza una técnica de mejoramiento iterativo. Comienza a partir de un punto (punto

actual) en el espacio de búsqueda, donde, si el nuevo punto es mejor se convierte en punto actual, si no, otro punto vecino es seleccionado y evaluado. El método termina cuando no hay mejorías, o cuando se alcanza un número predefinido de iteraciones. Además, el sistema *SpectraClassifier* genera un espacio latente bidimensional por medio de la clasificación del método de LDA.

También están implementados varios métodos de evaluación como *K-fold cross-validation* y *leave-one-out*. Este último implica separar los datos de forma que para cada iteración tengamos un solo caso como dato de prueba y todo el resto de casos conformando los datos de entrenamiento donde la evaluación final viene dada por el error en la predicción global de cada uno de los casos que se deje fuera cada vez. Además se ha implementado el *bootstrapping* [95], método que 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.

Por otra parte, el sistema cuenta también con la capacidad de generación de curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC) [96] y las matrices de confusión con cálculo de *balanced error rate* (BER) [97].

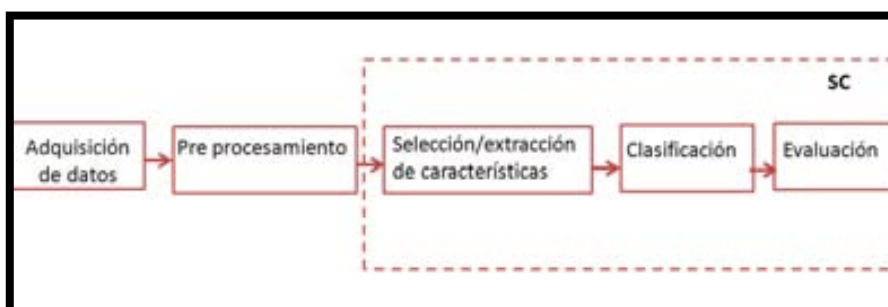


Figura 1.24. Esquema de los pasos que se realizan para el uso del sistema de reconocimiento de patrones basado en *SpectraClassifier*. La adquisición de los datos de ERM (o HRMAS), el pre-procesamiento de dichos datos y dentro del recuadro con líneas discontinuas se observan los pasos automatizados que realiza el SC. Figura adaptada de [93].

El SC tiene como objetivo ser una herramienta intuitiva y de uso fácil. Tiene como ventajas permitir al usuario ajustar parámetros de entrada como la formación de grupos, la definición de las clases, la selección y extracción de las características

relevantes, la elección de los métodos de evaluación y un espacio latente dinámico que facilita el análisis de los resultados de discriminación obtenidos (figura 1.25).

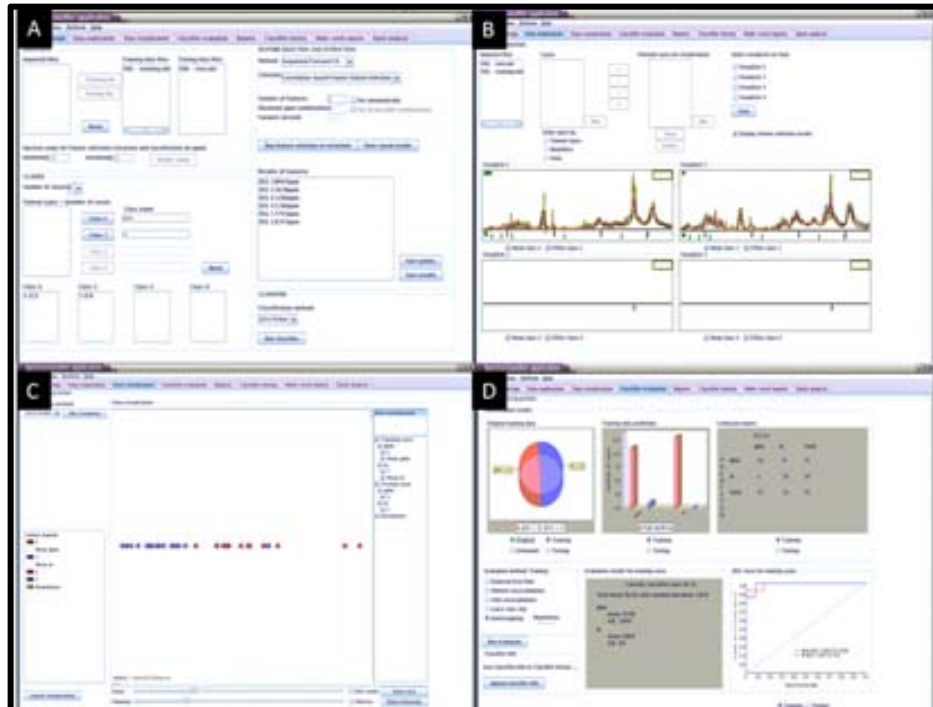


Figura 1.25. Diferentes pantallas del SC. A) Diseño del clasificador, B) Explorador de datos, C) Espacio latente de clasificación, D) Evaluación del clasificador (ver también [93] y manual de uso accesible en [98]).

1.6 Estudio de la patología cerebral en modelos preclínicos.

El estudio de los tumores cerebrales en pacientes humanos representa un reto constante, dada la imposibilidad, por ejemplo, de realizar biopsias repetidas en el mismo paciente por motivos éticos y médicos. Además, la puesta a punto de algunos métodos optimizados en esta tesis, como la irradiación por FMW (sección 1.4) también requería un modelo en el que se pudieran obtener muestras repetidas sin perjuicio para el paciente o su tratamiento. Una de las soluciones planteadas a éste tipo de problemas es el uso de modelos preclínicos de la patología, piezas fundamentales en la investigación para estudiar y comprender mejor las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al ser humano.

En la actualidad, el modelo animal más usado para el estudio de tumores cerebrales es el ratón. Los ratones son animales fáciles de manejar, tienen un ciclo de vida corto y desarrollan tumores en el sistema nervioso central similares a los encontrados en pacientes humanos [99]. A ese respecto, existen modelos modificados genéticamente (*genetically engineered mice*, GEM) que desarrollan el tumor de manera espontánea [100] y también modelos inducidos por inyección estereotáctica de células en el parénquima cerebral. La inyección puede ser de líneas celulares de ratón, llevando el nombre de modelos *allograft* [101], o realizable con muestras obtenidas de otras especies (por ejemplo: la especie humana) llamados modelos *xenograft*, en cuyo caso se utilizan cepas de ratones desprotegidos inmunológicamente [102].

Dada su alta incidencia y relevancia clínica, el GBM es una de las patologías tumorales más modeladas a nivel preclínico. Un modelo ideal para el estudio del GBM humano debería mimetizar las características histopatológicas, genéticas y de imagen, así como ser un modelo reproducible y fiable. Entre ellos se encuentran los modelos estereotáticos experimentales murinos por inoculación con células U251, U86, GL261, C6, 9L y CNS-1 [103]. Una de las líneas celulares más utilizadas es la línea GL261 de ratón, inoculada en animales de la cepa singénica C57BL/6, produciendo tumores que crecen de manera exponencial con características invasivas e infiltrativas parecidas a las de los GBMs humanos [104]. Por otra parte, como ya se ha mencionado, existen otros modelos, por ejemplo mediante la activación de oncogenes de manera selectiva por la inyección de vectores lentivirales [105] y manipulación en ratones transgénicos [106].

Sin embargo, la similitud no es perfecta: los modelos inducidos no recapitulan exactamente las características de angiogénesis e invasividad de los tumores cerebrales humanos, sobre todo cuando se trata de la evolución de grados más bajos a grados superiores. En este sentido, los modelos transgénicos (en los cuales los tumores aparecen de manera espontánea a lo largo de la vida de los animales, emulando de una manera más precisa la evolución de la enfermedad en humanos [107,108]) la similitud y podría llegar a ser mejor. 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, por lo que son capaces de reproducir sus patrones de progresión [101].

Sin embargo, para los estudios llevados a cabo en esta tesis, nos hemos concentrado básicamente en el modelo de tumor murino inducido GL261 por su gran reproducibilidad y facilidad de obtención. Además, queda perfectamente solucionada la necesidad de contar con tejidos similares a las biopsias humanas para los estudios de optimización planeados.

Finalmente, dada la colaboración existente entre el GABRMN y el grupo RETICS (redes temáticas de investigación cooperativa en salud) dirigido por el Dr. Joan Martí (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau), se consideró interesante evaluar algunas de las metodologías puestas a punto en la tesis con un modelo murino de isquemia cerebral, dado que algunos de los cambios esperables en el patrón metabólico del tejido cerebral presentan similitudes con los cambios que se producen en tumores [109] y los resultados que se pudieran obtener podrían ser por tanto de interés conjunto en las dos patologías investigadas.

Para el modelo preclínico de isquemia, la selección del modelo tiene en cuenta normalmente, entre otros factores, el modo de isquemia permanente o transitorio que se pretende, en función del objetivo de los estudios a realizar; también se tiene en cuenta la duración del estudio y la posible aplicación de terapia. Las cepas de rata más apropiadas para este tipo de estudios son la cepa Wistar y la cepa Sprague Dawley (SD) [110]. Asimismo, los modelos más usados para la isquemia cerebral focal en ratas son: el modelo de la oclusión de la arteria media, el modelo de la oclusión tromboembólica de la arteria media cerebral, el modelo endotelino y el modelo de fototrombosis [111].

2. OBJETIVOS

1. Optimizar el método de sacrificio por irradiación de microondas focalizadas (FMW) en modelos preclínicos (rata y ratón) de patología cerebral para la preservación y fijación de su patrón metabólico detectable por HRMAS.
2. Aplicación de la fijación mediante FMW a la preservación del patrón metabólico en biopsias de tumores cerebrales humanos obtenidas por resección quirúrgica.
3. Optimización del desarrollo de clasificadores para reconocimiento de tipos y subtipos de tumor cerebral basados en el reconocimiento de patrones de biopsias estudiadas por HRMAS.

3. **M**ATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales y líneas celulares investigadas

Los animales utilizados para este estudio fueron ratones de la cepa C57BL/6 y ratas OFA Sprague – Dawley (*Charles River Laboratories International*, L'Arbresle, France), establecidos en el animalario de nuestra institución (*Servei d'Estabulari, Universitat Autònoma de Barcelona*). Todos los estudios llevados a cabo fueron previamente aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal y Humana (CEEAH) de la UAB de acuerdo con la legislación local y estatal (CEEAH 1788, CEEAH 1378, CEEAH 1023, DMAH 5620).

Las células de glioma murino GL261 se obtuvieron del *Tumor Bank Repository*, del *National Cancer Institute-Frederick, MD, EE.UU.* Estas células fueron previamente caracterizadas por nuestro grupo [112,80] y escogidas como modelo por poseer un comportamiento altamente reproducible en la generación de gliomas de alto grado (grado IV, GBM) [104] (ver sección 3.2).

El cultivo de dichas células se llevó a cabo en colaboración con otros miembros del GABRMN. Se utilizaron frascos de 75 cm² (Nunc, LabClinics SA, Barcelona) utilizando medio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado con 2,0 g/l de bicarbonato de sodio, 0,285 g/L de Glutamina, 1% de penicilina-estreptomina (todos de Sigma-Aldrich, Madrid) y fue suplementado también con 10% de suero fetal bovino (Gibco, *Invitrogen Corporation*, Reino Unido). El período de tiempo necesario para alcanzar la fase de confluencia (75 - 85% de la superficie del frasco cubierta de células) fue de 7 días a partir del momento del subcultivo. El cambio de medio se estableció en los días 3 y 5 de cultivo. Las células se cultivaron a 37° C en una atmósfera estéril con un 5% de CO₂ y humedad del 95% en un incubador (HeraCell, 150i, *Thermo Scientific*). En el momento del subcultivo, el medio se eliminaba por aspiración con una bomba de vacío y las células se lavaban con 10ml de PBS estéril. A continuación, después de eliminar el PBS, se añadían 2ml de tripsina-EDTA (0,5 g/L y 0,2 g/L respectivamente) (Sigma, Madrid) para desprender las células de las paredes del frasco y estas se resuspendían en 8 ml de medio RPMI (10ml de volumen total de resuspensión). Una alícuota de dicha resuspensión se sembraba en el nuevo frasco (7 x10⁵ células aproximadamente).

3.2 Generación de tumores cerebrales en ratón

Un total de 10^5 células de la línea GL261 (resuspendidas en $4\mu\text{l}$ de medio de cultivo, obtenidas en el subcultivo descrito en 3.1) fueron utilizadas en cada animal para la generación de los tumores.

Las células fueron inyectadas utilizando un sistema estereotáctico de inyección, fijando el sitio de administración en el estriado (figura 3.1). Este proceso consistió en los siguientes pasos: 15 minutos antes de realizar el proceso de implantación, se les administró analgesia a los animales (hembras C57BL/6) por inyección subcutánea: Meloxicam ($1,0\text{ mg/Kg}$) (Boehringer Ingelheim España, S.A.). A continuación, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (Parke-Davis S.L., Madrid) y xilazina (Carlier, Barcelona España) a 80 y 10 mg/Kg respectivamente, administradas intraperitonealmente. Dichos animales fueron inmovilizados en un sistema estereotáctico (Kopf Instruments, Tujunga/CA, USA) y se les realizó una perforación en el cráneo de 1 mm de diámetro con un microtaladro (Fine Science Tools, Heidelberg, Alemania) $0,1\text{ mm}$ posterior a Bregma (en sentido caudal) y $2,32\text{ mm}$ lateral a la línea media (derecha), en la zona correspondiente al estriado. El volumen total ($4\text{ }\mu\text{l}$) se inyectó con una jeringa Hamilton de 26G (Sigma-Aldrich, Madrid, España), utilizando un inyector digital (Harvard Apparatus, Holliston/MA, USA) a una velocidad de $2\text{ }\mu\text{l}$ por minuto, y a una profundidad de $3,35\text{ mm}$ desde la superficie del cráneo. Para finalizar el proceso, los animales fueron suturados con seda del calibre 5/0 (Braun, Barcelona, España) y permanecieron a una temperatura aproximada de unos 25° C durante su recuperación de la anestesia. Una vez despiertos, se les administró Buprenorfina (Schering-Plough, Madrid, España) $0,05\text{ mg/kg}$ por vía subcutánea como analgésico y durante 2 días tras la operación se les administró Meloxicam cada 24h ($1,0\text{ mg/Kg}$).

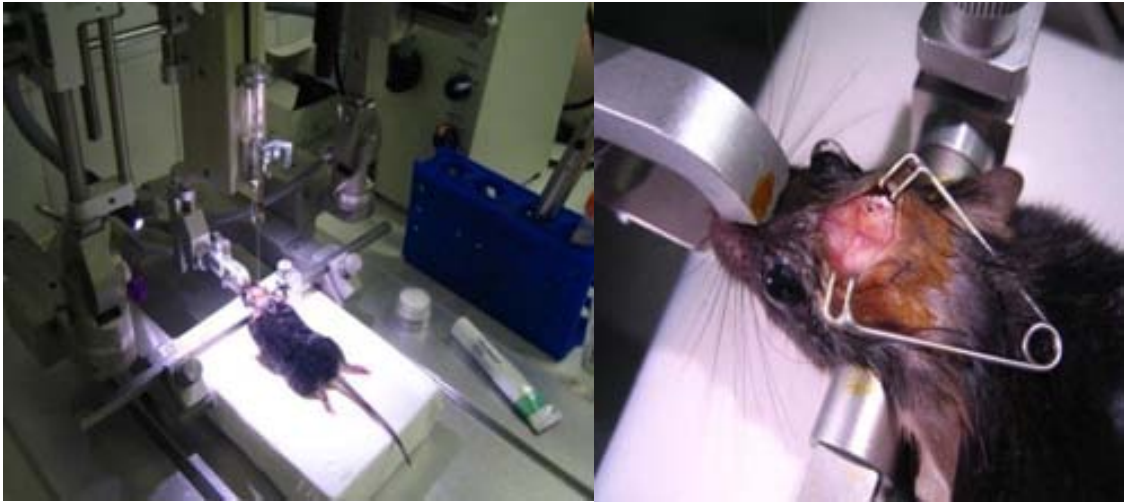


Figura 3.1 Izquierda: imagen general del sistema estereotáctico de inyección utilizado para inocular células GL261 en el estriado de los ratones C57BL/6. Derecha: ampliación del cráneo de un animal durante el proceso de implantación.

3.3 Métodos de sacrificio utilizados

3.3.1 Método de sacrificio por sobredosis de anestesia

En este protocolo, los animales utilizados en los diferentes estudios (ratones y ratas), se sacrificaron por sobredosis de anestesia con pentobarbital a una concentración de 60mg/ml. La cantidad utilizada en cada caso varió según el peso del animal (50mg/kg para ratón y 200mg/kg para rata). Se pesó cada uno de los animales, se les colocó en posición de decúbito supino y se les inyectó la dosis calculada en la cavidad peritoneal con un ángulo de 45° para evitar dañar los órganos internos. Pasados unos minutos y después de confirmar su muerte mediante comprobación de pulso y respiración, se procedió a la extirpación del cerebro y congelación inmediata en N₂ líquido (5 ± 1 min) manteniéndose en esas condiciones hasta su análisis.

3.3.2 Método de sacrificio por irradiación con microondas focalizadas (FMW)

El proceso de irradiación por microondas focalizadas se llevó a cabo con el aparato *Muromachi microwave fixation system* 5kw, modelo TMW -6402C, Muromachi, Kikai Co. LTD. Tokyo (figura 3.2A) que se encuentra en el Servicio de Resonancia Magnética Nuclear (SeRMN) de la UAB, siguiendo las especificaciones del fabricante, descritas a continuación.

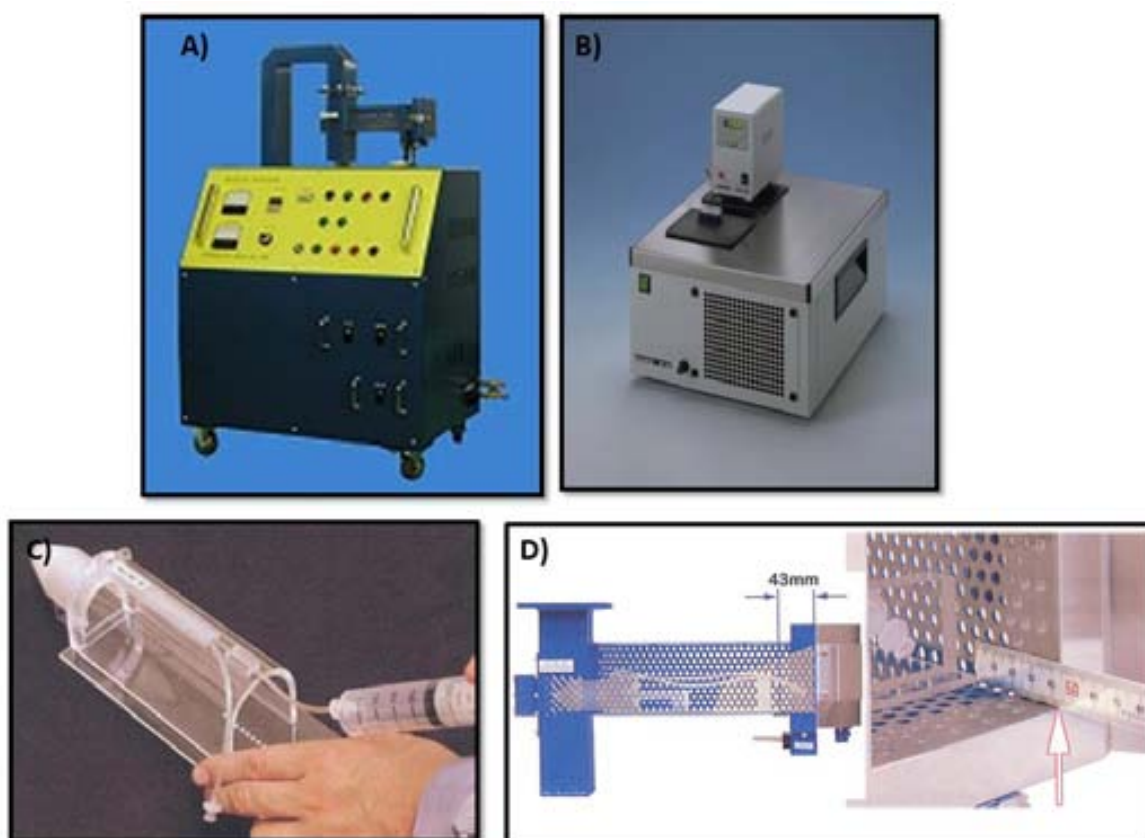


Figura 3.2 A) Aparato de microondas focalizadas Muromachi *microwave fixation system* 5kw. B) Baño de agua recirculante HAAKE DC10-K15. C) *Water - Jacketed mouse holder*, Muromachi, Kikai Co. LTD. Tokyo. D) Colocación del soporte "C" dentro de la cámara de irradiación.

La utilización correcta del FMW para la irradiación de animales o muestras conlleva una serie de pasos que se describen a continuación:

- Puesta en marcha del baño de agua recirculante que evita el sobrecalentamiento del aparato 60 minutos antes de la irradiación (figura 3.2B).

- Preparación del soporte para ratón o rata según la necesidad, vigilando para evitar la formación de burbujas, para lograr una irradiación homogénea (figura 3.2C).
- Anestesia del animal a sacrificar por inhalación de isoflurano en oxígeno 1,5 – 2,5 %.
- Posicionamiento del animal anestesiado (o muestras a irradiar) en el soporte de inserción de éste en la cámara de irradiación (figura 3.2D), respetando la distancia establecida entre éste y la compuerta.
- Irradiación con microondas focalizadas 5Kw durante 1,2 segundos (en el caso de animales como rata y ratón).

3.4 Fijación de biopsias de tejido cerebral o tumoral (humano y ratón) por FMW

Las biopsias (ver también sección 3.5) utilizadas en este estudio (peso promedio de 20 ± 5 mg) se dejaron descongelar lentamente dentro de una caja de Petri sobre hielo, controlando su temperatura mediante un termómetro - sonda (TES *Electrical Electronic Corp*). Al alcanzar los 0° C, se colocaron dentro de un tubo criogénico que se tapó de manera incompleta para permitir el escape del vapor de agua generado a partir del aumento de temperatura debido a la irradiación. Posteriormente, el tubo criogénico que contenía la biopsia se introdujo a su vez en el accesorio para la irradiación de ratón con microondas focalizadas (figura 3.2C). Inmediatamente, se procedió a la irradiación por FMW (5 kW durante 2,6 s), teniendo en cuenta la posición correcta de la biopsia para su irradiación focalizada dentro del tubo criogénico (figura 3.3). El aparato y accesorio de irradiación por microondas focalizadas están optimizados para el tamaño de un ratón y esto debe ser tenido en cuenta para una correcta y homogénea irradiación en el caso de una biopsia mucho más pequeña (figura 3.3). Después de la irradiación, el tubo criogénico con la muestra dentro fue almacenado en nitrógeno líquido para futuros análisis.



Figura 3.3 Esquema del posicionamiento correcto de la biopsia dentro del tubo criogénico (a), éste a su vez dentro del accesorio de ratón para microondas focalizadas (b). El tubo criogénico se mantuvo en su posición correcta dentro del soporte mediante el uso de un fragmento de cinta adhesiva (c).

3.5 Obtención y almacenamiento de muestras

3.5.1 Biopsias de tumores cerebrales humanos

Para este trabajo se utilizaron biopsias de tumores cerebrales humanos provenientes del *Hospital Universitari de Bellvitge*, en colaboración con el equipo de neurocirugía (Dr. Juan José Acebes) de dicho hospital (ver detalle de recogida y almacenamiento de biopsias en anexo 3 y consentimiento informado en el anexo 4).

Previamente a la recogida de las biopsias, los pacientes dieron su consentimiento expreso mediante un documento de consentimiento informado (ver documento tipo en anexo 4) que fue aprobado por el *Comité Ético del Hospital Universitari de Bellvitge*. Las muestras se obtuvieron por craneotomía y fueron recogidas por los neurocirujanos y congeladas en N_2 líquido por el personal del hospital en un plazo máximo de 5 minutos, en un contenedor situado en la misma zona de quirófano. El transporte de las muestras hacia la UAB se hizo en pequeños contenedores de N_2 líquido (Labsystems Taylor-Wharton). Llegados al GABRMN, las biopsias fueron almacenadas en contenedores de N_2 líquido (35VHC Labsystems Taylor-Wharton) permaneciendo en dichas condiciones hasta el momento de su uso (p.e. sección 3.4).

3.5.2 Muestras de tejido cerebral de rata

Un total de 6 ratas (cepa OFA Sprague-Dawley) machos de 8 semanas de edad, con un peso promedio de $294,3 \pm 33,3$ g fueron utilizadas con la finalidad de estudiar por HRMAS los cambios metabólicos producidos tras un episodio de infarto provocado por obstrucción de la arteria cerebral media [113]. Dicho protocolo se llevó a cabo dentro de la colaboración con el grupo *Unitat de Malalties Vasculars Cerebrals* dirigido por el Dr. Joan Martí (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau). Tras la evaluación del infarto utilizando técnicas de IRM y ERM (resultados no descritos en esta Tesis obtenidos por Elena Jiménez), tres de éstos animales fueron sacrificados por FMW (sección 3.3.2), mientras los tres restantes fueron sacrificados por sobredosis de anestesia (sección 3.3.1). Los cerebros fueron reseccionados y almacenados en N₂ líquido para futuros análisis por HRMAS.

3.5.3 Muestras de tejido cerebral de ratón.

3.5.3.1 Evaluación de la influencia del método de sacrificio (irradiación por microondas focalizadas o sobredosis de anestesia), estudiado por espectroscopía HRMAS en el patrón espectral de cerebro de ratón

Para este estudio se utilizaron 6 ratones C57BL/6, hembras de 12 semanas de edad con un peso promedio de $23,6 \pm 3,8$ gramos. Tres de ellos fueron sacrificados por sobredosis de anestesia y los otros tres restantes se sacrificaron por FMW. Inmediatamente después, en ambos casos, se extirpó el cerebro, se congeló y almacenó en N₂ líquido en un intervalo aproximado de 5 ± 1 min, para futuros análisis por HRMAS.

3.5.3.2 Evaluación de la Influencia del método de sacrificio (irradiación por microondas focalizadas o sobredosis de anestesia) en el patrón espectral de tumores GL261 estudiado por espectroscopía HRMAS

En este estudio, se utilizaron un total de 6 hembras C57BL/6 de 12 semanas de edad con peso de $20,5 \pm 2,6$ gramos. Después de la inoculación con

células GL261 de glioma murino (sección 3.2), aproximadamente a los 10 ± 3 días post-inyección los animales fueron explorados por IRM para comprobar la presencia y tamaño estándar del tumor. A continuación, 3 de estos animales se sacrificaron por sobredosis de anestesia, siendo el tumor extirpado y congelado inmediatamente en N_2 líquido (5 ± 1 min) para después ser irradiado (sección 3.4). A consecuencia de ello, se establecieron dos grupos: en uno de los grupos el tumor fue irradiado por microondas focalizadas (sacrificio_Sobredosis $n = 3$) después del sacrificio de los ratones por sobredosis de anestesia (el grupo con $n = 3$ arriba mencionado) y en otro grupo los ratones fueron sacrificados directamente por FMW (sacrificio_FMW $n = 3$).

Tanto las muestras del grupo FMW con las del N-FMW se estudiaron por HRMAS (sección 3.6).

3.5.3.3 Evaluación de la influencia de la irradiación por FMW en la minimización de los cambios en el patrón espectral de tumores GL261 durante experimentos de HRMAS a $37^\circ C$

Se emplearon un total de 12 hembras C57BL/6 de 12 semanas de edad con pesos promedio de $20,5 \pm 2,6$ gramos. Después de la inoculación con células GL261 de glioma murino (sección 3.2), aproximadamente a los 10 ± 3 días post-inyección los animales fueron explorados por IRM para comprobar la presencia y tamaño estándar del tumor. A continuación se sacrificaron los ratones por sobredosis de anestesia, siendo el tumor extirpado y congelado inmediatamente en N_2 líquido (5 ± 1 min). Se establecieron dos grupos de animales: en uno de los grupos el tumor fue irradiado por microondas focalizadas (FMW $n = 6$) y en el otro, los tumores no fueron irradiados (N-FMW $n = 6$).

3.6 Espectroscopía *high resolution magic angle spinning* (HRMAS)

3.6.1 Preparación de muestras y equipo utilizado

Las muestras a analizar fueron fragmentadas (aún en estado congelado) para que su tamaño fuese compatible con el rotor de HRMAS tipo BL4 ZrO_2 de

zirconio (Cortecnet, France), que tiene una capacidad de volumen de muestra de 50 μl y 4mm de diámetro (ver figura 3.4). Dicha fragmentación se llevó a cabo dentro de un mortero con la base sumergida en nitrógeno líquido para mantener la temperatura de congelación.



Figura 3.4 Esquema (izquierda) y fotos del rotor de HRMAS BL4 ZrO_2 y sus accesorios (derecha) para el análisis de muestras por espectroscopía de HRMAS. (A) embudo para cargar la muestra en el rotor ; (B) desenroscador de la tapa del rotor mostrado en F- I; (C) empaquetador de la muestra en el rotor; (D) destornillador para rotor MAS; (E) tornillo cilíndrico para el cabezal; (F-I) de izquierda a derecha: rotor BL4 ZrO_2 , espaciador, tornillo y tapa Kel-F(Kellogg and Fluoropolymer).

Una vez introducida la muestra en el rotor con las herramientas mostradas en la figura 3.4, se añadieron $10,0 \pm 0,5 \mu\text{l}$ de agua deuterada (D_2O 99,97% de Euriso-top, France) en solución salina (0,15 M NaCl) fría, para permitir el “lock” en el análisis de espectroscopía HRMAS. El rotor fue ensamblado de la forma estándar, con el espaciador, tornillo y tapa.

La obtención de los espectros se llevó a cabo en dos equipos distintos según la muestra en estudio: un equipo AV400 con una consola Avancell y una sonda HRMAS $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ (Bruker Española S.A., Madrid, Spain) operando a 9,4T (400 MHz), que se encuentra en el SeRMN de la UAB y un equipo con una sonda HRMAS (MASHR H8812/0007) $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ operando a 11,7 T (500 MHz) que se encuentra en el *Parc Científic de Barcelona* (PCB).

3.6.2 Ajuste del ángulo mágico y calibración de la temperatura de la muestra en el rotor

Angulo Mágico

En la técnica de HRMAS, el ajuste del ángulo mágico es importante para obtener el tipo de espectro que se espera, con la minimización de las interacciones dipolares (ver sección 1.2.2.1). La frecuencia de resonancia de ^{79}Br es muy cercana a la frecuencia de resonancia de ^{13}C , de modo que una ligera re-sintonización del circuito de radiofrecuencia permite detectar su señal con sondas pre-sintonizadas en principio para núcleos de ^{13}C . Así, el uso de KBr sólido permite la obtención de una señal con alta sensibilidad debido a que el ^{79}Br en el KBr tiene un T_1 muy corto, lo que permite repetir la excitación rápidamente y por lo tanto un ajuste óptimo del ángulo al cual se obtienen espectros adecuados. Básicamente, se lleva a cabo una secuencia de adquisición pulsando rápidamente con un tiempo de repetición muy corto (30 ms), y los ajustes del ángulo mágico del rotor se comprueban directamente sobre los espectros obtenidos en este experimento. La figura 3.5 muestra un ejemplo del ajuste del ángulo mágico con la comparación de varios espectros obtenidos en el proceso de ajuste del ángulo hasta llegar al óptimo.

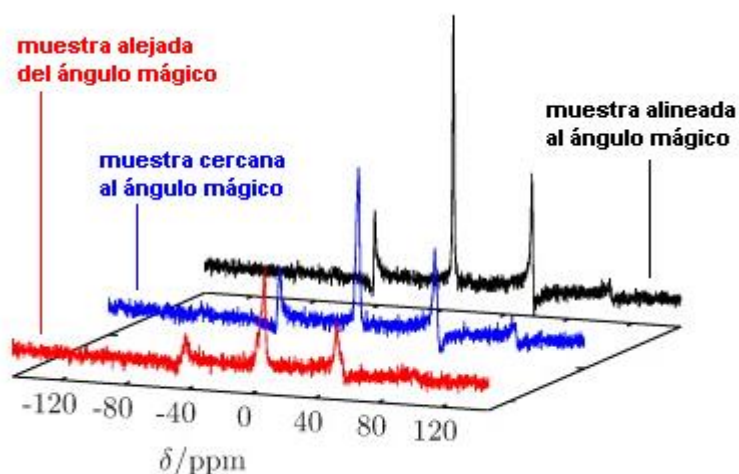


Figura 3.5 Comparación de varios espectros obtenidos en el proceso de ajuste del ángulo hasta llegar al óptimo (en negro) con la altura de la resonancia central maximizada (ver también figuras 4.1 y 4.2 de resultados).

Temperatura

La temperatura de la muestra es un factor importante en este tipo de estudio porque puede producir cambios en el estado físico de algunas estructuras del tejido. Además, contribuye al llamado “ruido térmico” (debido al movimiento browniano), además de poder ser responsable de cambios metabólicos producidos en la muestra como por ejemplo, degradaciones de metabolitos concretos debido a reacciones enzimáticas de velocidad dependiente de la temperatura. Entre el sensor de temperatura de la sonda HRMAS y la temperatura real interna de la muestra hay una cierta diferencia. Por lo tanto, la medición por parte del sensor no es exacta y dicha diferencia debe tenerse en cuenta para poder efectuar la compensación necesaria. El propio movimiento de giro de la muestra produce un ligero aumento de la temperatura en relación al valor que establecemos en la sonda y esto debe ser tenido en consideración. Para calibrar primero, y compensar después esta diferencia se utilizaron sustancias estándar (metanol y etilenglicol) [114], y se midió la distancia entre las señales de los grupos hidroxilo y carboxilo de metanol o etilenglicol a diferentes temperaturas según el controlador del espectrómetro. Tras efectuar éstas medidas, se aplicó la ecuación 3.1 (etilenglicol) o la ecuación 3.2 (metanol) [114], para calcular la temperatura real de la muestra estándar dentro del rotor de HRMAS a las condiciones de giro de interés.

$$T(K) = -101,24 (\Delta\delta) + 466,4 \quad \text{Ecuación 3.1. Calibración de la temperatura para etilenglicol}$$

$$T(K) = -114,83 (\Delta\delta) + 471,85 \quad \text{Ecuación 3.2. Calibración de la temperatura para metanol}$$

Dónde:

T = Temperatura de la muestra en grados Kelvin

$\Delta\delta$ = Diferencia en ppm, entre los singletes CH_3 (metanol)/ CH_2 (etilenglicol) y el grupo funcional OH

Muestras utilizadas:

Muestra 1: 100% etilenglicol, para un rango de temperatura entre 300 y 320 K (equivalente al rango entre 27°C y 47°C)

Muestra 2: 4% de metanol en agua deuterada para un rango de temperatura entre 273 y 301 K (equivalente al rango entre 0°C y 28°C)

3.6.3 Parámetros de adquisición de espectros HRMAS de biopsias

- Velocidad de giro: 3000 Hz en el espectrómetro de 400 MHz y 4000 Hz en el espectrómetro de 500 MHz.
- Ventana espectral: 10 ppm
- Resolución: 16 K puntos (8 K reales).
- Tiempo de reciclaje (TR) total: 4,04 s (2,04 s de tiempo de adquisición y 2 s adicionales).
- Temperatura de la muestra: 37°C o 2°C (según el experimento).
- Número de adquisiciones: 256 en la mayoría de los casos. En los experimentos del estudio de minimización de cambios en el patrón espectral, el número de adquisiciones osciló entre 16 (2 min de tiempo total de adquisición) y 512 (34 min de tiempo total de adquisición) en el caso de los experimentos para detectar las variaciones a lo largo del tiempo.
- Ajuste de la homogeneidad de campo magnético: El *shim* se ajustó hasta que se detectó con nitidez los dobletes de Ala o Lac. Para el doblete de alanina (Ala) y/o lactato (Lac), la subdivisión debida al acoplamiento escalar debía llegar a por lo menos un 80% de la altura máxima de los picos del doblete y fue medido de manera manual en todos los espectros adquiridos.

Las secuencias utilizadas fueron: pulso y adquisición y espín eco a tiempo de eco largo (136ms). Para detalles acerca de los parámetros específicos de cada secuencia, consultar el anexo 5.

3.6.4 Parámetros de adquisición para los estudios *in vivo*

Los estudios *in vivo* de ratones con tumores GL261 y ratas con infarto se llevaron a cabo en un imán horizontal de 7T (BioSpec 70/30, Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania) instalado en el SeRMN 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.

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

Ratón

Los animales fueron colocados en una plataforma adecuada para el escáner y anestesiados con isoflurano 0,5-1,5% (IsoVet, Braun) en O₂ (Carburos Metálicos, España), de manera que su patrón respiratorio se mantuvo a frecuencia constante (60-80 respiraciones por minuto). La temperatura de los animales se mantuvo constante (36,5 - 37,5° C) por medio de un baño de agua recirculante conectado a la plataforma para animales. Las imágenes para comprobar el crecimiento y evolución del tumor se adquirieron en el plano coronal ponderadas en T₂ (TR/TE_{eff}= 4200/36ms).

Rata

Las ratas se anestesiaron en una caja de inducción con una dosis del 4% de Isoflurano en oxígeno y, una vez introducidas en el escáner en el soporte correspondiente, se adquirieron imágenes en los 3 planos: coronal, sagital y axial ponderadas en T₂ (TR/TE_{eff}= 4200/36ms). Estas imágenes nos proporcionaron información sobre el tejido cerebral de la zona que después sería utilizada en los estudios posteriores de HRMAS.

3.6.5 Procesamiento de los espectros de HRMAS adquiridos

El procesamiento de los datos se llevó a cabo con el software TopSpin 1.3 (Bruker Daltonik, GmbH) y MestreNova 5.2. (Universidad de Santiago de Compostela, España).

Una vez adquiridos los espectros en el dominio del tiempo (FIDs), se aplicó la transformada de Fourier, seguida de una corrección de fase de orden cero y uno. A continuación, se hizo el ajuste de la línea de base y por último, se hizo la calibración del espectro tomando como referencia la señal de Cr a 3,030 ppm. Realizados éstos ajustes, los espectros se exportaron en el formato ASCII para su posterior post procesado en la región de interés entre 0,5 – 4,5 ppm.

La normalización de las alturas en la región mencionada fue llevada a cabo utilizando la estrategia *unit length* (UL2) (ecuación 3.3) donde x es cada punto individual del vector espectral en el rango de interés considerado en nuestro caso (0,5 – 4,5 ppm) y x' es el punto normalizado.

$$x' = \frac{x}{\sqrt{\sum x^2}} \quad \text{Ecuación 3.3. Normalización a } \textit{unit length} \text{ (UL2)}$$

A continuación, se calcularon los espectros promedio de las diferentes clases y o condiciones experimentales. Se calculó el promedio y la desviación estándar para cada punto de cada clase y se graficó representando los nuevos datos normalizados. Tanto la normalización como el cálculo de espectros promedio se llevaron a cabo con módulos de software desarrollados previamente en el GABRMN con el programa R2.9.1 [115].

3.7 Evaluación histopatológica de muestras después de su análisis por espectroscopía HRMAS

Se fijaron las muestras sometidas a estudio por HRMAS durante un periodo de entre 6 y 24 horas en 20 volúmenes de formaldehído al 4% tamponado a pH = 7, a temperatura ambiente. Las muestras fijadas se incluyeron posteriormente en parafina y de cada una se hicieron entre 5 y 6 cortes de 5 micras de espesor que se tiñeron con hematoxilina-eosina. Finalmente, se observaron al microscopio óptico. De cada muestra se intentaron evaluar tres parámetros:

- Porcentaje de tejido necrótico
- Porcentaje de células tumorales
- Tipo y grado tumoral

Estos análisis se llevaron a cabo en colaboración con el Dr. Martí Pumarola de la Unidad de Patología Murina *del Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica* (CBATEG) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Para los estudios donde se utilizaron biopsias de tumores cerebrales humanos provenientes del *Hospital Universitari de Bellvitge*, se accedió al diagnóstico histopatológico original de cada paciente en la base de datos del hospital en colaboración con el Dr. Alejandro Fernández Coello. Las láminas histopatológicas para el análisis post HRMAS se obtuvieron en el servicio de anatomía patológica en colaboración con la Dra. Susana Boluda.

3.8 Microscopía electrónica de muestras después de su análisis por espectroscopía HRMAS

Las muestras para el estudio de la influencia del método de irradiación por microondas focalizadas en el patrón espectral de tumor murino GL261 por espectroscopía HRMAS (sección 3.5.3.2) fueron analizadas por microscopía

electrónica. Se fijaron 24 horas en paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2,5%. Después se fijaron químicamente con tetróxido de osmio 1% más $K_4(Fe(CN)_6)$ al 0,08% y se llevó a cabo una deshidratación con acetona a baja temperatura. Por último, se obtuvieron cortes semi finos ($1\mu m$) con un ultramicrotomo Leica EM UC7.

El microscopio electrónico utilizado en microscopía electrónica de transmisión fue un El JEM-1400 de 120 kV de alto rendimiento y contraste (*Servei del Microscòpia de la UAB*).

3.9 Análisis estadístico de los datos

El cálculo de significación estadística que se realizó para el estudio de la influencia del FMW en el patrón espectral de tejido cerebral de ratón fue el test t-Student, haciendo una comparación entre métodos de sacrificio (sobredosis de anestesia vs. FMW) usando como variables las alturas normalizadas de distintos metabolitos en los espectros.

Para el estudio sobre la minimización de los cambios en el patrón espectral mediante FMW, durante experimentos a $37^{\circ} C$ se llevó a cabo el test Unianova con la finalidad de evaluar las diferencias entre los grupos de muestras irradiadas y no irradiadas y los cambios observados a lo largo del tiempo. Así, se aplicó un modelo lineal general a las señales (alturas normalizadas) de los metabolitos de interés en los espectros.

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa SPSS 17 (SPSS, Chicago, IL, USA) y el nivel de significación se fijó en $p < 0,05$ y tendencia a significación en el rango de $0,1 < p < 0,05$.

3.10 Análisis de los espectros de HRMAS mediante metodologías de reconocimiento de patrones

Los clasificadores para distinguir entre los casos de Glioblastoma Multiforme (GBM) y Meningioma (M) fueron desarrollados con el programa *SpectraClassifier* v.3.0.09 [93] (<http://gabrmn.uab.es/sc>). Los espectros adquiridos a diferentes temperaturas y secuencias de adquisición se utilizaron para generar los distintos clasificadores. El rango espectral utilizado como *input* para los espectros HRMAS fue de 4,5 ppm a 0,5 ppm. Además, se llevó a cabo una correcta referenciación a la resonancia de la Cr (N-CH₃) a 3,030 ppm para evitar artefactos al realizar la selección de variables y cálculo del clasificador.

Selección de variables

Para cada uno de los clasificadores se seleccionó entre 2 y 100 variables como primer paso para encontrar el número óptimo de éstas. Se debe tener en cuenta la recomendación de que el número de variables no debería superar el valor de un tercio del número de casos del grupo más pequeño, para evitar un sobreentrenamiento [116]. Este consiste en la posibilidad de producir un error aleatorio porque el criterio utilizado para entrenar el modelo no es el mismo que el criterio utilizado para juzgar la eficacia del éste. Se entrena un modelo típicamente mediante la maximización de su rendimiento en un conjunto de datos de entrenamiento. Sin embargo, su eficacia no está determinada por su desempeño en los datos de entrenamiento, sino por su capacidad para desempeñarse bien en los datos de testeo, y la correcta selección de variables contribuiría a ello.

Las variables corresponden a características espectrales (alturas normalizadas) seleccionadas mediante el método SFFS, o bien un conjunto de variables correlacionadas, que correspondería al método de selección PCA.

Generación de los clasificadores

Tras seleccionar las variables que producían el mejor resultado posible, se generó un clasificador utilizando el método de LDA. La proyección de las variables canónicas derivadas del LDA definió un espacio latente bidimensional donde se representaban simultáneamente los casos de entrenamiento y de testeo.

Evaluación de los clasificadores

Los primeros clasificadores se realizaron con el objetivo de comprobar la reproducibilidad de estudios previos llevados a cabo en el grupo. Se desarrollaron mediante el programa *SpectraClassifier* y se evaluaron inicialmente con el método LOO; después de ello, todos los clasificadores fueron también evaluados por el método de *bootstrapping* [95] con 1000 repeticiones. Además, se generó una matriz de confusión (figura 3.6) y se calculó el BER para el grupo de testeo, definido por el promedio de error obtenido en cada clase o grupo (ecuación 3.4) siguiendo lo descrito en [97]. Estos parámetros sirvieron para evaluar las características descriptivas y predictivas de cada clasificador.

		Predicción	
		Clase A	Clase B
Real	Clase A	a	b
	Clase B	c	d

Figura 3.6. Ejemplo de una matriz de confusión donde a, b, c y d representan el número de ejemplos que se hallan en cada resultado de la combinación entre clase verdadera y clase predicha (a,b,c,d) por el clasificador.

$$BER = 0,5 \times \left(\left(\frac{b}{(a+b)} \right) + \left(\frac{c}{(c+d)} \right) \right) \quad \text{Ecuación 3.4. Balanced error rate (BER)}$$

Siendo a, b, c y d, el número de casos de cada clase predichos en la matriz de confusión de la figura 3.6.

Otro método de evaluación de los clasificadores fue el análisis de curvas ROC. Para cada grupo de entrenamiento y cada clasificador, se analizaron las tasas de verdaderos positivos versus falsos positivos, que se han transformado en valores de área bajo la curva. Sin embargo, el parámetro que más peso tuvo en la optimización del clasificador fue el BER, calculado para el conjunto de testeo independiente.

El tiempo utilizado en el desarrollo de cada clasificador, utilizando un ordenador con 2,33 GHz de CPU (unidad central de procesamiento) y 8 GB (gigabytes) de RAM (*random access memory*), fue de 30 minutos para el método de selección de variables PCA y 48 horas para el método de selección de variables SFFS. El análisis por LDA y la generación del espacio latente representando los grupos de entrenamiento y de testeo requirió mucho menos tiempo (alrededor de 1 min).

3.10.1 Control de calidad para la selección de los espectros a utilizar en el desarrollo de clasificadores

Los datos espectrales utilizados para desarrollar los clasificadores mediante *SpectraClassifier* se sometieron a un control de calidad con el objetivo de obtener un clasificador lo más robusto posible, además de proceder a la eliminación de casos con posibles artefactos o mala homogeneidad. No obstante, a lo largo del desarrollo de esta tesis se realizaron clasificadores con ambos tipos de datos (con y sin control de calidad previo). Para más detalles ver la sección de resultados.

Para llevar a cabo dicho control de calidad, todos los espectros se procesaron como se describió en la sección 3.6.5. A continuación, se comprobó la

calibración por la señal de creatina a 3,030 ppm, se representó la zona de interés, entre 0,5 y 4,5 ppm y se calculó la relación señal ruido (SNR signal-to-noise ratio) automáticamente con el programa topspin utilizando la señal de Cr para definir “señal”, y la zona de 2,75 – 2,88 ppm para definir “ruido”. Los expertos espectroscopistas (C.A., 35 años de experiencia en espectroscopía de RMN de biomoléculas biológicas, y A.P.C., 13 años de experiencia en espectroscopía de RMN con el grupo GABRMN) tuvieron acceso a estos espectros impresos y los valoraron de manera independiente como aceptables o no aceptables de manera visual (ausencia de artefactos, homogeneidad aceptable). En caso de discrepancia, se volvieron a revisar de manera conjunta hasta consenso para su aceptación o descarte.

Una vez realizado el control de calidad, los espectros considerados aceptables fueron utilizados como *input* para el desarrollo de clasificadores con el programa *SpectraClassifier*.

3.10.2 Desarrollo de los clasificadores

Se desarrollaron distintos clasificadores según el objetivo y las muestras accesibles para ello. Las tablas 3.1 a 3.4 contienen el número de casos utilizados en cada clasificador.

Clasificadores utilizando casos de biopsias de tumores cerebrales humanos adquiridos a 11,7T

Estudio 1: comprobar la capacidad discriminante del programa *SpectraClassifier* desarrollado en el GABRMN.

- Reproducibilidad mediante el programa *SpectraClassifier* de estudios previos llevados a cabo en el grupo [117]

Conjunto	Glioblastomas	Meningiomas
Entrenamiento	10	10
Testeo	4	3

Tabla 3.1. Número de casos incluidos en el desarrollo del clasificador de reproducibilidad, mediante el programa *SpectraClassifier*, de estudios previos en el grupo.

La temperatura de adquisición de los espectros HRMAS fue de 2° C y la secuencia utilizada fue la de pulso y adquisición. El método para la selección de variables fue el de análisis de componentes principales (PCA) y el método de evaluación en el conjunto de entrenamiento fue el LOO.

Evaluación del efecto de la temperatura y la secuencia de adquisición en la robustez de clasificadores desarrollados mediante el *SpectraClassifier*

Estudio 2: comprobar los posibles efectos discriminatorios de diferentes temperaturas y secuencias de adquisición, así como el del aumento en la población de casos de entrenamiento.

- Pulso y adquisición 2° C
- Pulso y adquisición 37° C
- Espín eco 2° C
- Espín eco 37° C

Conjunto	Glioblastomas	Meningiomas
Entrenamiento	31	16
Testeo	16	9

Tabla 3.2. Número de casos incluidos en el proceso de obtención de clasificadores desarrollados con distintas temperaturas y secuencias de adquisición.

El método de selección de variables fue el SFFS y el método de evaluación para la bondad de los clasificadores obtenidos con el conjunto de entrenamiento fue el *bootstrapping*, mientras que para el conjunto de testeo el método de validación fue el BER.

Evaluación del efecto de la temperatura y la secuencia de adquisición en la robustez de clasificadores desarrollados después de llevar a cabo el análisis histopatológico post HRMAS y el control de calidad espectral

Estudio 3: comprobar los posibles efectos discriminantes cuando se llevó a cabo una validación previa de los casos mediante diagnóstico post HRMAS y control de calidad.

- Pulso y adquisición 2° C
- Pulso y adquisición 37° C
- Espín eco 2° C
- Espín eco 37° C

Conjunto	Glioblastomas	Meningiomas
Entrenamiento	15	10
Testeo	7	6

Tabla 3.3. Número de casos incluidos en el proceso de obtención de los clasificadores desarrollados con la validación previa mediante diagnóstico post HRMAS y control de calidad.

El método de selección de variables fue el SFFS y el método de evaluación para el conjunto de entrenamiento fue el *bootstrapping*, mientras que para el conjunto de testeo el método de evaluación fue el BER.

Los casos seleccionados para el estudio 2 se encuentran descritos en el anexo 6 de esta tesis y, concretamente para este estudio 3, dicha selección se llevó a cabo en base al control de calidad descrito en la sección 3.10.1.

Clasificadores utilizando casos de biopsias de tumores cerebrales humanos adquiridos a 9,4T

Estudio 4: comprobar los posibles efectos discriminatorios en biopsias humanas con y sin irradiación por FMW.

Para desarrollar este clasificador fue necesario trabajar con muestras lo suficientemente grandes para dividir las en dos y posteriormente irradiar una parte con FMW y la otra no (ver esquema en la figura 3.7). La temperatura de adquisición fue de 37° C y las secuencias de adquisición utilizadas fueron las de pulso y adquisición y espín eco a 136ms. El método de selección de variables fue el SFFS y el método de evaluación para el conjunto de entrenamiento fue el *bootstrapping*, mientras que para el conjunto de testeo el método de evaluación fue el BER. Todos los casos utilizados en estos clasificadores fueron sometidos a control de calidad según lo descrito en la sección 3.10.1.

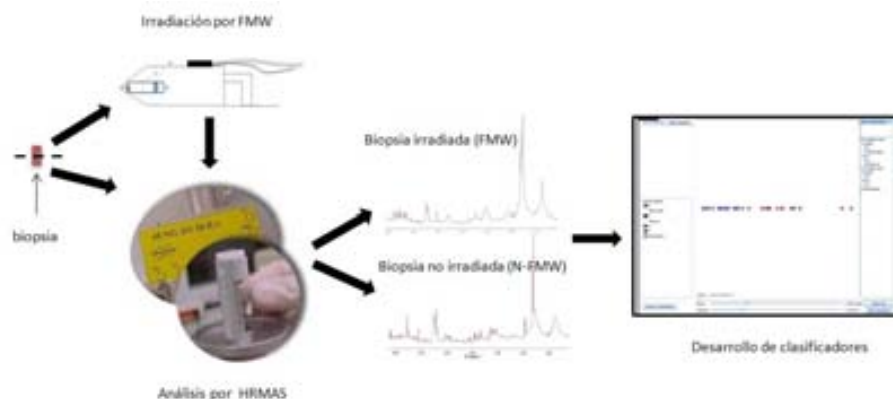


Figura 3.7. Esquema del desarrollo de clasificadores utilizando muestras irradiadas (FMW) y no irradiadas por FMW (N-FMW). La biopsia se dividía en dos y una parte de ella se irradiaba por FMW (FMW), mientras la otra parte no se irradiaba. Posteriormente se adquirían sus respectivos espectros por HRMAS y se desarrollaba el clasificador.

Conjunto	Glioblastomas	Meningiomas
Entrenamiento	12	12
Testeo	6	6

Tabla 3.4. Número de casos incluidos en conjunto para el desarrollo de los clasificadores de biopsias cerebrales humanas con y sin irradiación de FMW.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ajuste del ángulo mágico y calibración de la temperatura

Ángulo mágico

El espectro obtenido en el experimento del ajuste del ángulo mágico con KBr a 9,4 T a una velocidad de giro de 6000 Hz se muestra en la figura 4.1. Todas las señales estrechas vistas en el espectro indican que el ajuste se ha realizado correctamente, lo que es imprescindible para luego obtener un estrechamiento adecuado de las resonancias de interés en los espectros de biopsias. Este resultado es consistente con experimentos realizados por otros autores y también por el fabricante del escáner tal y como se muestra en la figura 4.2 [118,119].

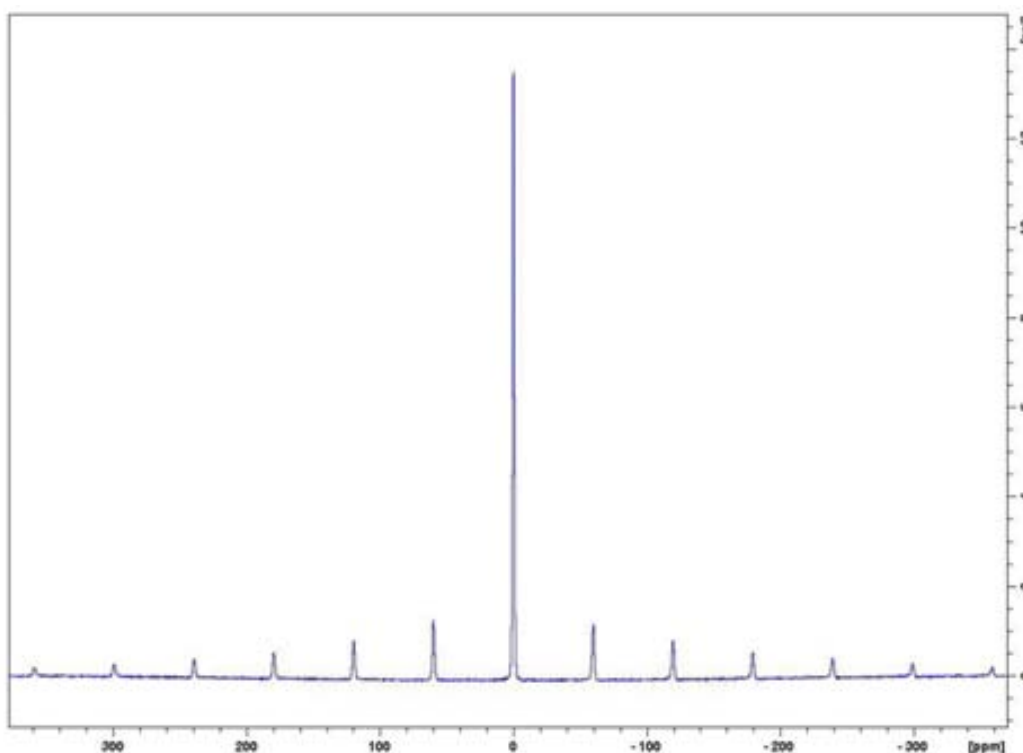


Figura 4.1. Espectro de ^{79}Br , de bromuro de potasio (KBr) sólido utilizado para el ajuste del ángulo mágico, con los siguientes parámetros de adquisición: ventana espectral de 749 ppm, TD de 2K, velocidad de giro de 6000 Hz y 1 excitación a 9,4T.

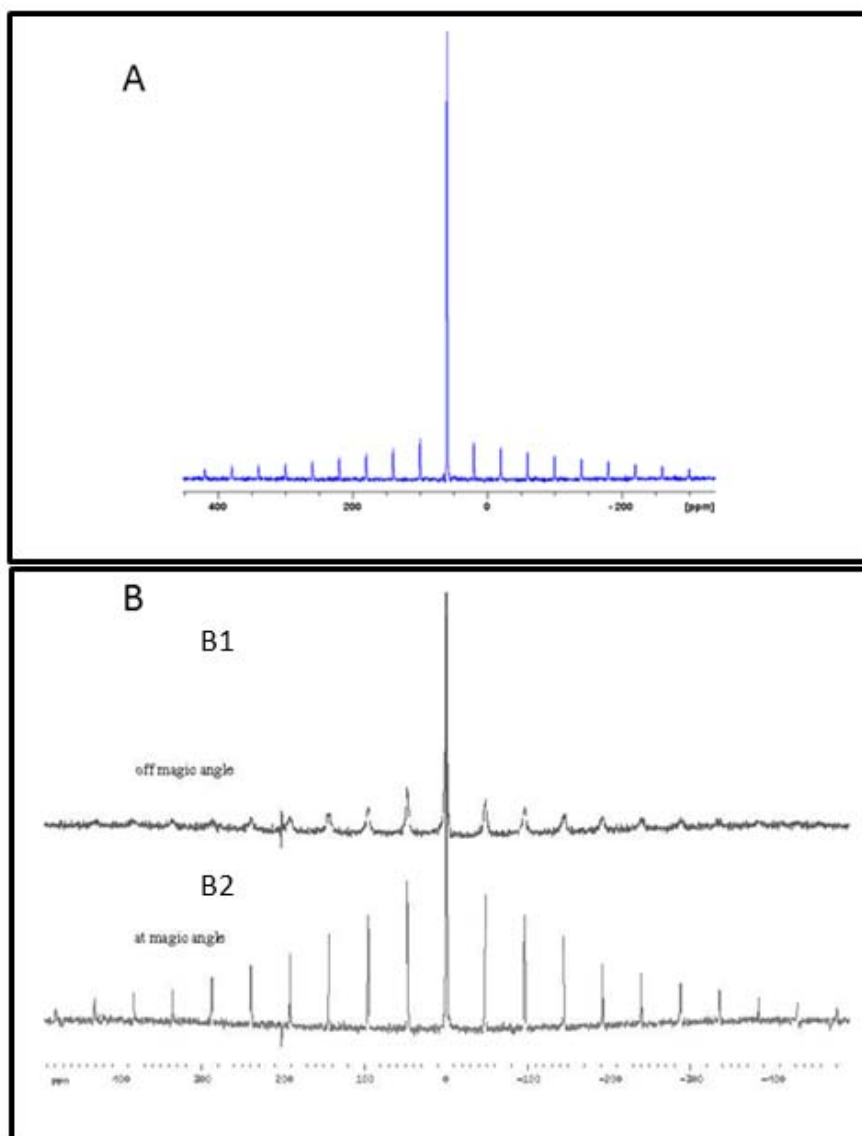


Figura 4.2 Espectro de KBr utilizado para el ajuste del ángulo mágico realizado por (A) Hebrew University of Jerusalem y (B) el fabricante del espectrómetro de RMN utilizado en esta tesis (Bruker Biospin) donde se muestra el aspecto del espectro obtenido cuando no se encuentra (B1) y cuando se encuentra (B2) correctamente ajustado el ángulo mágico.

Calibración de la temperatura de la muestra girando al “ángulo mágico”

Se adquirieron un total de 20 espectros de etilenglicol a temperaturas altas (entre 300 y 320 K), mientras que 38 espectros de metanol deuterado fueron adquiridos a temperaturas bajas (entre 273 y 301 K). Para facilitar una visualización de los cambios de desplazamiento químico registrados, los espectros se han representado superpuestos, como se muestra en la figura 4.3. Dichos espectros fueron adquiridos a 9,4T con una velocidad de giro de 3000 Hz y 1 excitación.

La distancia entre las resonancias fue aplicada a las ecuaciones 3.1 y 3.2 (ver sección 3.6.2) dando por resultado las gráficas de la figura 4.4 que representan la relación entre la temperatura ajustada en la sonda *versus* la temperatura real de la muestra estándar. Con estos datos, es posible establecer la ecuación que nos indica qué temperatura debemos programar en un experimento para lograr la temperatura deseada en la muestra.

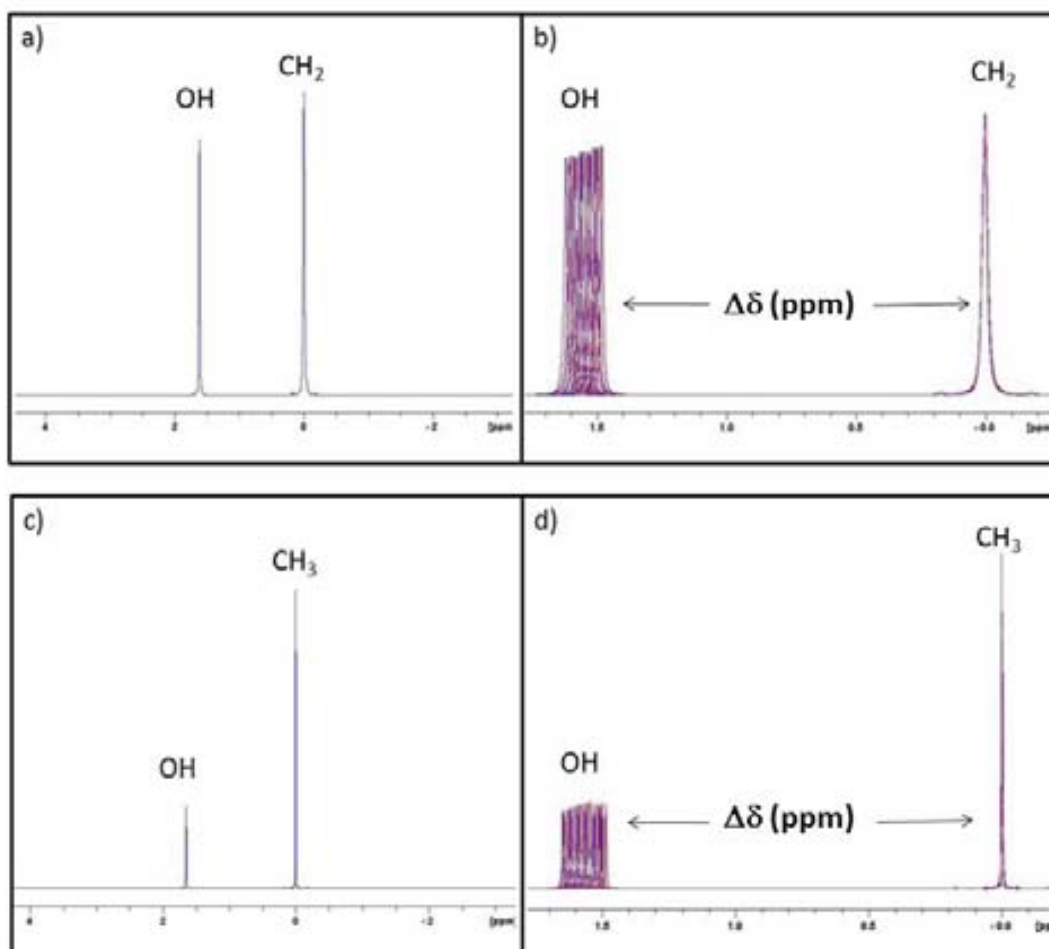


Figura 4.3. a) Espectro de calibración de la temperatura en el rotor HRMAS con etilenglicol a 300K. b) Superposición de espectros de etilenglicol obtenidos a distintas temperaturas. c) Espectro de calibración de la temperatura en el rotor HRMAS con metanol a 273K. d) Superposición de los espectros de metanol obtenidos a diferentes temperaturas.

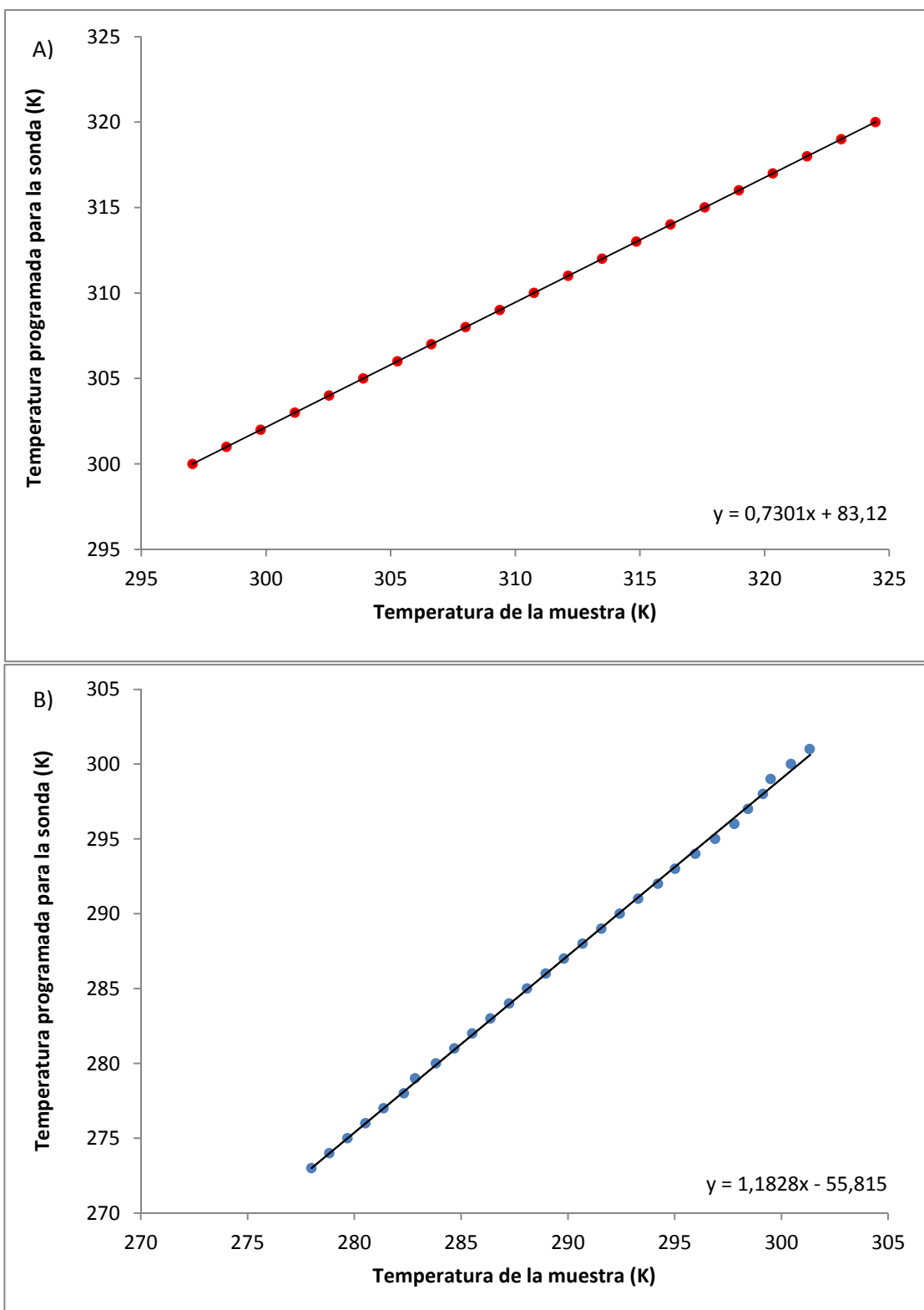


Figura 4.4. a) Gráficas representando la correlación entre la temperatura ajustada en el controlador de temperatura del espectrómetro de RMN para la sonda de HRMAS (ordenadas) y la temperatura real de la muestra (abscisas) con A) etilenglicol y B) metanol para la velocidad de giro de 3000 Hz.

4.2 Estudio de la influencia del método de sacrificio (irradiación con microondas focalizadas vs. sobredosis de anestesia) en el patrón espectral por HRMAS de cerebro de ratón

En la tabla 4.1 se observan los resultados cuantitativos obtenidos con el cálculo del área resultante de la integración de cada metabolito de interés y la significación estadística de la comparación entre los dos métodos de sacrificio. Estas áreas fueron normalizadas con referencia al área de resonancia de lípidos móviles a 0,90 ppm, suponiéndola constante en las condiciones evaluadas [117]. De acuerdo con éstos resultados podemos confirmar lo descrito anteriormente conforme a la apariencia de los resultados cualitativos en la figura 4.5, es decir, encontramos diferencias estadísticamente significativas en metabolitos relacionados con cambios *postmortem* como el Lac, Ace y PCr, aunque la creatina total (creatina + fosofocreatina) permaneció constante, como cabría esperar. También se ha detectado una disminución de taurina en el casos de sobredosis de anestesia [120]. Por otra parte, el aumento del acetato, con significación estadística, es consistente con la disminución concomitante del NAA con tendencia a la significación ($0,1 > p > 0,05$) y sería debida a la degradación de NAA en acetato y aspartato en condiciones isquémicas por acción de la enzima N-acetil-L-aspartato amidohidrolasa tal y como ha sido descrito por otros autores en homogenados de tejido cerebral [15].

Rango de integración (ppm)	Metabolito	FMW	Sobredosis de anestesia	Significación estadística (p)
1,05 - 0,70	Lípidos móviles	1	1	-
1,40 - 1,20	Lactato	0,24 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,002*
1,50 - 1,42	Alanina	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,129
1,92 - 1,90	Acetato	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,035*
2,02 - 2,00	N-acetil aspartato	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,080 ‡
2,38 - 2,31	Glutamato	0,74 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,070 ‡
2,46 - 2,42	Glutamina	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,323
3,05 - 3,02	Creatina + Fosfocreatina	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,445
3,44 - 3,39	Taurina	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,048*
3,56 - 3,53	Myo-Inositol	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,102
3,92 - 3,91	Creatina	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,121
3,94 - 3,93	Fosfocreatina	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,004*

Tabla 4.1. Cálculo del área normalizada (\pm SD) a ML a 0,9 ppm de las principales resonancias de metabolitos de interés en espectros de ambos grupos: sacrificados por irradiación de FMW (FMW) (n=3) y sacrificados por sobredosis de anestesia (n=3). Significación estadística (*) $p < 0,05$, y tendencia a la significación (‡) cuando $(0,1 > p > 0,05)$.

Los espectros adquiridos de las muestras de ratones sacrificados tanto por el método de sobredosis de anestesia como por irradiación de FMW presentaron buena calidad y resolución espectral, siendo directamente comparables a espectros adquiridos en trabajos previos de nuestro grupo para éste tipo de muestras [80,81]. Dichos espectros se muestran en la figura 4.5.

Las asignaciones de los metabolitos se llevaron a cabo según Valverde-Saubí y col. [117] para sacrificio de ratones por sobredosis de anestesia y Simoes y col. [80] para sacrificio por irradiación por FMW. En la misma línea de lo descrito por otros autores [121], en la figura 4.5 se observa un patrón espectral de HRMAS que refleja los cambios post mortem producidos por el método de sobredosis de

anestesia, por ejemplo, los asociados con la existencia de glicolisis anaeróbica (aumentos de alanina y lactato), con respecto al sacrificio por FMW.

Los tejidos se deterioran de diferentes maneras y dependiendo del tipo de tejido en cuestión (ej. tejido tumoral vs. tejido normal) y del tiempo *post mortem* transcurrido, y por ello las consecuencias observadas en su patrón metabólico pueden ser muy variables. Sin embargo, se sabe que un intervalo de tiempo aunque sea corto (5 min entre la resección de la biopsia y su criopreservación) es suficiente para desarrollar condiciones anóxicas que producen variaciones en la concentración de algunos metabolitos [122]. En los espectros obtenidos en el desarrollo de este experimento (figura 4.5A), se puede observar el agotamiento de los recursos de reservorio energético, como por ejemplo la nula señal de fosfocreatina (PCr), así como el acúmulo de lactato que depende del consumo de glucosa y aumenta en regiones de hipoxia [123].

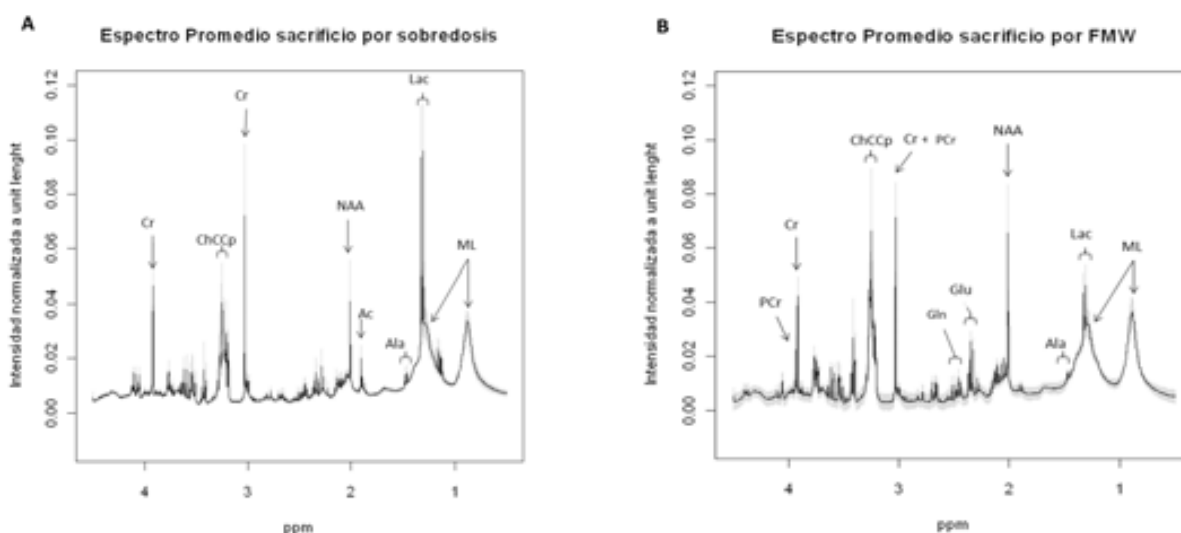


Figura 4.5. Espectro promedio (trazo en negro) y desviación estándar (en gris) de las muestras de tejido cerebral de ratón obtenidos a 37° C por HRMAS con algunas asignaciones de metabolitos de interés. A) sacrificio por sobredosis de anestesia (n=3), B) sacrificio por irradiación FMW (n=3). Para más detalles sobre asignaciones principales ver anexo 1.

Además, en los espectros obtenidos por el método de sacrificio por sobredosis se observan otros signos de degradación aparente, por ejemplo, la aparición de señales de aminoácidos como lisina, leucina alrededor de 0,9 – 1,0 ppm, probablemente debido al periodo de isquemia transcurrido entre la resección de la muestra y la congelación para su almacenamiento hasta el análisis por HRMAS [124]. Es importante tener en cuenta también los factores relacionados con

la temperatura, tiempo de adquisición o velocidad de giro de dicha adquisición. Así, se observan cambios en las proporciones relativas de las señales de N-acetil aspartato y acetato, ambos relacionados entre sí en concentraciones aparentemente similares a las descritas para biopsias humanas debido al metabolismo *post mortem* [121]. También se observa que la señal de taurina (Tau) aumenta, estando relacionada con el periodo de metabolismo anóxico. Este metabolito también está implicado en el mecanismo de protección (que ejerza un efecto antioxidante) y además ligado a la estabilización de la membrana y la inhibición de la neurotransmisión [125].

Por otro lado, los espectros adquiridos de las muestras de ratones sacrificados por irradiación FMW (figura 4.5B) son consistentes con los resultados publicados por otros autores [126-128], en donde se observa una baja señal de Lac, una detección evidente de PCr y ausencia de degradación de NAA hacia aspartato y acetato, todos estos detalles cualitativos indicadores de ausencia de cambios *post mortem* cuando se utiliza el FMW en comparación con la sobredosis de anestesia.

Al comparar los dos métodos de sacrificio (irradiación por FMW y sobredosis de anestesia), el primer resultado llamativo viene de señales de metabolitos asociados con la isquemia y la degradación *post mortem* [121]. Así las alturas de algunos metabolitos (Lac, Ac, Cr) fueron más bajas aparentemente en los espectros adquiridos al sacrificar los animales por irradiación FMW (4.5B). La ausencia de la señal de PCr en los espectros de sacrificio por sobredosis (figura 4.5A) confirma el consumo de este compuesto durante la primera etapa de isquemia probablemente necesario para intentar mantener el nivel de ATP mediante la reacción catalizada por la creatina quinasa [126]. Estos resultados son coherentes con los de otros autores [127,129,130,128] que han utilizado el sacrificio por irradiación de microondas para una mayor estabilidad de patrón metabólico en biopsias de tejido cerebral durante experimentos realizados por HRMAS.

En resumen, esta sección del estudio ha puesto de manifiesto la eficiencia del sacrificio del ratón por irradiación por FMW, con respecto al mantenimiento del patrón espectral durante posteriores análisis por HRMAS a temperatura fisiológica, en comparación con el método de sacrificio por sobredosis de anestesia.

4.3 Uso de la técnica de irradiación por microondas focalizadas (FMW) como método de sacrificio para evitar el metabolismo *post mortem* del cerebro de rata (control y post-infarto cerebral)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para ratón *wild type* en la sección 4.2, donde se confirmó que mediante la irradiación por FWM se minimizaban significativamente los cambios *post mortem* observados en tejido cerebral estudiado por HRMAS, se decidió aplicar dicho método de sacrificio en el modelo experimental de infarto cerebral en rata en colaboración con Elena Jiménez y el Dr. Joan Martí de la *Unitat de Malalties Vasculares Cerebrals del Hospital de la Santa Creu y Sant Pau* de Barcelona.

En la figura 4.6 se observan los resultados de la IRM obtenida con uno de los animales utilizados en este estudio. Dichos resultados son consistentes con lo descrito por otros autores [131,132], mostrando una zona hiperintensa a un día y a siete días después del infarto en la zona afectada por la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (sección 3.5.2). Se trataba de un modelo experimental de isquemia focal que solo afectaba a un hemisferio de modo que el hemisferio contralateral pudo ser utilizado como control.

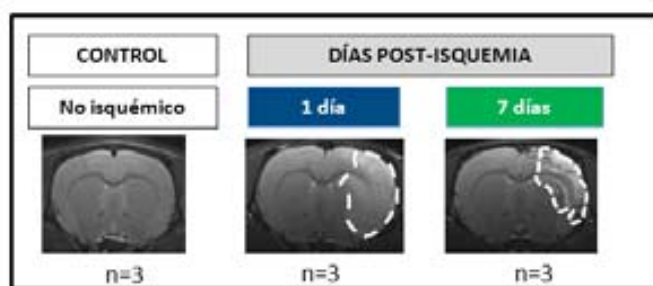


Figura 4.6. IRM in vivo ponderada en T₂ (TR/TE = 4200/36 ms) en el plano axial del cerebro de una de las ratas utilizadas en este estudio, adquiridas a 7T. La línea blanca muestra el tamaño de daño a un 1 día y 7 días post isquemia. Cortesía de Elena Jiménez.

El resultado de los datos adquiridos por HRMAS del tejido cerebral de 3 ratas después de 7 días del infarto cerebral, y sacrificadas por irradiación FMW, se observa en la figura 4.7. Los cambios observados en las señales relacionadas con la isquemia son coherentes con trabajos realizados por espectroscopía de RMN de

extractos de tejidos y ^1H ERM a 14,7 T publicados por Yang y colaboradores [120], y Lei y colaboradores [133] respectivamente. Estos resultados concuerdan, por ejemplo, con que la perturbación debido a una reducción brusca de flujo sanguíneo en el cerebro juega un papel importante en la activación de la glicólisis anaeróbica cerebral.

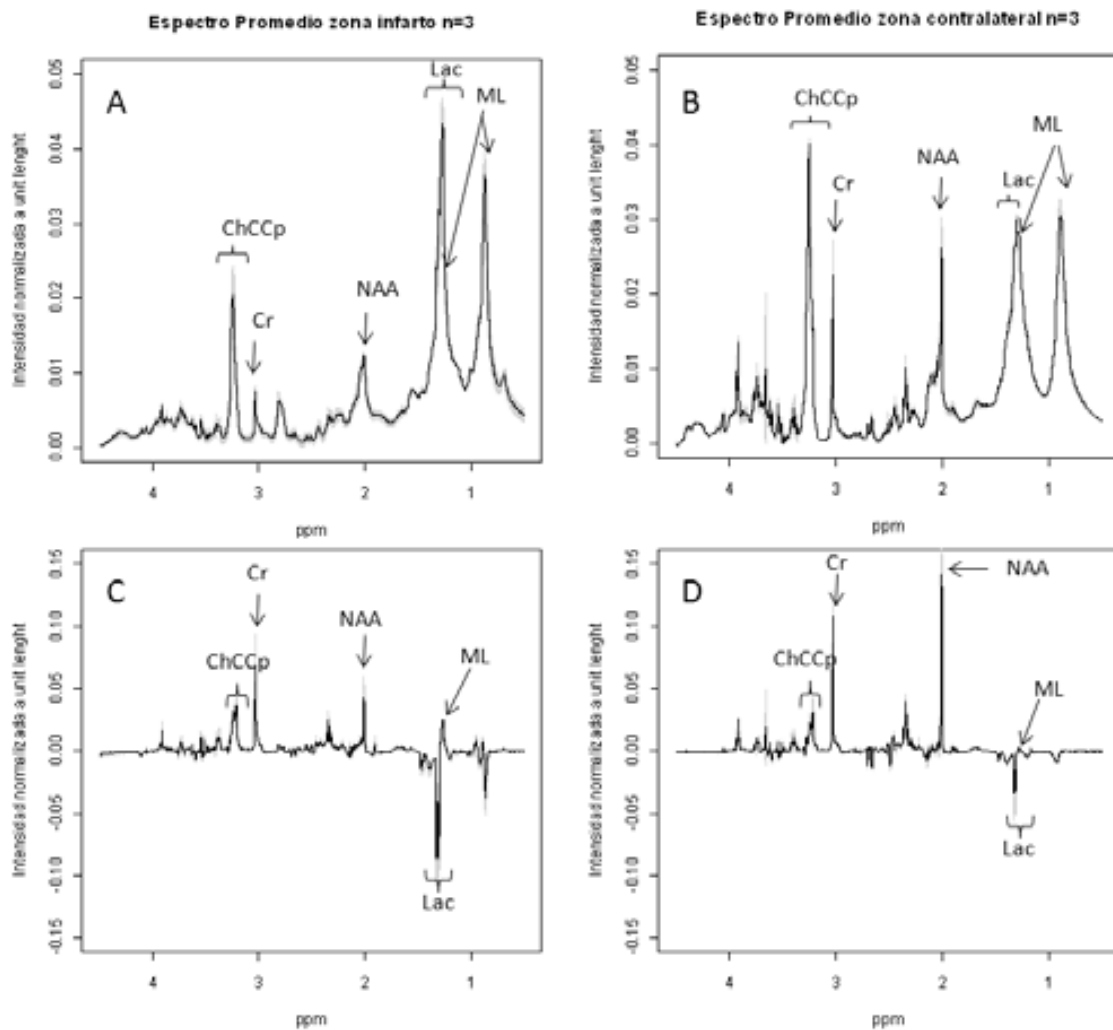


Figura 4.7. Espectros promedio (trazo en negro) y, desviación estándar (en gris) ($n = 3$) de muestras de tejido cerebral de rata con infarto sacrificada por irradiación de FMW, obtenidos a 37°C por HRMAS a 9,4T con algunas asignaciones de metabolitos de interés (ver anexo 1). (A) Secuencia de pulso y adquisición de muestras de la zona de infarto (B) secuencia pulso y adquisición de la zona contralateral (C) secuencia espín eco $\text{TE} = 136\text{ms}$ zona de infarto (D) secuencia espín eco $\text{T}=136\text{ ms}$ de zona contralateral.

La figura 4.8 muestra un espectro promedio de 3 muestras de tejido cerebral de rata sacrificadas por irradiación FMW. Dichas muestras provienen de tejido contralateral de cerebro sometido al procedimiento de isquemia, 1 día post

infarto. Se puede observar un cociente de las alturas para las señales del grupo N-CH₂ de PCr/Cr de $0,80 \pm 0,1$, el cual es bastante cercano al publicado por otros autores como Lei y colaboradores [133] y Tkac y colaboradores [134], llevados a cabo para estudios *in vivo*. Dichos autores obtuvieron cocientes de concentraciones de $0,90 \pm 0,1$ y $0,93$ respectivamente, lo que se acerca mucho a lo obtenido en esta tesis. Por otro lado, nuestro valor es superior al valor descrito por Detour y colaboradores [127] para técnicas basadas en irradiación de FMW seguida de la adquisición HRMAS, que observaron un valor de $0,30$ para dicho cociente de concentraciones. Los autores en [127] sacrificaron en su estudio las ratas con FMW con una potencia de 4kW y describieron poca cantidad de Lac, comprobando además la estabilidad de la señal de GABA, en comparación con muestras de animales sacrificados por sobredosis de anestesia. En relación a esto, nuestros resultados son similares y apuntan a que GABA no aumenta en condiciones *post mortem* y que la poca cantidad de Lac es debida a la anestesia del animal antes de ser sacrificado. Cabe señalar que la presencia de la señal correspondiente a PCr es un buen indicador de la minimización de cambios *post mortem* ya que este metabolito está involucrado en el metabolismo energético de tejidos con demanda fluctuante de energía [126]. En resumen, los valores obtenidos para el cociente PCr/Cr y su comparación con datos de literatura sugieren que la demanda energética tisular se paralizó debido a la fijación por irradiación FMW y por lo tanto, deberíamos esperar que el resto del patrón espectral reflejara fielmente el patrón presente *in vivo*.

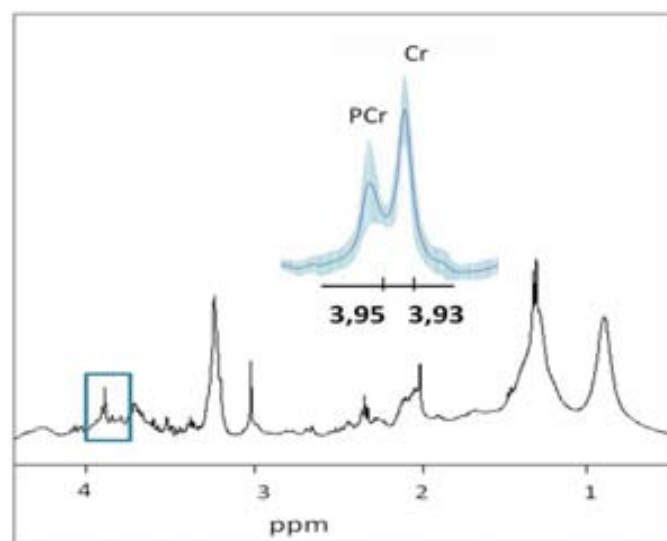


Figura 4.8. Espectro promedio (\pm SD en sombreado azul) HRMAS de la zona contralateral de tejido cerebral de rata sacrificada por FMW ($n=3$). En la expansión (4,00 ppm – 3,90 ppm) se observa la presencia de PCr y Cr bien resueltos en el espectro de HRMAS.

En resumen, en esta sección de nuestro estudio hemos observado la ausencia de cambios relacionados con el metabolismo *post mortem* al utilizar el método de sacrificio mediante FMW también en cerebro de rata. Ello permite preservar el patrón metabólico que se observa *in vivo* durante los estudios *post mortem* mediante HRMAS. Este hecho nos permitirá por ejemplo, evaluar las variaciones en la concentración basal de lactato en ratas post infarto *ex vivo*, ya que podremos descartar su origen por causas de activación del metabolismo anaeróbico *post mortem* y evaluar, por el contrario, posibles contribuciones de una disfuncionalidad celular transitoria a este aumento [135,136] no necesariamente relacionadas con el metabolismo anaeróbico isquémico *post mortem*.

4.4 Estudio de la minimización de los cambios en el patrón espectral de tumores GL261 durante experimentos de HRMAS a 37°C mediante la irradiación de las muestras obtenidas por FMW

Los animales usados en éste estudio desarrollaron tumores con la cinética esperada para tumores GL261, según trabajos previamente llevados a cabo por nuestro grupo de investigación [112,137]. La figura 4.9 nos resume en IRM ponderadas en T₂ el conjunto de 12 ratones que se han utilizado en esta sección de la tesis. Los valores de volumen tumoral, calculados según lo descrito en Delgado-Goñi y col. [138] fueron de 175,0 +/- 9,8 mm³ (n=12) el día del sacrificio de los ratones con tumor GL261.

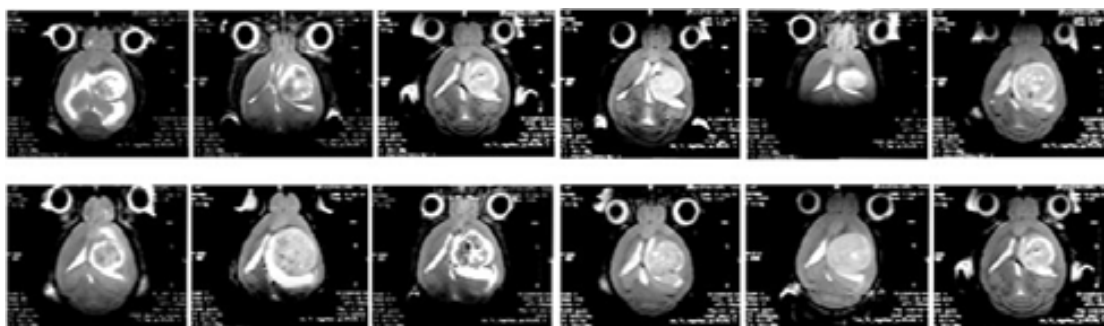


Figura 4.9 IRM ponderadas en T₂ adquiridas en orientación coronal a 7T de 12 ratones con tumores GL261 a día 15 de post inoculación de células, justo antes de ser sacrificados con los protocolos descritos en la sección 3.3.1.

Los espectros HRMAS adquiridos a distintos tiempos de las muestras no irradiadas por FMW (N-FMW) muestran fuertes cambios en el patrón espectral entre los 34 y 374 minutos en la adquisición HRMAS, siendo algunos de ellos estadísticamente significativos (ver figura 4.10A). Por otro lado, la casi perfecta superposición espectral observada en la figura 4.10B para las muestras irradiadas por FMW demuestra la aparente estabilidad del patrón espectral entre los momentos inicial y final del experimento. Esta estabilidad se confirma con los resultados presentados en las figuras 4.11 y 4.12 y en las tablas 4.3 y 4.4.

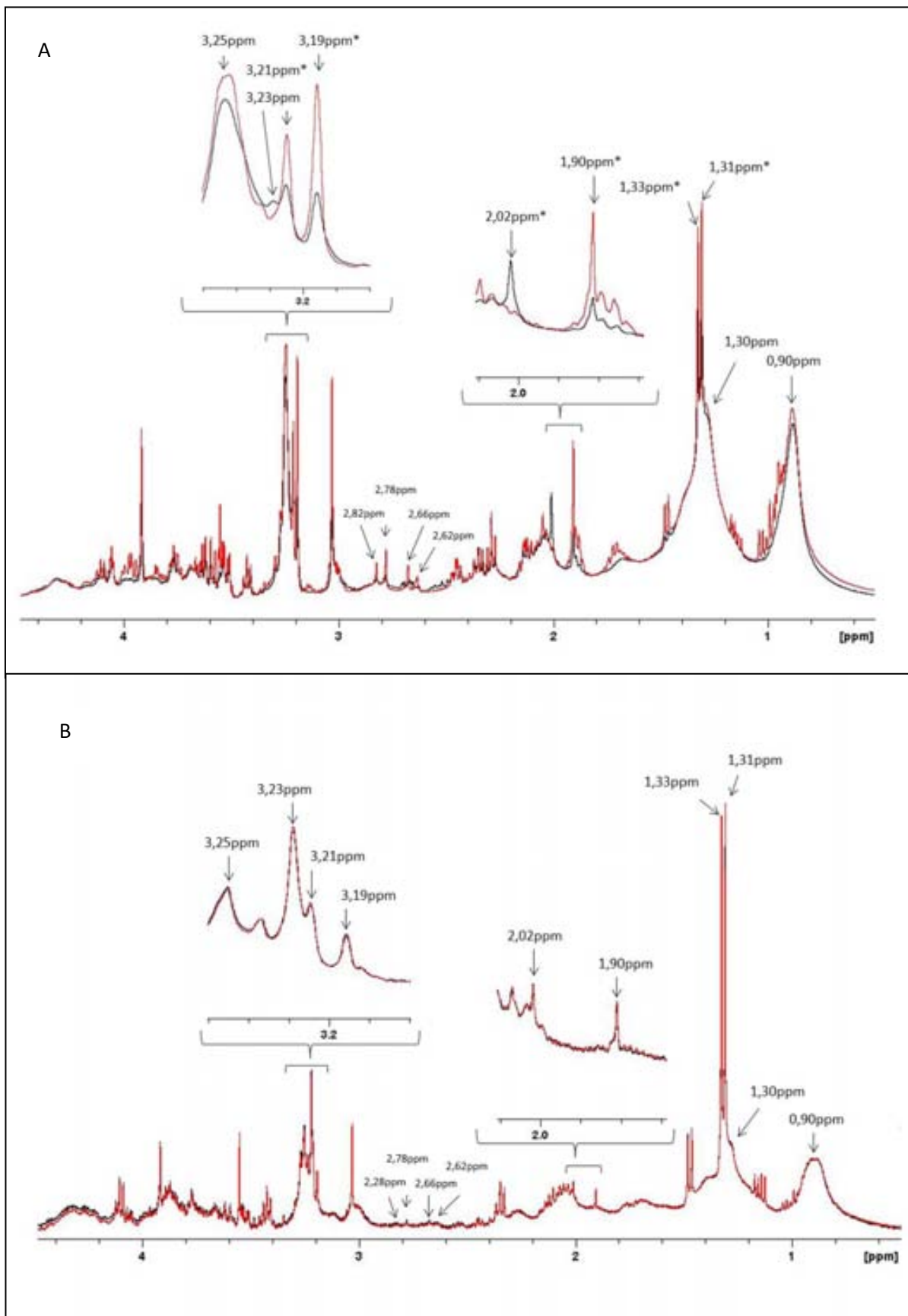


Figura 4.10. Espectros HRMAS adquiridos de muestras de tumor murino GL261. A) N-FMW y B) FMW. El espectro en negro corresponde a la primera adquisición en esta serie experimental ($t = 34\text{min}$) y el espectro en rojo corresponde a la última adquisición ($t = 374\text{min}$). Los asteriscos (la posición en ppm indica la altura máxima de la resonancia de interés) señalan la significación estadística entre el primer y el último espectro detectados durante el experimento. Las expansiones muestran las regiones de 3,18 – 3,26 ppm y 1,88 – 2,06 ppm.

Los resultados reflejando aparente estabilidad en las muestras irradiadas por FMW nos llevaron a plantear la posibilidad de la existencia de cambios espectrales significativos en los primeros minutos de adquisición que no hubiesen sido detectados por haber empezado los registros iniciales habiendo pasado 34 minutos desde el inicio de la incubación a 37° C. Para confirmar o descartar esta hipótesis se procedió a un análisis adicional incluyendo los minutos iniciales del experimento de HRMAS (figura 4.11). Dicho estudio fue llevado a cabo con muestras distintas a las anteriormente citadas, por lo tanto el número total de muestras utilizadas en este estudio fue de 18.

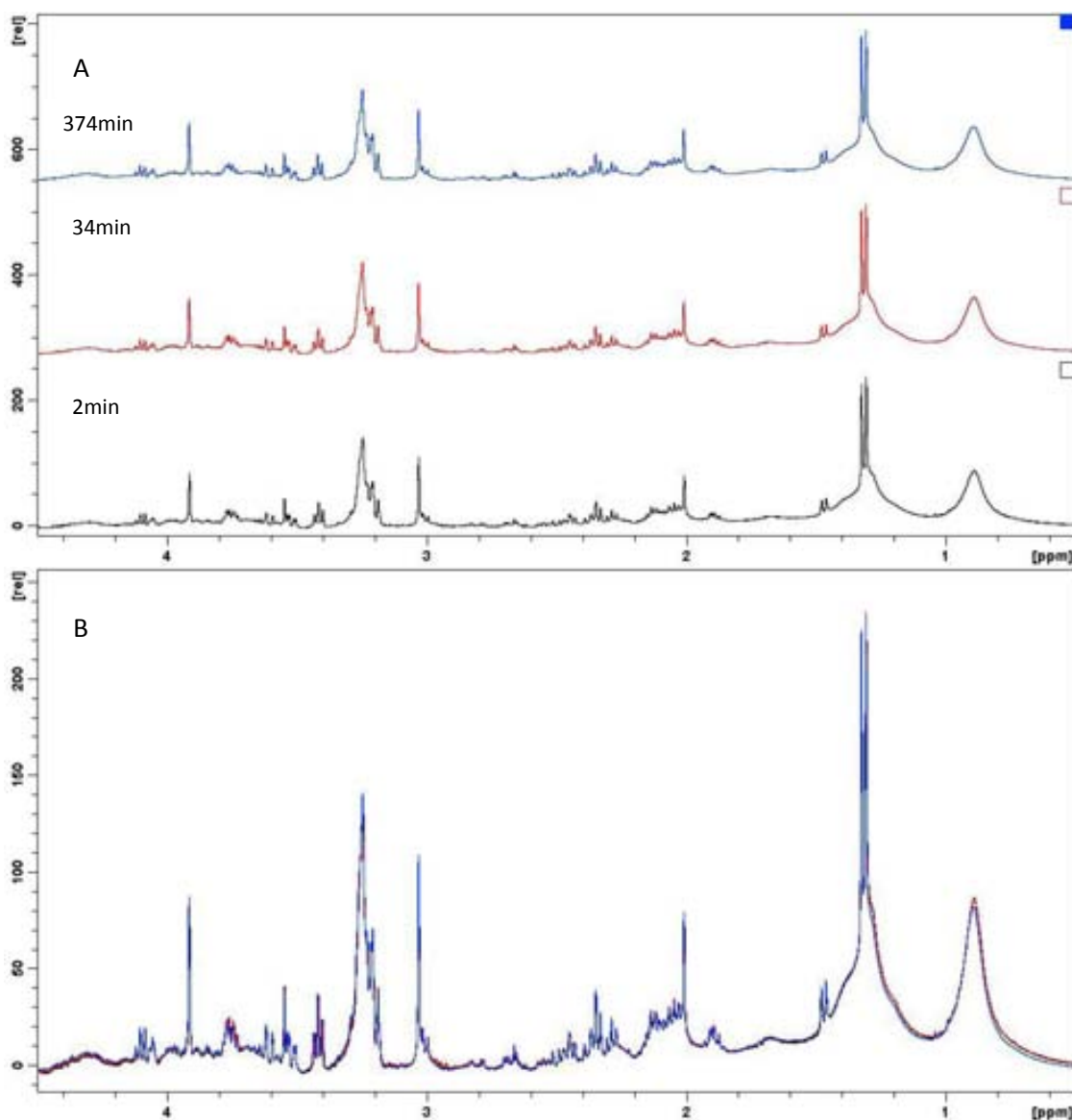


Figura 4.11. Espectros HRMAS de una muestra de tumor GL261 irradiada con FMW y adquirida a 37° C. (A) Espectros desde el inicio hasta el final del experimento (minutos 2, 34, 374) (B) Superposición de los espectros anteriores.

Estos resultados confirmaron, por lo tanto, la estabilidad del patrón espectral detectable por HRMAS, producida por la irradiación de las muestras con FMW, incluso desde los minutos iniciales del experimento a 37° C, tal como se ejemplifica en los resultados a 2, 34 y 374 min de adquisición en la figura 4.11.

En las muestras N-FMW el cambio más relevante observado se produjo en la señal a 3,19 ppm, correspondiente al grupo trimetilamina del metabolito de colina, que aumentó alrededor de 1,7 veces a lo largo de los 374 minutos de adquisición HRMAS a 37° C. Además, se observó un aumento de 1,1 veces en la señal de fosfocolina a 3,21 ppm (ver figura 4.12 y tabla 4.2). El mismo patrón de variaciones se observó tanto con la medida de intensidades normalizadas a *unit leght* (tabla 4.2) como con la utilización de integrales para la cuantificación (para límites de integración, ver tabla 4.3). No parece haber un aumento equivalente en la señal de glicerofosfocolina (GPC) a 3,23 ppm, que de hecho, disminuye (aunque no significativamente) hasta un 90% de su valor inicial. Visualmente (figura 4.10A), la variación en las señales de Ptdcho + GPC no parece justificar el aumento de las señales de Cho + PCho. Otras variaciones en el patrón espectral de muestras N-FMW muestran una diferencia significativa como por ejemplo la intensidad del Ac a 1,90 ppm, que aumenta 1,5 veces. La reducción concomitante de NAA (tabla 4.2) sugiere que los aumentos de Ac y de la señal visible del Asp (2,62 – 2,82 ppm) pueden estar asociados a la degradación de NAA (figura 4.12). Dicha degradación de NAA por parte de la actividad N-acetil-L amidohidrolasa [139] ya fue descrita tiempo atrás en estudios de la variación del patrón espectral de cerebro de conejo *post mortem* a lo largo del tiempo [140].

La evaluación estadística de las curvas obtenidas en los experimentos a lo largo del tiempo, realizada con el método Unianova, ha demostrado que las intensidades normalizadas de las señales seleccionadas (Ac, NAA, ChCCp) presentan un comportamiento distinto (estadísticamente significativo $p < 0,05$) cuando se comparan muestras N-FMW y FMW. No se observa variación apreciable en el caso de FMW y con cambios claros en las muestras N-FMW.

Resultados previamente descritos por otros autores [121] mostraron un claro aumento en las señales de Cho y PCho (aproximadamente 1,5 veces en un período experimental comprendido entre 0 y 0,5h) en estudios de HRMAS de tejido a 4° C, lo que concuerda cualitativamente con los resultados descritos en esta

sección de la tesis. Respecto a las alteraciones de la intensidad aparente de las sustancias relacionadas con el metabolismo de la colina, antes mencionadas (Cho, PCho, GPCho y PtdCho) cabe recordar el aumento en la señal de la Cho y de PCho, mientras que la señal de PtdCho permanecía esencialmente inalterada. Por consiguiente, ello sugeriría que el aumento observado para Cho libre y la PCho se originaría en la actividad post mortem de fosfolipasas y fosfatasas [141,142] que actuarían sobre los fosfolípidos de membranas celulares de un conjunto de compuestos (ChCCp) “invisible” por HRMAS. Éste conjunto no coincidiría con el que origina la resonancia a 3,25 ppm (PtdCho visible por HRMAS), ya que este no sufre una disminución en su intensidad aparente. En ese sentido, los fosfolípidos de la membrana plasmática constituirían un conjunto invisible por RMN, aún en las condiciones de HRMAS utilizadas en los estudios de ésta tesis, siendo distinto, por lo tanto, del conjunto de PtdCho visible por HRMAS que apenas cambia cuando las señales de Cho y PCho aumentan en las muestras del grupo FMW.

Por otra parte, la ausencia de cambios en la región espectral del lactato podría interpretarse considerando que los sustratos que permiten el acúmulo de éste mediante la glucólisis anaeróbica ya se habrían consumido durante el tiempo de isquemia post-sacrificio (aproximadamente 5 min) y antes de la irradiación de las muestras por FMW, con lo que, independientemente de su irradiación (FMW) o falta de ella (N-FMW) la concentración de lactato en el tejido de interés ya no variaría. Conviene además tener en cuenta que, incluso in vivo, los niveles basales de lactato en tumores GL261 pueden ser bastante elevados, hasta $7,9 \pm 1,8$ $\mu\text{mol/g}$ de agua [112].

Un aspecto adicional a considerar a la hora de interpretar los resultados mostrados en la figura 4.12 es la variabilidad intrínseca del patrón espectral basal de los tumores GL261. Así, la intensidad inicial observada para Lac, ML + MM, ChCCp y PtdCho fue distinta en diferentes alícuotas de tumor o en distintos tumores GL261. Dicha heterogeneidad ya había sido descrita en trabajos anteriores publicados por nuestro grupo de investigación [112] y se volverá sobre ella en la sección 4.5 de esta tesis.

En este apartado de la tesis, nos hemos concentrado sobre todo en el análisis de características espectrales cuyos cambios a lo largo del tiempo hubiesen sido previamente descritos para las adquisiciones de espectros de

biopsias de tumor cerebral a temperaturas fisiológicas [117]. Sin embargo, también hemos investigado la presencia de otros cambios significativos que pudiesen ocurrir, por ejemplo, debido a la congelación y descongelación de las muestras (con y sin irradiación FMW): posibles ejemplos de ello son los cambios observados en las señales de Ala, Glu y Gly [65,143]. En ese sentido, Wright y colaboradores [143] sugirieron que la Gly “visible por RMN” podría detectarse en concentración más elevada cuando una muestra era analizada por técnicas de HRMAS. Según estos autores, la fuente de esta Gly “extra” podría ser el metabolismo *post mortem*, o bien la liberación de Gly unida a macromoléculas debido al daño producido en la muestra durante el experimento HRMAS, resultante de los largos tiempos de adquisición necesarios en algunos casos para adquirir espectros para una valoración cuantitativa (2,5h).

Los resultados presentados en este apartado de la tesis concuerdan con la primera hipótesis formulada por estos autores [143] es decir, que el posible aumento en la señal de Gly detectable probablemente tendría lugar antes de la adquisición HRMAS, dado que las muestras de ambos grupos (FMW y N-FMW) fueron congeladas en el mismo espacio de tiempo (teniendo por tanto un tiempo similar de isquemia post mortem), y dado también que no se detectaron diferencias en el contenido de Gly al comparar muestras tanto del grupo irradiado como del no irradiado durante el período de adquisición a lo largo del tiempo a 37° C (aproximadamente 6,2h en nuestro caso).

Finalmente, cabe mencionar que la estabilización del patrón espectral que se ha obtenido con éste método podría ser de relevancia para estudios de reconocimiento de patrones (RP) espectrales de biopsias adquiridas por HRMAS [117,144]. Por ejemplo, Andronesi y colaboradores [144] llevaron a cabo estudios por RP de espectros de HRMAS de biopsias para distinguir tipos de tumores/tejidos (normal, tumores de alto y bajo grado) y también subtipos de tumores (glioblastoma, astrocitoma anaplásico, meningioma, schwannoma, astrocitoma pilocítico y metástasis). Algunas de las características espectrales relevantes para estas discriminaciones coinciden con características estudiadas en esta tesis (ML, NAA, ChCCp) que pueden verse afectadas por el tiempo de estudio por HRMAS, en ausencia de fijación por FMW.

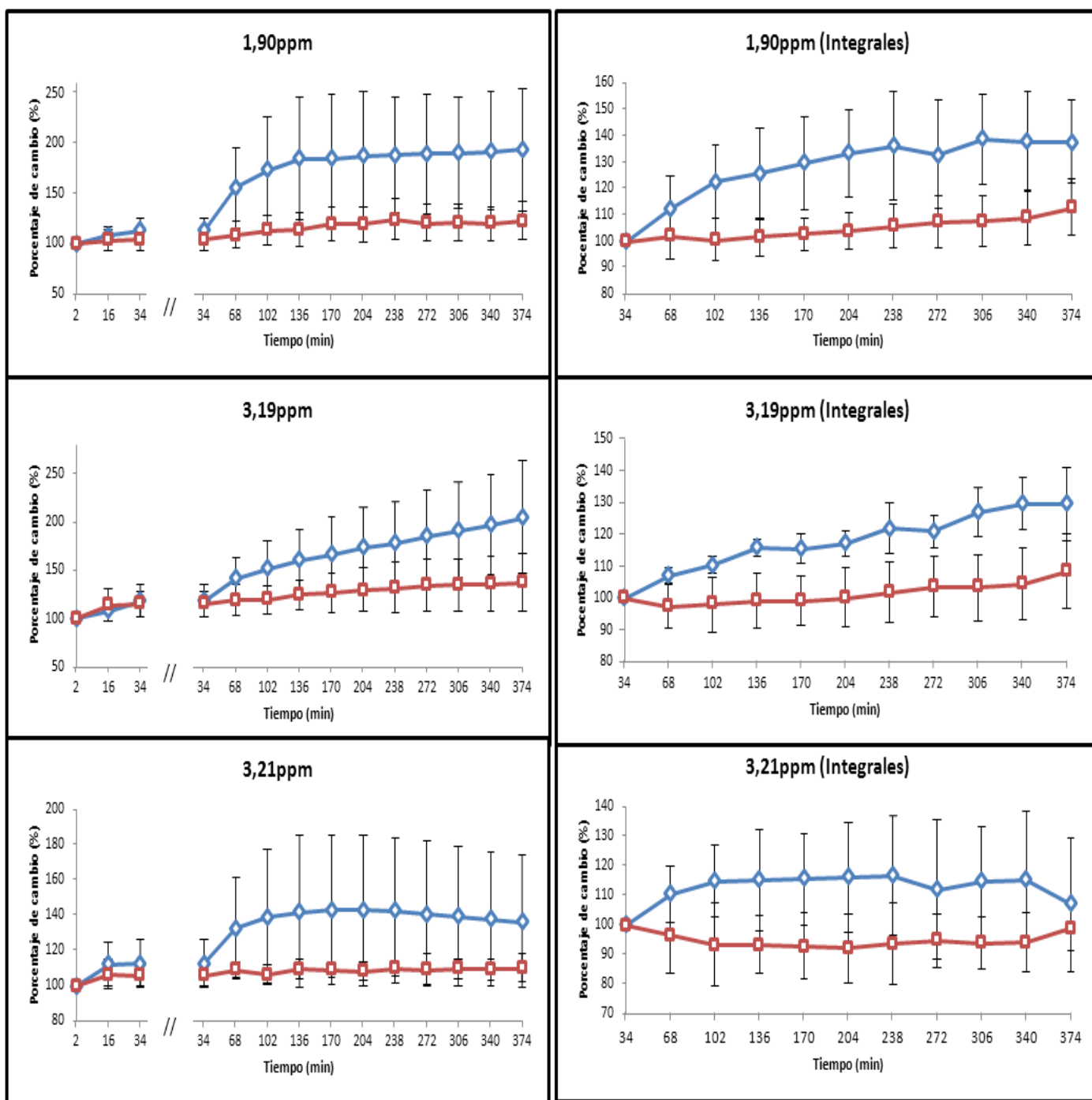


Figura 4.12. Gráficas relativas a los experimentos de HRMAS a 37° C a lo largo del tiempo, representándose, a la izquierda, los valores de las intensidades normalizadas *unit length* y a la derecha, las integrales (1,897 – 1,919 ppm, 3,166 – 3,201 ppm y 3,201 – 3,213 ppm) observados para diferentes resonancias (1,90 ppm, 3,19 ppm y 3,21 ppm), mostrando el promedio y la desviación estándar para estas señales (n=6 para cada condición). En rojo se representan las muestras con irradiación FMW, y en azul, las muestras sin irradiación FMW. La intensidad inicial (o área) se consideró como el 100% de la señal y las siguientes intensidades normalizadas *unit length* (o áreas) se calcularon en relación a este punto.

Desplazamiento químico (ppm)	Factor de cambio FMW	Factor de cambio N-FMW	Metabolito	Significación estadística (p)
0,90	0,90 ± 0,01	0,90 ± 0,02	ML + MM	0,177
1,30	0,90 ± 0,04	0,90 ± 0,01	ML + MM	0,790
1,31 - 1,33	0,90 ± 0,05	0,90 ± 0,02	Lac	0,500
1,90	1,10 ± 0,16	1,50 ± 0,45	Ac	0,035*
2,02	0,80 ± 0,21	0,60 ± 0,13	NAA	0,007*
2,62 - 2,82	0,80 ± 0,67	0,90 ± 0,20	Asp	0,106
3,19	1,10 ± 0,17	1,70 ± 0,48	Cho	<0,001*
3,21	1,00 ± 0,08	1,10 ± 0,24	Pcho	0,012*
3,23	0,90 ± 0,06	0,90 ± 0,11	GPCho	0,113
3,25	0,90 ± 0,03	1,00 ± 0,09	PtdCho	0,873

Tabla 4.2. Factor de cambio observado (calculado con los cocientes de alturas normalizadas a *unit length*), asignación tentativa de los metabolitos principales que originan la señal (ver anexo 1 para más detalle) y resultados del test estadístico Unianova para la comparación de la variación a través del tiempo de adquisición a 37° C de espectros HRMAS de muestras irradiadas (FMW) y no irradiadas FMW (N-FMW) para cada resonancia.

Rango de integración (ppm)	Factor de cambio FMW	Factor de cambio N-FMW	Metabolito	Significación estadística (p)
1,897 - 1,919	1,1±0,10	1,3±0,16	Ac	<0,001
3,166 - 3,201	1,0±0,11	1,2±0,11	Cho (colina)	<0,001
3,201 - 3,213	0,9±0,07	1,0±0,22	PCho (fosfocolina)	0,001

Tabla 4.3. Factor de cambio observado (calculado con los cocientes de integración), asignación tentativa de los metabolitos principales que originan la señal considerada (ver anexo 1 para más detalle) resultados del test estadístico Unianova para la comparación de la variación a través del tiempo de adquisición a 37° C de espectros HRMAS de muestras irradiadas (FMW) y no irradiadas FMW (N-FMW) para cada resonancia.

Histopatología post HRMAS

Las muestras de esta sección de nuestro estudio fueron posteriormente sometidas a un análisis histopatológico. El grupo de muestras FMW se evaluó después de la irradiación por FMW más los 374 minutos correspondientes del análisis por HRMAS a 37° C. El grupo N-FMW se evaluó después de las adquisiciones por HRMAS (374 min a 37° C). El patólogo veterinario Prof. Martí Pumarola, de la Unidad de Patología Murina (CBATEG de la UAB), evaluó dichas muestras para presencia o ausencia de células tumorales, su morfología y para comprobar si el diagnóstico patológico podría ser corroborado, teniendo en cuenta los posibles cambios causados por la irradiación FMW o el tiempo de giro en los experimentos HRMAS a 37° C. Todas las muestras evaluadas (n =12) fueron perfectamente reconocidas como tumores gliales de alto grado (figura 4.13) sin contaminación de parénquima de cerebro normal, aunque se detectó algún artefacto morfológico y núcleos picnóticos, posiblemente debido a la irradiación FMW y/o a las velocidades y tiempo total de giro a 37° C [145,143,146].

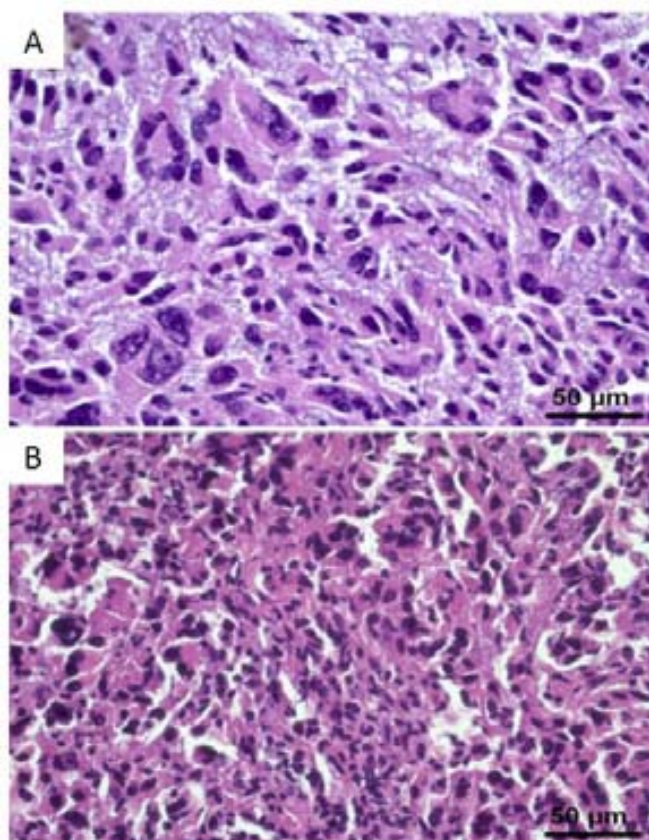


Figura 4.13. Preparación histopatológica de 4 µm post HRMAS de muestras de tumor GL261 teñidas con hematoxilina-eosina (aumento x40). a) muestra no irradiada por FMW, b) muestra irradiada por FMW.

Con respecto al análisis histopatológico practicado, confiábamos en un resultado positivo dada la existencia de estudios previos [143,117,146] que habían descrito que los tejidos estudiados por HRMAS podían ser analizados por histopatología después dichas adquisiciones. Cheng y colaboradores [146], sin embargo, señalaron que el análisis post HRMAS llevado a cabo en muestras de glioblastoma presentó, en algunos casos, una ausencia de características típicas de malignidad y necrosis, quizás debido a la compresión de las zonas necróticas por la alta velocidad de giro utilizada. En este estudio, no se han observado dichos cambios morfológicos, y se necesitarían experimentos adicionales en esa línea para determinar si la irradiación por FMW podría ser de ayuda en la preservación de la citoarquitectura del tejido, además de prevenir cambios espectrales debidos al metabolismo *post mortem* al someterlo a análisis por HRMAS.

En resumen, los cambios metabólicos *post mortem* observados en las muestras del grupo N-FMW en éste estudio coinciden con los resultados descritos por otros autores, y son previsibles cuando los estudios se llevan a cabo a temperatura fisiológica durante períodos largos de adquisición. La irradiación de las muestras por FMW ha resultado en una ausencia de cambios significativos en el patrón espectral de HRMAS evaluados durante un máximo de 374 min a 37° C que podría resultar de mucha utilidad, reduciendo la variabilidad introducida por el metabolismo *post mortem* en los espectros de las muestras de interés. A su vez, ello debería facilitar futuros estudios de metabolómica en biopsias, tanto en ámbito clínico como preclínico, especialmente cuando los experimentos requiera tiempos largos de adquisición (por ejemplo RMN 2D).

4.5 Estudio preliminar de la heterogeneidad del patrón espectral de tumores murinos GL261 detectado por HRMAS

Como se mostró en la figura 4.11 y se comentó en la página 87 de esta tesis, el patrón espectral HRMAS de los tumores GL261, aunque muy reproducible en términos cualitativos, presenta cierta variabilidad cuantitativa, por ejemplo en la región de ChCCp, según el tumor investigado (figura 4.14).

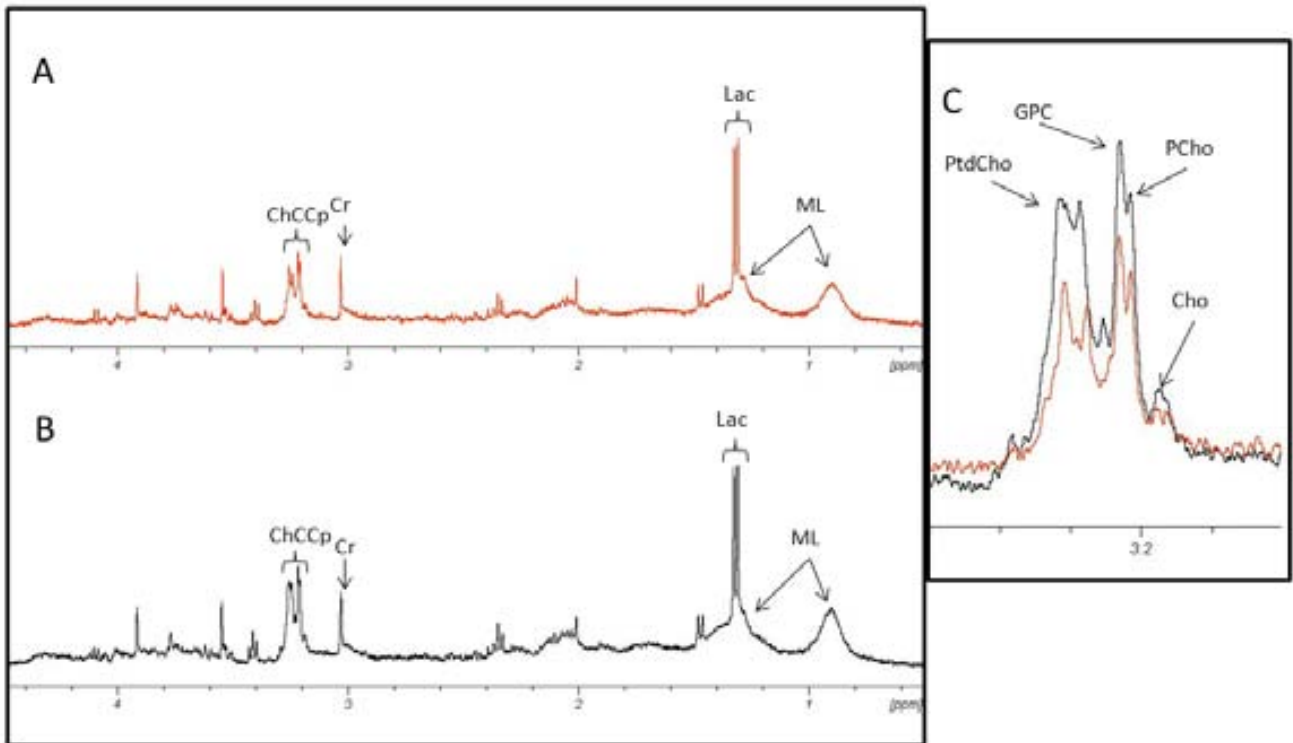


Figura 4.14. A) y B) Espectros HRMAS adquiridos de diferentes muestras de tumor murino GL261 que muestran diferentes cantidades de PtdCho. C) Expansión entre 3,10 – 3,35 ppm de los espectros para mayor detalle.

En esta sección nos planteamos un análisis preliminar de la posible relación de dicha variabilidad con la región del tumor (predominio de periferia versus predominio de parte central).

La figura 4.15 muestra la IRM ponderada en T₂ de un ratón inoculado con células GL261 a 15 días de evolución, representativo del conjunto de los animales (n=6) utilizados para este estudio. Además, esquematiza las zonas en las que se dividieron los tumores para su análisis post sacrificio.

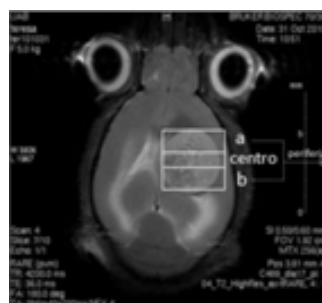


Figura 4.15. IRM ponderada en T₂ adquirida a 7T del corte coronal de un tumor GL261 a día 15 de evolución. El cuadrado indica las disecciones post sacrificio. a y b) zona con contribución predominante de “periferia”, c) zona con contribución mayor de “centro”.

En la figura 4.16 se muestran los espectros HRMAS adquiridos de muestras de tumor murino GL261, En “A” se aprecia el espectro obtenido de una muestra de ratón sacrificado por sobredosis de anestesia y en “B” una muestra de ratón sacrificado por irradiación FMW. El espectro en negro corresponde a una muestra del “centro” y el espectro en rojo a una muestra de la “periferia”.

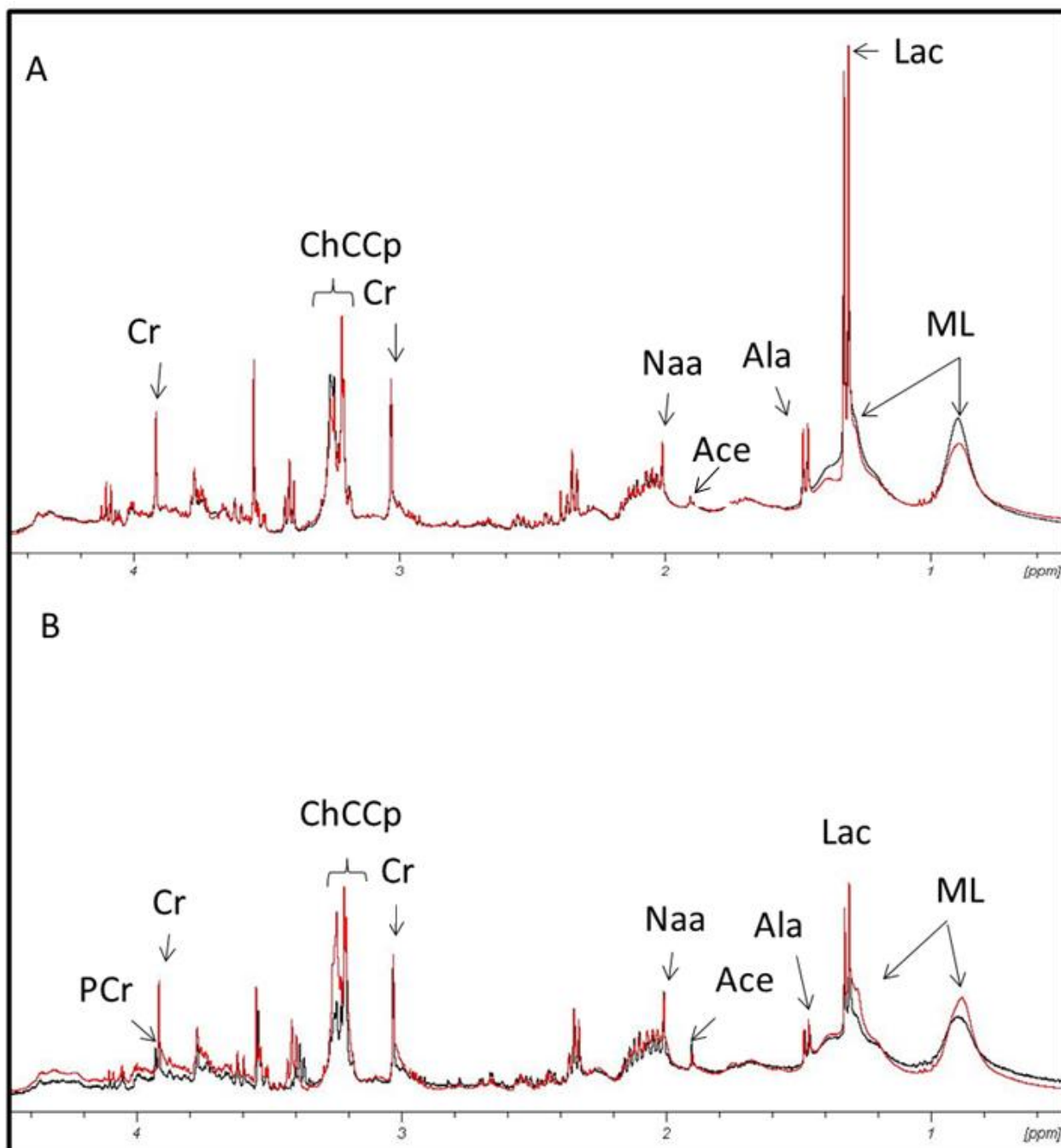


Figura 4.16. Espectros HRMAS adquirido de muestras de tumor murino GL261. El espectro en rojo corresponde a “periferia” y el espectro en negro corresponde a “centro”. En A) sacrificio por sobredosis de anestesia, en B) sacrificio por FMW.

La figura 4.17 nos muestra una expansión de los datos mostrados en la figura 4.16, es decir, la representación detallada de las resonancias de los diferentes compuestos de colina (ChCCp).

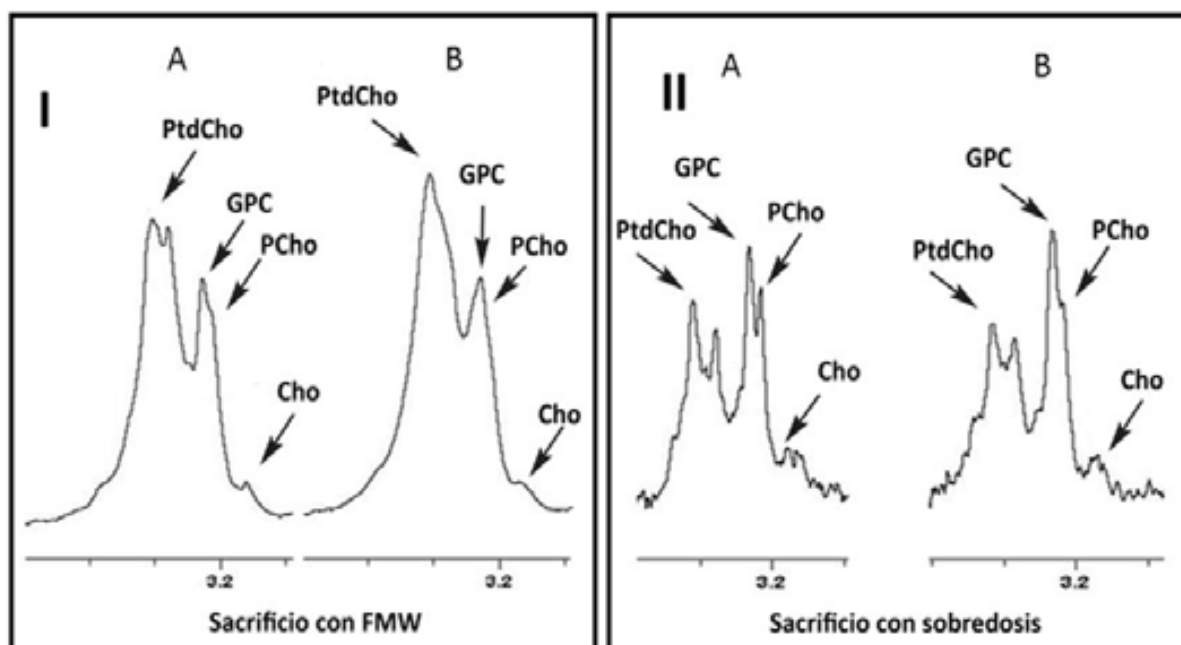


Figura 4.17 Expansión de la región entre 3,30 ppm y 3,15 ppm de espectros de HRMAS representativos de muestras de tumores de ratones sacrificado por I) FMW y II) sobredosis de anestesia. A) periferia y B) centro. Fosfocolina (PCho) a 3,21 ppm, glicerofosfocolina (GPC) a 3,23 ppm, fosfatidilcolina (PtdCho) a 3,25 ppm y Colina libre (Cho) a 3,19 ppm.

La evaluación estadística de la diferencia se llevó a cabo con los valores de intensidades normalizadas a *unit length* medidas para representar la contribución de cada metabolito de colina. En el caso de espectros de resolución no tan buena, como por ejemplo, el de la figura 4.17B, se utilizó el “shoulder” a 3,21 ppm para la cuantificación de PCho. En la figura 4,18 se muestran *boxplots* de las intensidades calculadas de los metabolitos seleccionados (Cho a 3,19 ppm, PCho a 3,21ppm, GPCho a 3,23ppm y PtdCho a 3,25 ppm) en los espectros HRMAS normalizados de tumores GL261 de ratones sacrificados por sobredosis de anestesia y por FMW. La tabla 4.4 muestra los resultados del test estadístico t de Student para la comparación, en las distintas zonas del tumor GL261 (periferia y centro), entre los valores obtenidos con el sacrificio de sobredosis de anestesia y con el de irradiación de FMW. Solo las resonancias de Cho (3,19 ppm) y GPCho (3,23 ppm)

mostraron significación estadística ($p < 0,05$) aunque para la PtdCho (3,25 ppm) se llegó a tendencia a significación ($p = 0,08$).

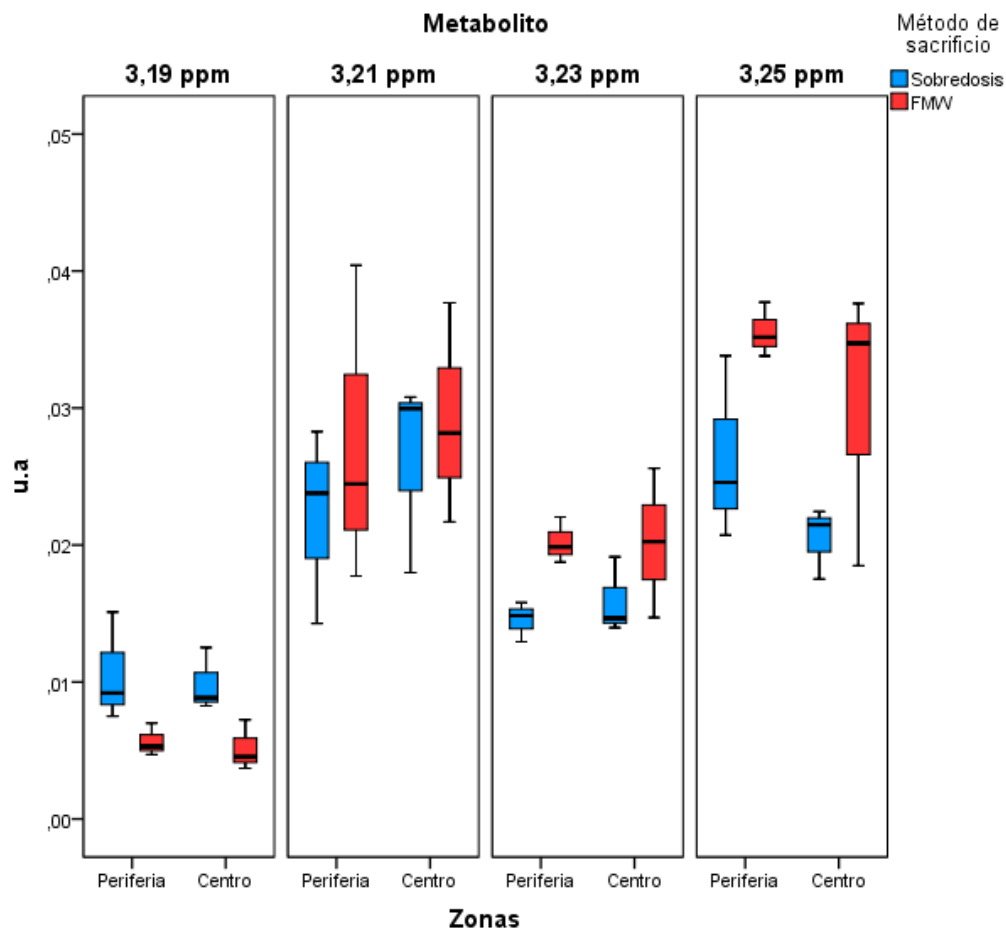


Figura 4.18. Boxplots de las alturas normalizadas a *unit length* de los espectros HRMAS calculadas para los metabolitos seleccionados (Cho a 3,19 ppm, PCho a 3,21 ppm, GPC a 3,23 ppm y PtdCho a 3,25 ppm) de tumores GL261 de ratones sacrificados por sobredosis de anestesia y por FMW ($n=3$). Los límites superiores e inferiores de las cajas representan los cuartiles 1° y 3° de cada distribución de datos respectivamente, y la franja central el 2° cuartil o mediana. Las barras superior e inferior en cada caja muestran la posición de los valores máximo y mínimo de la distribución.

Metabolito (ppm)	valor de p periferia	valor de p centro
3,19	0,11	0,05*
3,21	0,53	0,66
3,23	0,01*	0,29
3,25	0,08‡	0,18

Tabla 4.4. Resultados del test estadístico t de Student para la comparación entre sacrificio por sobredosis de anestesia y por irradiación de FMW, pero teniendo en cuenta la zona de procedencia del tumor. En este caso, se compararon las zonas de periferia entre ellas y las zonas de centro entre ellas. Los valores marcados con un asterisco (*) mostraron significación estadística ($p < 0,05$) y los valores marcados con (‡) mostraron tendencia a la significación ($0,1 > p > 0,05$).

Dada la variabilidad de la altura de la resonancia correspondiente a PtdCho entre las muestras y el ligero aumento de su valor en la periferia con respecto a cortes de la zona central del tumor sobre todo en el caso del sacrificio por FMW, decidimos investigar si podía darse alguna correlación con la presencia de estructuras multilamelares de tipo autofagosoma en dichas muestras de tejido.

En la tabla 4.5 se muestra el resultado del conteo de núcleos y de estructuras multilamelares compatibles con autofagosomas [147,148] mediante microscopía electrónica. Este conteo (ver figura 4.19) nos reveló que las muestras que contienen un número más elevado de autofagosomas fueron las muestras correspondientes a la periferia de los tumores, tanto en el caso de los ratones sacrificados por irradiación de FMW como en el caso de los ratones sacrificados por sobredosis de anestesia. No obstante, al normalizar el número de autofagosomas con respecto al número de núcleos, el rango, entre 2,2 y 5, incluye intercaladas las muestras de “periferia” y “centro”, con FMW periferia en el extremo superior del rango (5) y FMW centro en su extremo inferior (2,2).

Finalmente, los valores de intensidad normalizada a *unit length* de las diferentes muestras no parecen correlacionar con los cambios en la frecuencia de autofagosomas encontrados en la periferia y centro y habría que considerar otras posibles causas adicionales para la heterogeneidad detectada por HRMAS en los tumores GL261 en la región ChCCp del patrón espectral.

Muestra	Núcleos	Autofagosomas	Intensidad normalizada a <i>unit length</i> de PtdCho	Número de autofagosomas/ número de núcleos
SOBREDOSIS periferia	30	95	0,026 ± 0,002	3,166
SOBREDOSIS centro	8	35	0,020 ± 0,006	4,375
FMW periferia	20	100	0,035 ± 0,002	5,000
FMW centro	14	31	0,030 ± 0,010	2,214

Tabla 4.5. Resultado del número de núcleos y autofagosomas observados en microscopía electrónica para una muestra de tumor glial GL261. Intensidad correspondiente a PtdCho, normalizado a *unit length*.

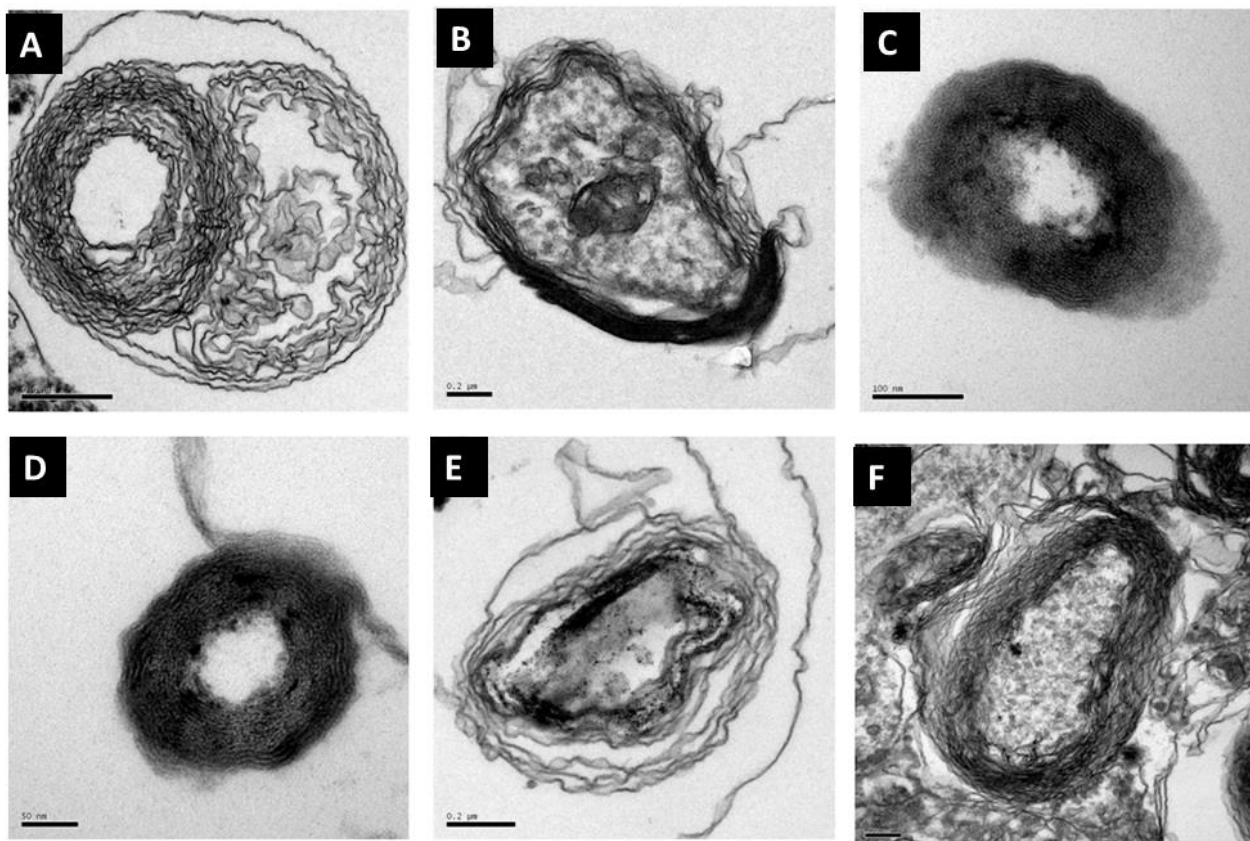


Figura 4.19 Imagen por microscopía electrónica de muestras de tumor GL261 de ratón después de su análisis por HRMAS. Las imágenes A - C corresponden a la zona del centro, mientras que las imágenes D - F corresponden a la zona de la periferia. Longitud de la barra en cada imagen:(A) 500nm, (B) 200nm, (C) 100 nm (D) 500 nm, (E)200 nm y (F) 200nm.

4.6 Análisis mediante reconocimiento de patrones de biopsias de tumores cerebrales humanos estudiados por HRMAS

4.6.1. Clasificadores desarrollados para datos adquiridos a 11,7T

En la figura 4.20, se muestran los patrones espectrales de HRMAS típicos obtenidos con la secuencia de pulso y adquisición a 2° C y 37° C a 11,7 T de dos biopsias de las clases a discriminar (GBM y M) y algunas de sus principales asignaciones según la literatura [29,61,117,149] (ver anexo 1 para más detalles).

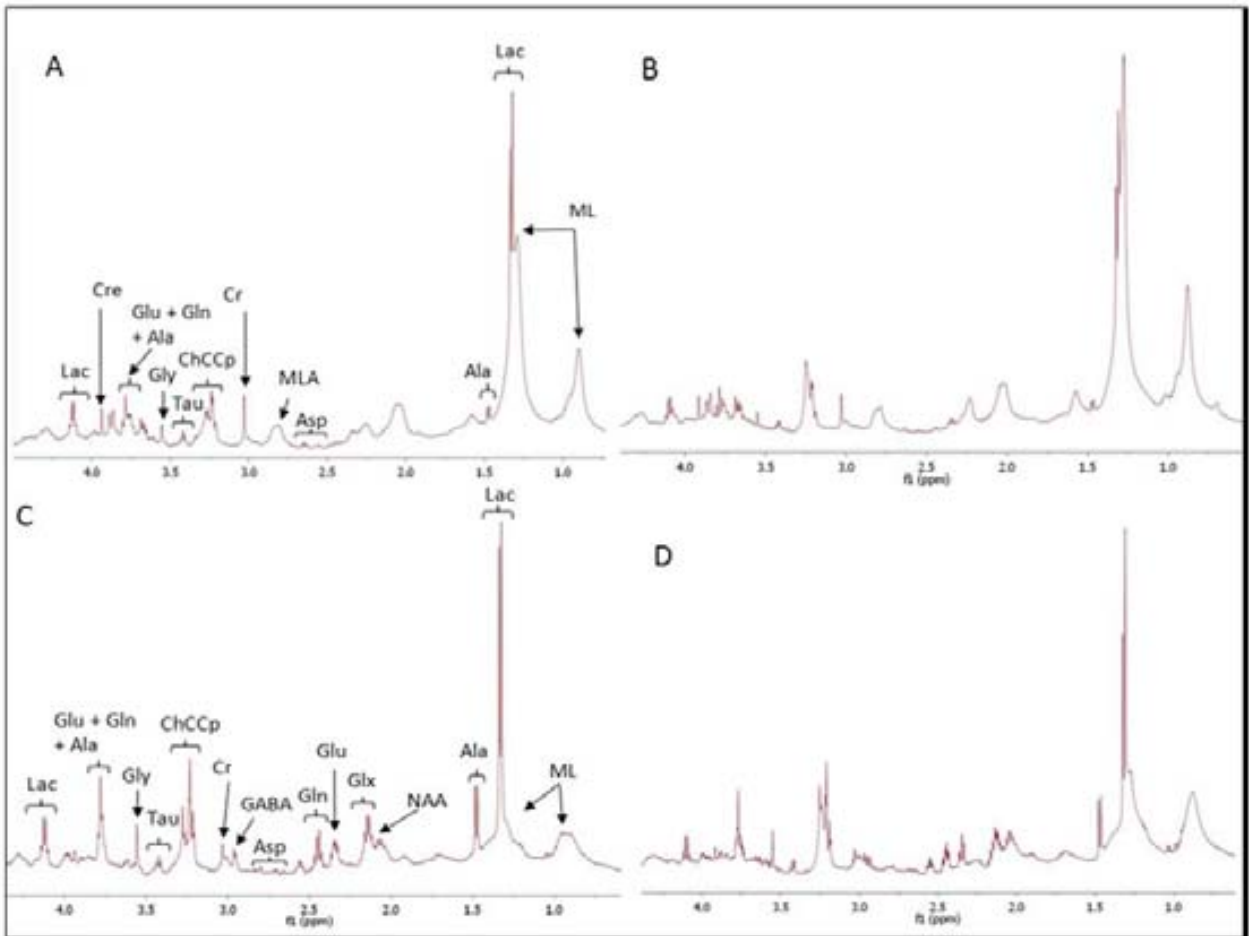


Figura 4.20. Patrones de HRMAS típicos obtenidos con la secuencia de pulso y adquisición para glioblastoma (biopsia 900) a (A) 2° C y (B) 37° C y meningioma (biopsia 907) a (C) 2° C y (D) 37° C con las asignaciones tentativas de los principales metabolitos de interés (ver detalles sobre asignaciones tentativas en el anexo 1).

Clasificadores utilizando casos adquiridos a 11,7T

Estudio 1: comprobar la capacidad discriminante del programa *SpectraClassifier* desarrollado en el GABRMN.

- Reproducibilidad, mediante el programa *SpectraClassifier*, de estudios previos llevados a cabo en el grupo.

Estudios previos en nuestro grupo [117], sobre el desarrollo de clasificadores a partir de espectros de HRMAS, habían descrito que era posible obtener un 100% de éxito en la discriminación entre meningiomas (M) y

glioblastomas multiformes (GBM). Estos estudios fueron llevados a cabo procesando los espectros de HRMAS y luego normalizando las intensidades de las señales a *unit length* (UL2), utilizando para ello módulos del *software* basados en el entorno de programación “R” [115]. Además, se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) para la extracción de características, seguido de un análisis discriminante lineal (LDA).

El primer paso que se llevó a cabo, en el trabajo desarrollado en esta tesis, fue tratar de reproducir los resultados obtenidos en [117] con el programa *SpectraClassifier* (SC) [93,150]. Con ello, pretendíamos abarcar dos diferentes aspectos: en primer lugar, comprobar si con el mismo conjunto de entrenamiento y testeo que los usados en [117] se obtenían resultados comparables. En segundo lugar, pretendíamos probar que se podía trabajar con un *software* recientemente desarrollado en el grupo (*SpectraClassifier*) [93,150], que sin embargo, no había aún demostrado su utilidad para el desarrollo de clasificadores basados en datos de HRMAS.

El resultado obtenido en el desarrollo del clasificador para el clasificador 1 se muestra en la figura 4.21. Esta figura representa el espacio latente resultado de la discriminación entre GBM y M desarrollado con la ayuda del sistema SC. Ello es consistente con lo anteriormente obtenido en nuestro grupo [117], donde se obtuvo un 100% de acierto en esta discriminación. En ésta tesis se ha logrado obtener el mismo resultado utilizando el mismo grupo de casos, pero con una estrategia de desarrollo más accesible que facilita su utilización por parte de usuarios no familiarizados con las metodologías de reconocimiento de patrones.



Figura 4.21. Espacio latente resultado de la discriminación entre GBM y M desarrollado con la ayuda del sistema SC para comprobar la reproducibilidad de un clasificador obtenido en estudios previos de nuestro grupo. Se muestra el resultado de la ecuación discriminante que nos separa el conjunto de entrenamiento más el conjunto de testeo con $M = 13$ y $GBM = 14$. La barra vertical negra indica la frontera de discriminación calculada para el valor numérico calculado por el SC (el DSC o “discriminant score”) para diferenciar las dos clases. Cada punto representa cada una de las biopsias evaluadas. En algún caso pueden llegar a superponerse muestras con el mismo DSC.

El tiempo aproximado de computación para la obtención de dicho clasificador, utilizando la configuración mencionada en la sección 3.10, fue de 30 minutos.

Evaluación del efecto de la temperatura y de la secuencia de adquisición de HRMAS en la robustez de los clasificadores desarrollados mediante el *SpectraClassifier*

Estudio 2: comprobar los posibles efectos discriminatorios de diferentes temperaturas y secuencias de adquisición, así como del aumento en la población de casos en la robustez de los clasificadores desarrollados.

Una vez confirmada la reproducibilidad de lo obtenido en [117] con el programa *SpectraClassifier*, se consideró conveniente evaluar su robustez aumentando al máximo el número de casos en los grupos para el desarrollo del clasificador (ver sección 3.10.2). Adicionalmente, se planteó el cambio de método de selección de variables, sustituyendo PCA por SFFS, por la más fácil correlación de las características espectrales seleccionadas con los metabolitos que los originan, a diferencia de los componentes principales usados en PCA. Por último, se utilizaron diferentes secuencias y temperaturas de adquisición de los datos para valorar su efecto sobre el rendimiento del clasificador.

En la figura 4.22 se representa gráficamente el porcentaje de acierto tanto para el conjunto de entrenamiento (azul) como para el de testeo (rojo), además del porcentaje de BER (negro) para el conjunto de testeo evaluado en estas pruebas. En las gráficas, además, se observa el número de características utilizadas para la clasificación señalándose con una flecha el número óptimo de variables seleccionadas por el sistema, que además se comprobó, en todos los estudios, que estuvieran dentro del número máximo recomendado para evitar el sobreentrenamiento (ver sección 3.10).

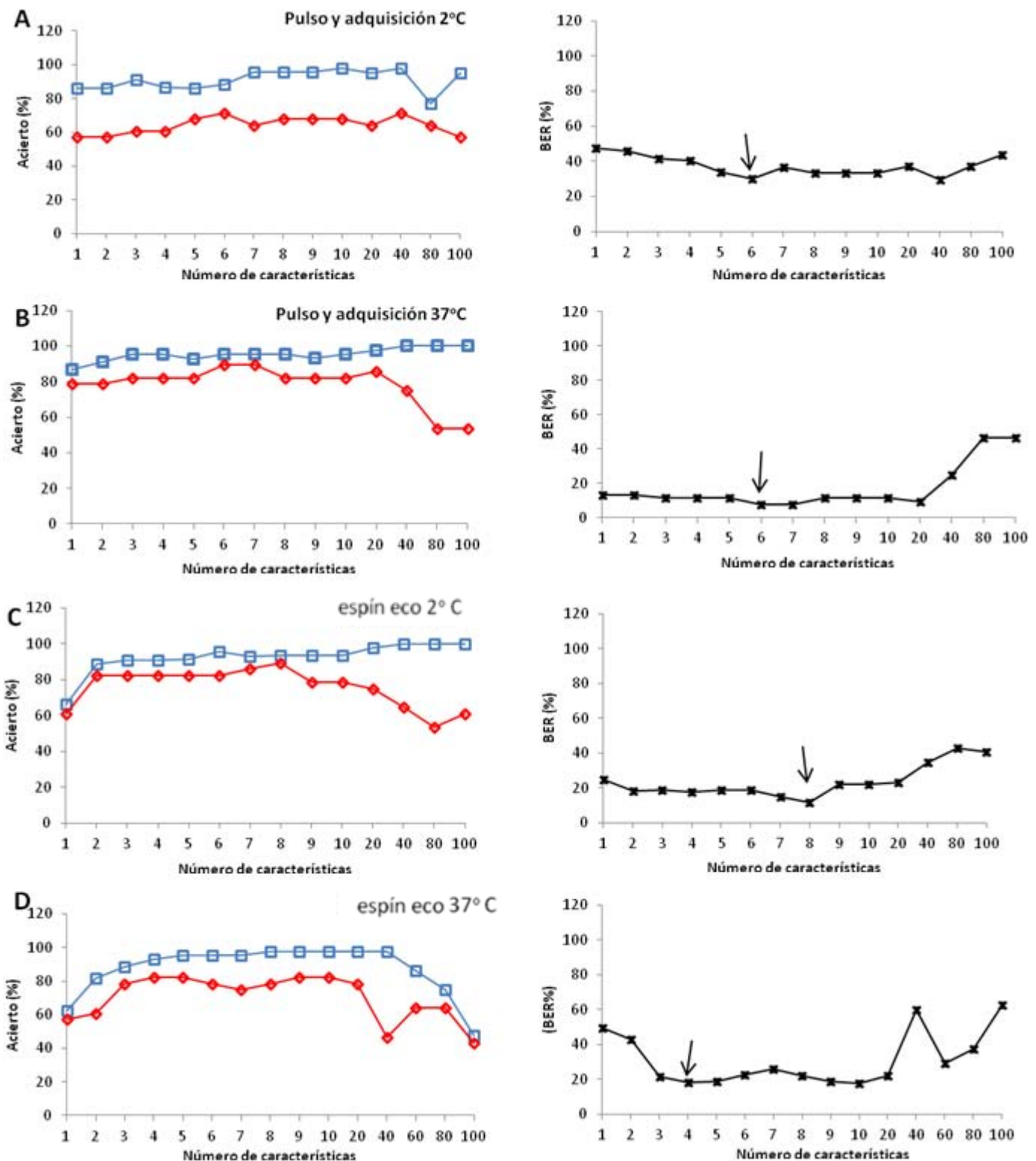


Figura 4.22. Gráficas representando el porcentaje de acierto para el conjunto de entrenamiento (azul) y de testeo (rojo), además de BER (negro) para el estudio de los posibles efectos discriminatorios a diferentes temperaturas, secuencias de adquisición y también para el aumento en la población de casos. Las gráficas (A) y (B) muestran los resultados obtenidos para la secuencia de pulso y adquisición a 2° y 37° C respectivamente, mientras las gráficas (C) y (D) muestran los resultados obtenidos para la secuencia de espín eco a 2° y 37° C. La flecha negra en la columna de la derecha indica el número de características espectrales a utilizar para el clasificador final evaluado como óptimo (BER mínimo).

Se llevó a cabo la evaluación de los clasificadores desarrollados para muestras adquiridas a dos temperaturas (37° C y 2° C) y dos secuencias de adquisición diferentes (pulso - adquisición y espín eco) cuyo resumen de resultados se muestra en la tabla 4.6. Las variables seleccionadas para dicha clasificación se indican con flechas en los espectros promedio de cada clase en la figura 4.23.

Secuencia de adquisición	Temperatura (°C)	Variables seleccionadas y asignación metabólica tentativa	Acierto máximo en el conjunto de entrenamiento (%)	BER mínimo (%)
Pulso y adquisición	2	<ul style="list-style-type: none"> • 2,69 ppm - Asp • 1,46 ppm - Ala • 3,93 ppm - Cr • 2,20 ppm - ML • 3,78 ppm - Ala + Glx + Gly • 4,43 ppm - no asignado 	88,60	29,95
Pulso y adquisición	37	<ul style="list-style-type: none"> • 3,88 ppm - Asp • 3,24 ppm - ml + GPC • 2,37 ppm - Glu • 3,78 ppm - Ala + Glx + Gly • 2,10 ppm - Glx • 3,86 ppm - Asp 	95,40	7,50
Espín eco	2	<ul style="list-style-type: none"> • 4,32 ppm - GPC • 3,28 ppm - Tau • 1,70 ppm - Lisina • 1,70 ppm - Lisina • 1,10 ppm - no asignado • 1,10 ppm - no asignado • 1,09 ppm - no asignado • 0,51 ppm - no asignado 	93,20	11,46
Espín eco	37	<ul style="list-style-type: none"> • 3,79 ppm - Glx • 2,74 ppm - NAA • 1,70 ppm - Leucina + Lisina • 2,56 ppm - NAA 	95,50	18,13

Tabla 4.6. Resumen de los resultados obtenidos con el desarrollo de clasificadores con distintas secuencias y temperaturas de adquisición. Para más detalles sobre las asignaciones metabólicas tentativas consultar el anexo 1.

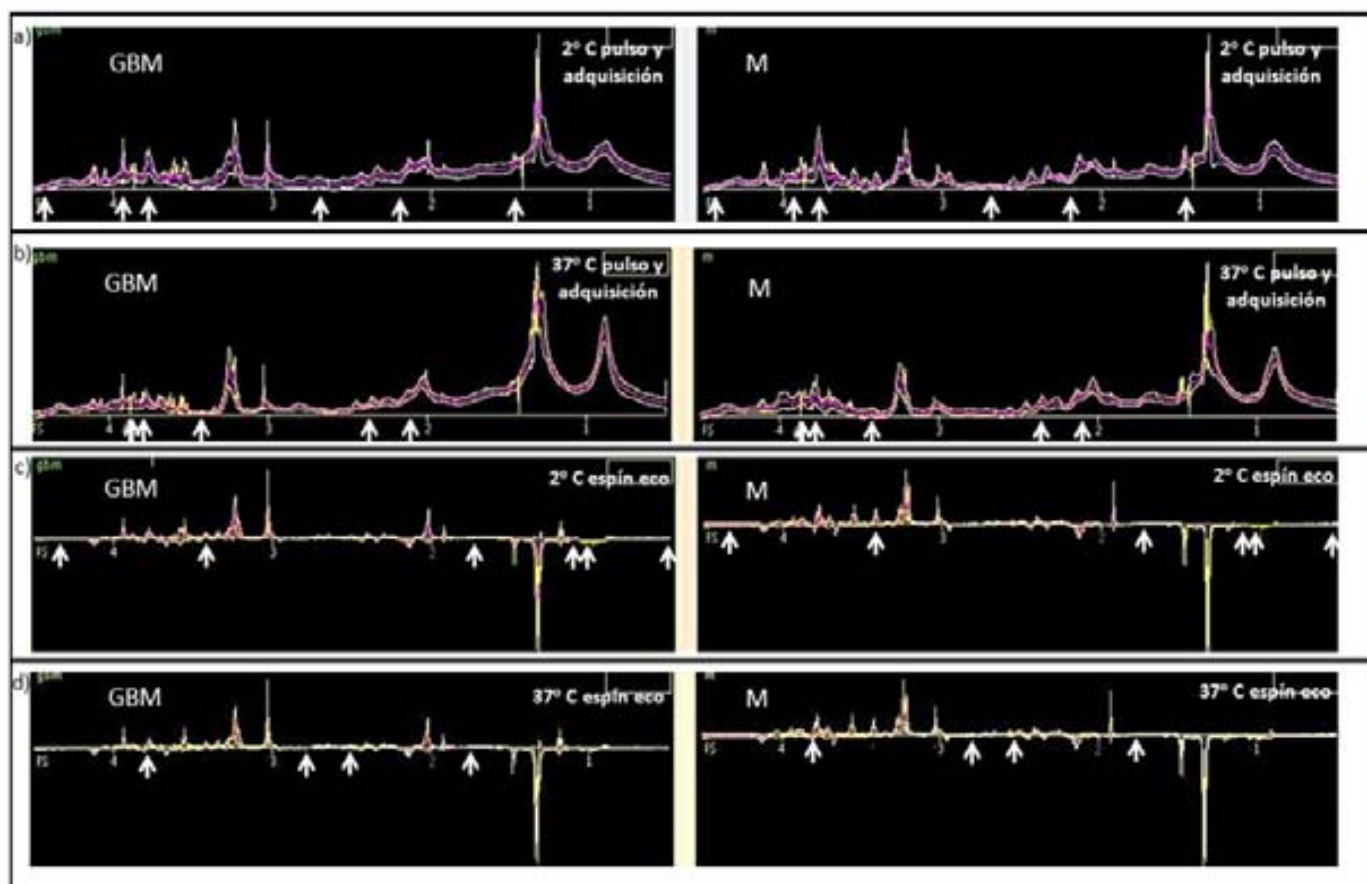


Figura 4.23. Espectros HRMAS promedio de cada clase estudiada (GBM y M) visualizados en el programa *SpectraClassifier*. a) y b) espectros promedio (en color lila) y desviación estándar (en color amarillo) obtenidos con la secuencia de pulso y adquisición a 2° y 37° C respectivamente. c) y d) espectros promedio (en color lila) y desviación estándar (en color amarillo) obtenidos con la secuencia espín eco a 2° y 37° C respectivamente. Las flechas indican los desplazamientos químicos (en ppm) de las características seleccionadas para el desarrollo del clasificador (en el caso de características muy cercanas, las flechas pueden llegar a verse superpuestas).

El espacio latente generado por el análisis LDA de dichos clasificadores se representa en la figura 4.24, donde se pueden observar claramente los casos estudiados y su clasificación en las distintas clases (GBM y M).

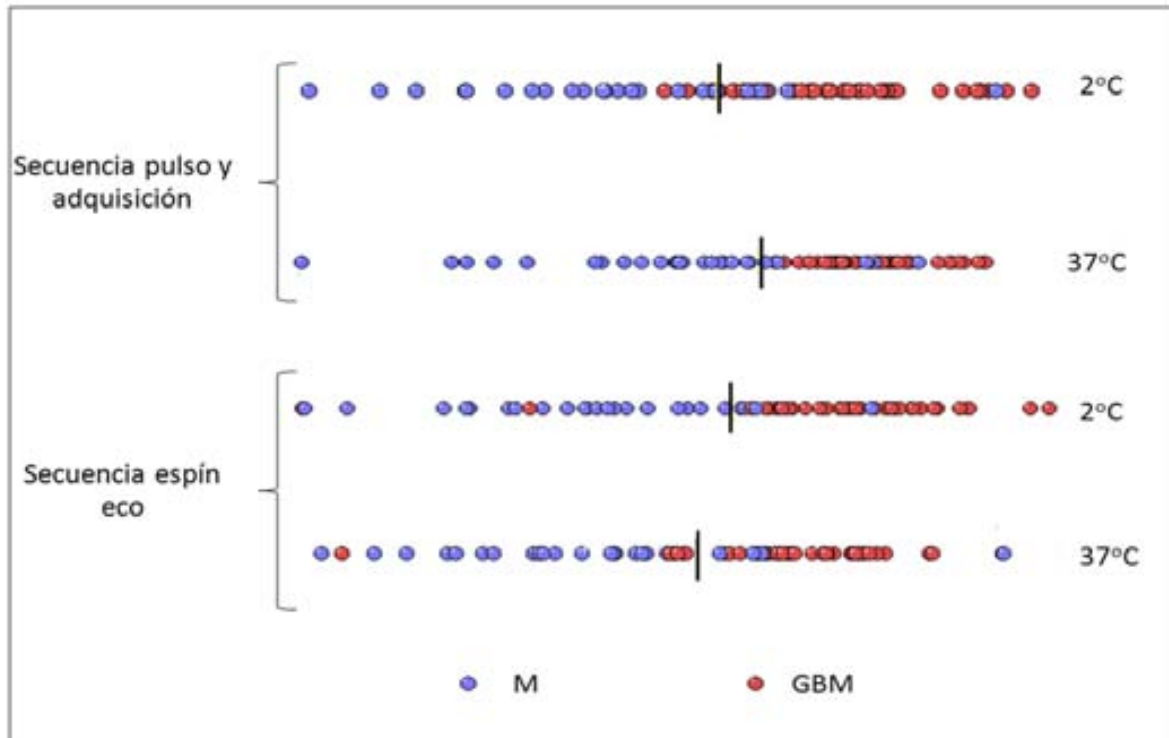


Figura 4.24. Espacio latente generado por el análisis LDA de los conjuntos de entrenamiento y testeo para los clasificadores desarrollados con el programa SC para la determinación de los posibles efectos discriminatorios observados con el uso de diferentes temperaturas, secuencias de adquisición y con el aumento en la población de casos con respecto al estudio del clasificador 2.

Estos resultados no coinciden con lo descrito anteriormente en [117] que describieron un 100% de acierto para la discriminación con la secuencia de pulso y adquisición tanto a 2° C y 37° C, además de un 100% obtenido también con la secuencia de espín eco a 37° C. A este respecto hay que tener en cuenta que el aumento del número total de muestras analizadas, 72 en esta tesis, comparado con 27 en [117] podría haber introducido variabilidad adicional (los llamados *outliers*, [151]) que dificultaran llegar a un 100% de acierto. También cabe considerar que algunas de las muestras con una predicción errónea podrían no reflejar la patología original del tejido. Para confirmar o descartar esta hipótesis, se decidió llevar a cabo un análisis histopatológico post HRMAS de las biopsias investigadas.

Control de calidad espectral aplicado a los casos del clasificador evaluado en el estudio 2 de esta sección

Para llevar a cabo el control de calidad, se procedió a los pasos descritos en la sección 3.10.1. Resumidamente, las biopsias se analizaron por histopatología post HRMAS para llegar a un diagnóstico: fueron descartados aquellos casos que no fueran evaluables (ej. falta de tejido suficiente para su análisis) o bien aquellos en el que el diagnóstico original no coincidiera con el diagnóstico post HRMAS. Por otra parte, el control de calidad espectral por parte de los expertos espectroscopistas pudo descartar espectros debido a falta de homogeneidad suficiente (que podría llevar a falta de resolución suficiente para permitir una selección de características adecuadas), así como espectros que mostrasen señales no identificadas en el espectro, que podrían ser debidas a la posible contaminación de las muestras. (ver un ejemplo en la figura 4.25, y un resumen del total de casos descartados en la tabla 4.7). Para un desglose detallado de los casos analizados/descartados, consultar el anexo 6.

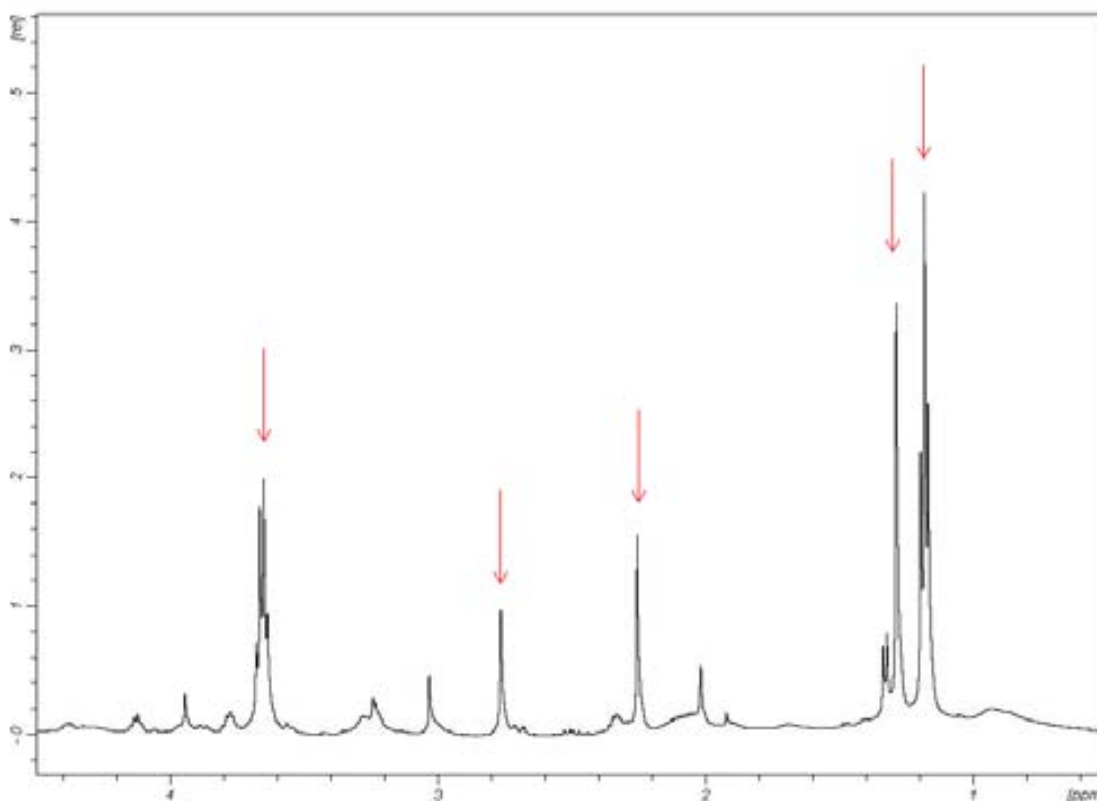


Figura 4.25. Ejemplo de un espectro de HRMAS de M (caso 342) adquirido a 2° C a 11,7 T descartado en el control de calidad espectral por la presencia de señales no identificadas en el espectro (flechas). Comparar con la figura 4.20A, en el inicio de esta sección.

La figura 4.26 muestra el espacio latente de dos clasificadores desarrollados en el estudio 2. Uno de ellos, el de la figura 4.26B, representa el clasificador donde se muestran los casos descartados por el control de calidad (en naranja para GBM y verde para M).

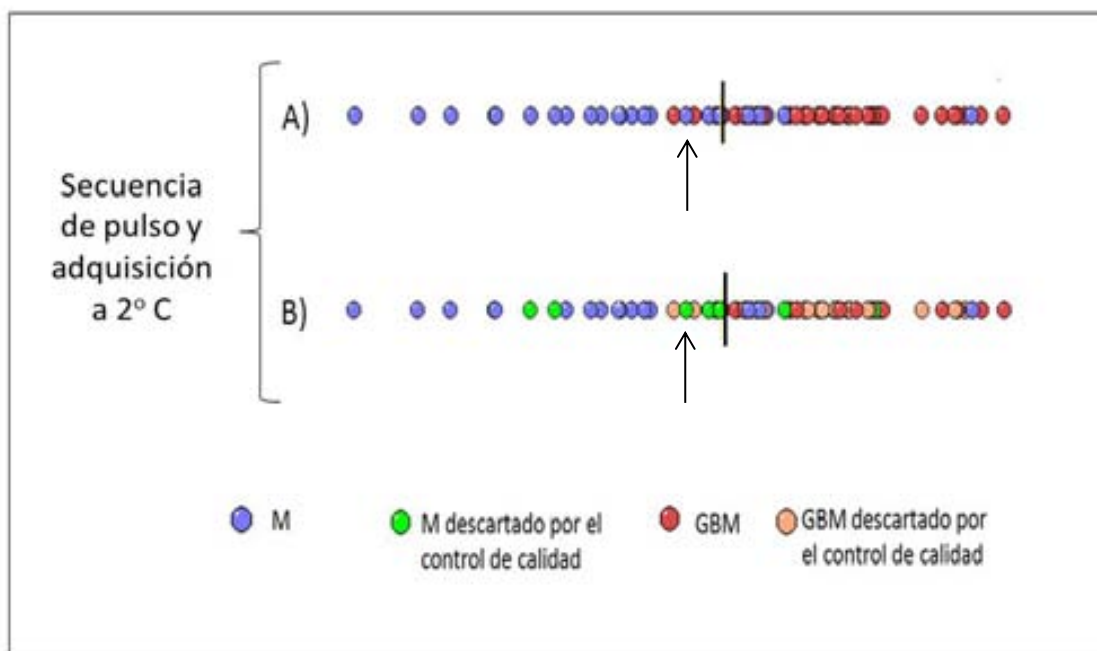


Figura 4.26. Espacio latente resultado de la discriminación entre GBM y M desarrollado con el SC en el estudio 2. A) Antes del filtrado de casos por aplicación del control de calidad (ver sección 3.10.1) y B) El mismo espacio latente obtenido después del filtrado de casos, con una codificación de colores que permite identificar los casos descartados. La flecha negra indica el caso 342, un M descartado por el control de calidad (ver patrón espectral en la figura 4.25).

Diagnóstico original	Casos totales iniciales	Casos descartados por diagnóstico post HRMAS no coincidente	Casos descartados en control de calidad espectral	Casos de "máxima calidad"
Glioblastoma	47	23	2	22
Meningioma	25	8	1	16

Tabla 4.7 Total de casos de "máxima calidad" utilizados en las clases GBM y M antes y después del filtrado por control de calidad.

Evaluación del efecto de la temperatura y la secuencia de adquisición en la robustez de clasificadores desarrollados después de llevar a cabo el diagnóstico histopatológico post HRMAS y control de calidad espectral.

Estudio 3: comprobar los posibles efectos discriminatorios, con validación previa mediante diagnóstico post HRMAS y control de calidad espectral, de los clasificadores desarrollados en el estudio 2.

Los resultados obtenidos de los clasificadores llevados a cabo con un previo control de calidad (descarte de casos por diagnóstico post HRMAS no coincidente y mala calidad espectral) se muestran en la tabla 4.8. Dichos casos, tal y como se procedió en el caso del estudio 2, se adquirieron a dos temperaturas diferentes (37° C y 2° C) y dos secuencias de adquisición diferentes (pulso y adquisición y espín eco). Las variables seleccionadas por el SC para esta clasificación se marcan con flechas en los espectros promedios de cada clase que se muestran en la figura 4.27.

Secuencia de adquisición	Temperatura (°C)	Variables y asignación metabólica	Acierto en el conjunto de entrenamiento (%)	BER (%)
Pulso y adquisición	2	<ul style="list-style-type: none"> • 1,71 ppm – Lisina • 3,83 ppm – Glutation + Etanolamina • 2,73 ppm – NAA • 1,67 ppm – ML • 2,95 ppm – GABA 	96	39,3
Pulso y adquisición	37	<ul style="list-style-type: none"> • 2,048 ppm – Glx + ML 	100	0
Espín eco	2	<ul style="list-style-type: none"> • 2,24 ppm – no asignado • 3,42 ppm – Tau 	87,5	22,6
Espín eco	37	<ul style="list-style-type: none"> • 2,75 ppm – Asp • 2,94 ppm – GABA • 2,83 ppm – Asp 	100	0

Tabla 4.8. Resumen de los resultados obtenidos con el desarrollo de clasificadores con diferentes secuencias y temperaturas de adquisición, después del filtrado de casos por control de calidad. Asignación tentativa del origen de las resonancias según el anexo 1 y la tabla 1.1.

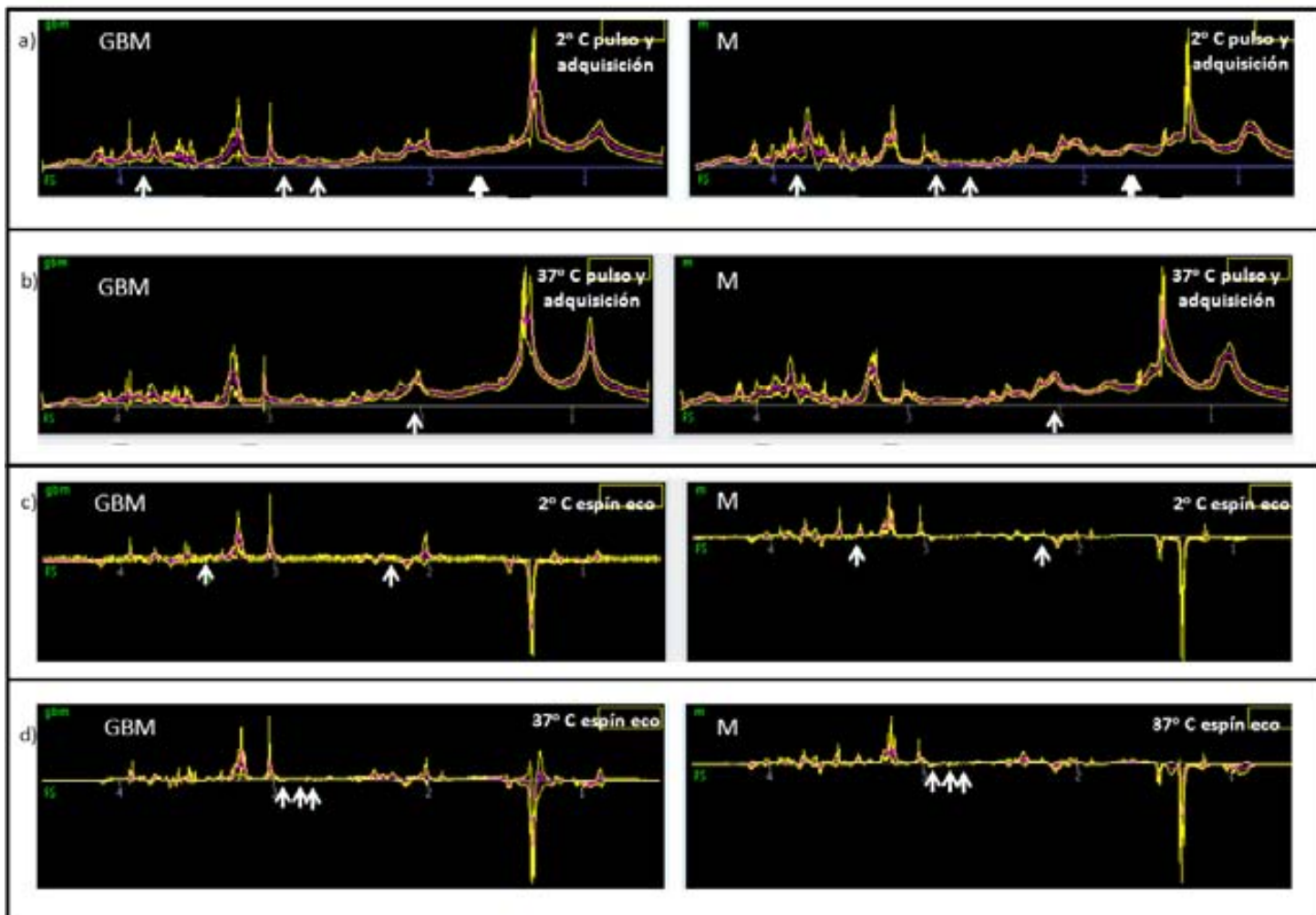


Figura 4.27. Espectros HRMAS promedio de cada clase estudiada (GBM y M) visualizados en el programa *SpectraClassifier*. a) y b) espectros promedio (en color lila) y desviación estándar (en color amarillo) obtenidos con la secuencia de pulso y adquisición a 2° y 37° C respectivamente. c) y d) espectros promedio (en color lila) y desviación estándar (en color amarillo) obtenidos con la secuencia espín eco a 2° y 37° C respectivamente. Las flechas indican los desplazamientos químicos (en ppm) de las características seleccionadas para el desarrollo del clasificador (en el caso de características muy cercanas, las flechas pueden llegar a verse superpuestas).

En la figura 4.28 se representa gráficamente el porcentaje de acierto tanto para el conjunto de entrenamiento como para el conjunto de testeo, además del porcentaje de BER para este último. También se observa el número óptimo de variables seleccionadas en el sistema, indicado por una flecha.

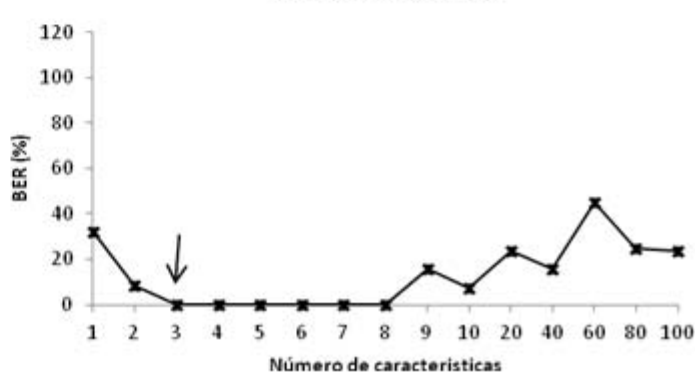
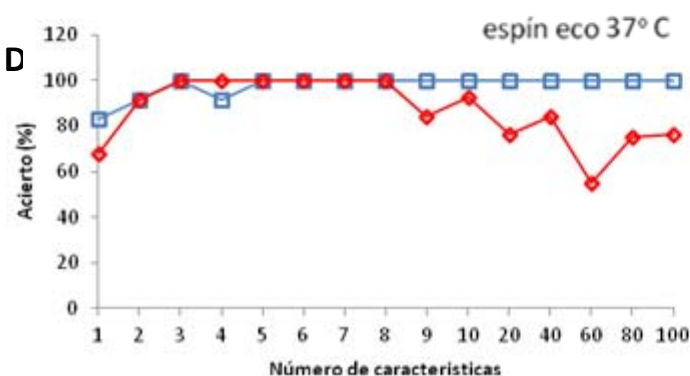
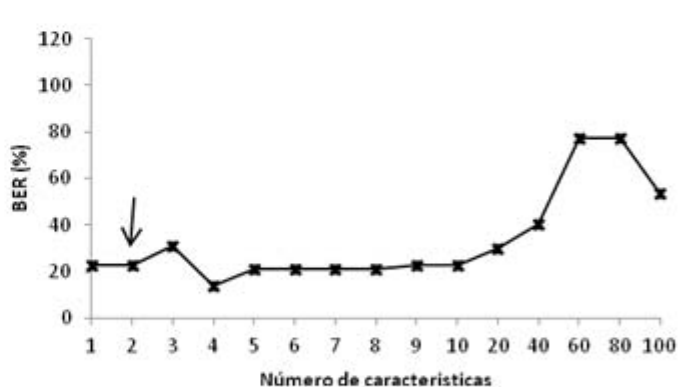
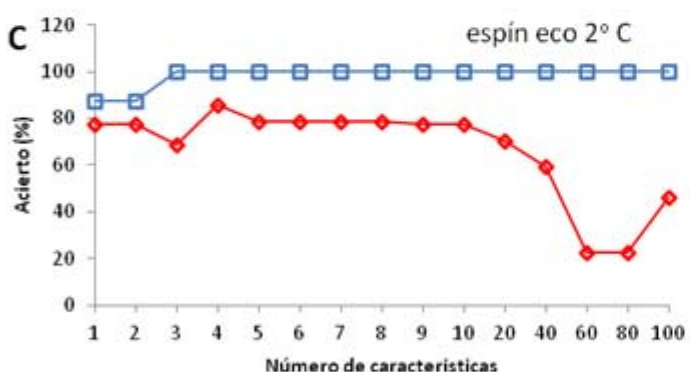
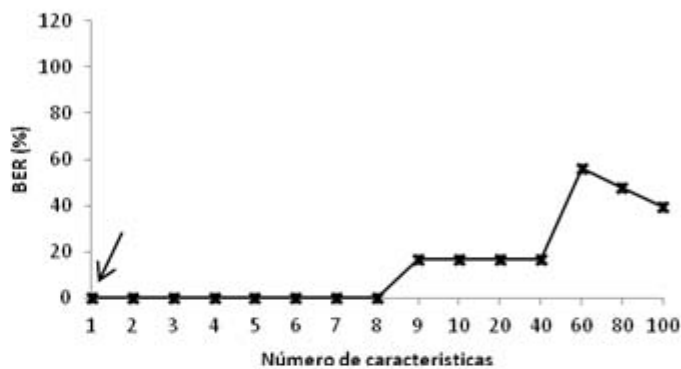
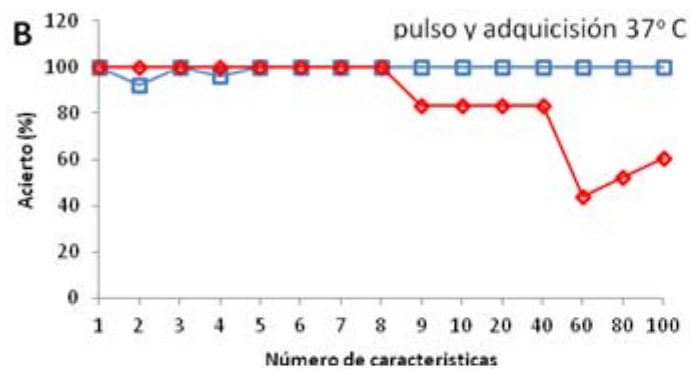
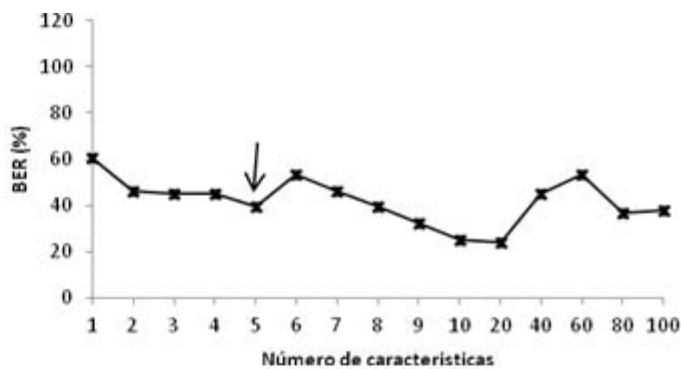


Figura 4.28. Gráficas representando el porcentaje de acierto para el conjunto de entrenamiento (azul) y de testeo (rojo), además de BER (negro). Las gráficas (A) y (B) muestran los resultados obtenidos para la secuencia de pulso y adquisición a 2° y 37° C respectivamente, mientras las gráficas (C) y (D) muestran los resultados obtenidos para la secuencia de espín eco a 2° y 37° C.

El espacio latente generado por el análisis LDA de dichos clasificadores se representa en la figura 4.29, donde se pueden observar los casos estudiados y su clasificación en las distintas clases evaluadas (GBM y M).

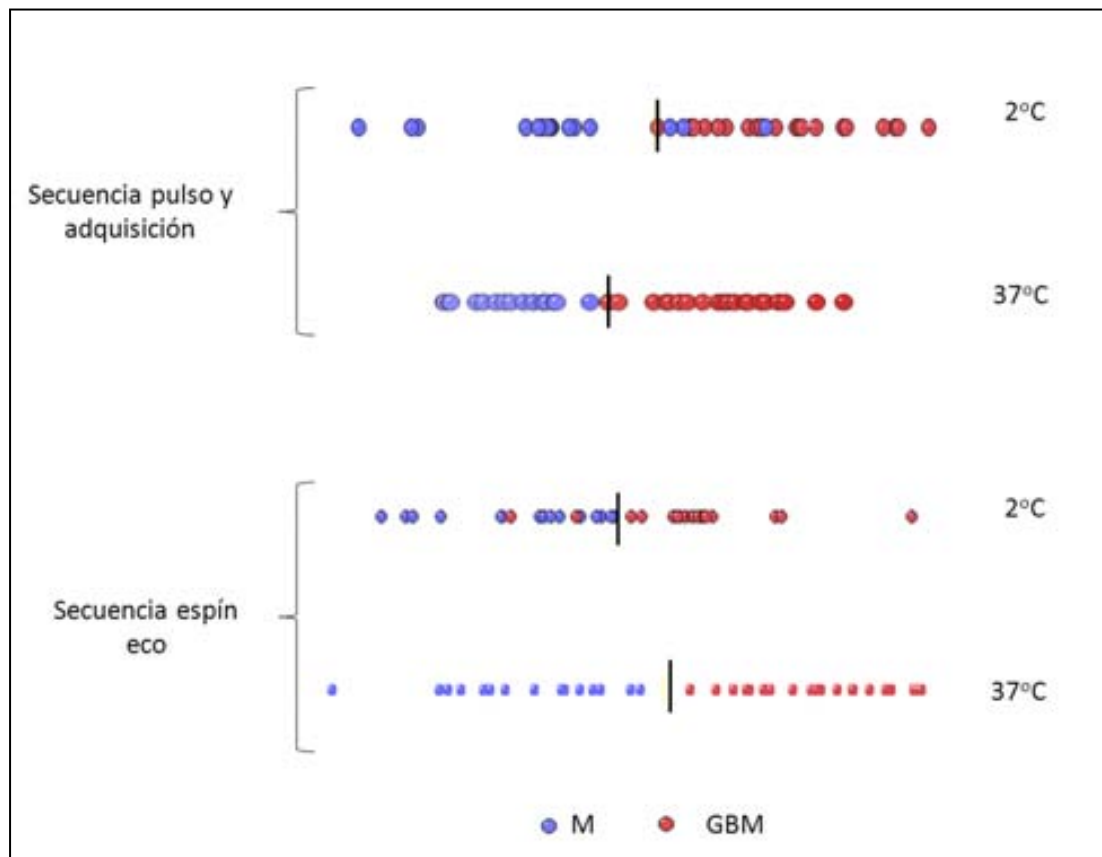


Figura 4.29. Espacio latente generado por el análisis LDA del conjunto de entrenamiento y testeo de los clasificadores desarrollados con el programa SC para la determinación de los posibles efectos discriminatorios a diferentes temperaturas y secuencias de adquisición, después de llevar a cabo el control de calidad por análisis histopatológico post HRMAS y control de calidad espectral.

En la figura anterior (4.29), además de la visualización de la discriminación producida por los clasificadores de la tabla 4.9, podemos observar también los casos erróneamente clasificados en las secuencias adquiridas a 2° C, mientras la clasificación obtenida a 37°C obtiene acierto en el total de los casos. En la figura 4.30 se muestran dos ejemplos de espectros pertenecientes a casos mal clasificados por los clasificadores del estudio 3. En la figura 4.30A se aprecia un caso de M que es clasificado por el sistema como GBM y en la figura 4.30B se observa un caso de GBM que es clasificado como M, ambos adquiridos a 2° C.

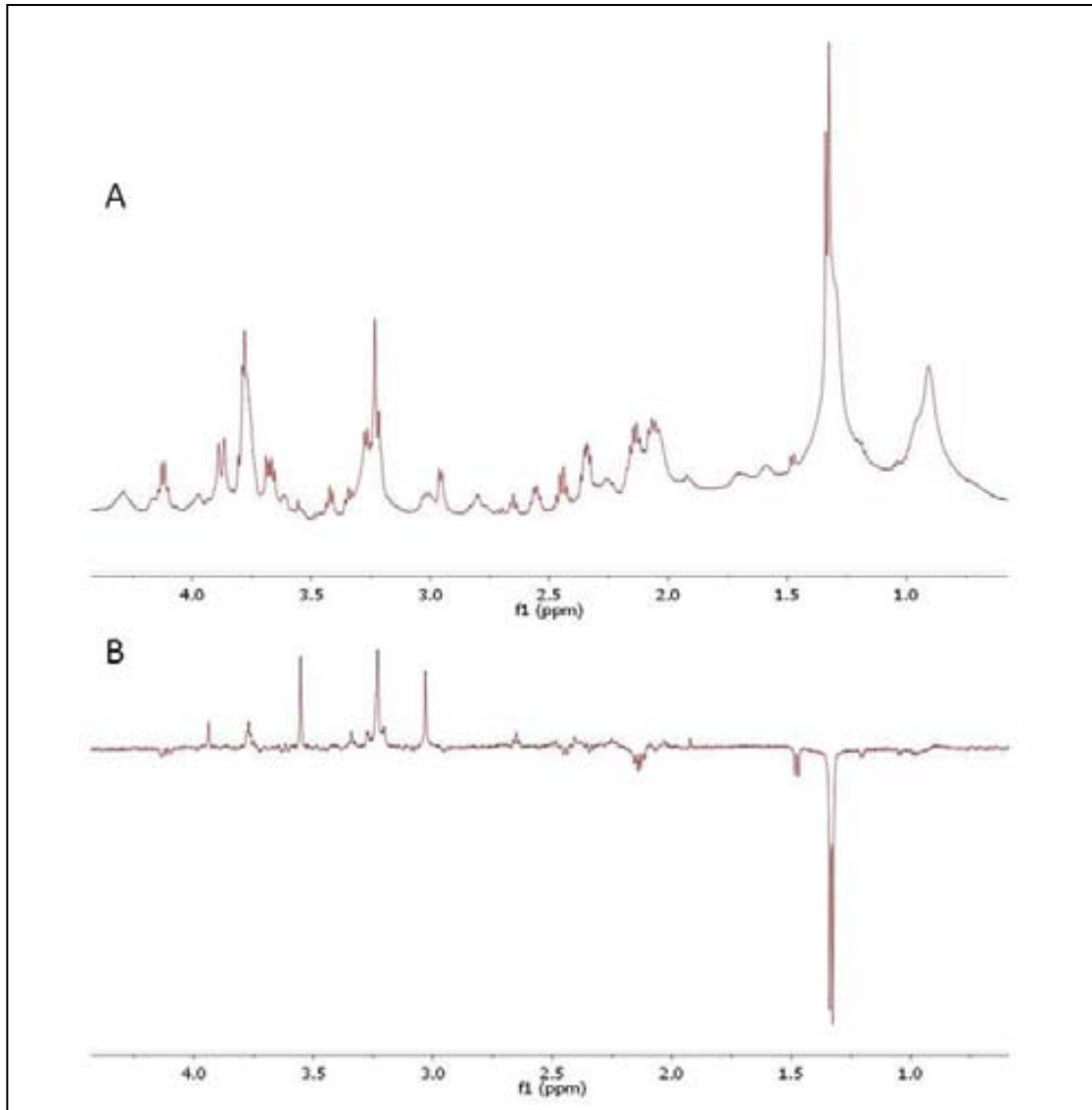


Figura 4.30 Casos clasificados erróneamente por los clasificadores desarrollados en el clasificador 3. A) M clasificado como GBM con la secuencia pulso y adquisición a 2° C. B) GBM clasificado como M con la secuencia espín eco a TE = 136 ms y 2° C.

Podemos observar que el espectro de la figura 4.30A no refleja todas las características de un espectro típico de meningioma. Comparando este espectro con el patrón típico de la figura 4.20 y con el espectro promedio generado por nuestro sistema (ver figura 4.27), observamos de manera cualitativa que en el espectro que se muestra en 4.30A están presentes señales correspondientes a ML y ChCCp con sus distintos componentes las cuales están generalmente relacionadas con tumores gliales [152]. Por otra parte, en la figura 4.30B

observamos un alto contenido de glicina, que aunque ha sido descrita como uno de los valores de metabolitos que se pueden encontrar elevados en algunos glioblastomas [153], no presenta una altura comparable en los espectros que reflejan el universo de casos usado en este estudio (ver por ejemplo espectro típico de GBM en la figura 4.20 y el espectro promedio generado por el clasificador en la figura 4.27). Cabe señalar, sin embargo, que esta variable no fue seleccionada para el proceso de clasificación. Además, ambos casos se clasificaron correctamente a temperatura de 37°C debido probablemente a que la información metabólica obtenida, por ejemplo la visualización de los lípidos móviles, es mayor a temperatura fisiológica.

4.6.2 Clasificadores desarrollados para datos adquiridos a 9,4T

Estudio 4: comprobar la posible variación de los efectos discriminatorios en biopsias cerebrales humanas debido a la irradiación previa con FMW.

Los resultados obtenidos con los clasificadores desarrollados a 9,4T a partir de biopsias con y sin irradiación de FMW (según se describe en la sección 3.10.2) se muestran en la tabla 4.9 y las variables seleccionadas para dicha clasificación se marcan con flechas en los espectros promedio de la figura 4.31.

Dichos espectros fueron adquiridos únicamente a 37°C, por haber sido la que presentó en general el mejor rendimiento entre las dos temperaturas estudiadas. Sin embargo, se continuaron adquiriendo los dos tipos de secuencia de adquisición.

Clasificador	Características seleccionadas	Acierto en el conjunto de entrenamiento (%)	BER (%)
Pulso y adquisición N-FMW	<ul style="list-style-type: none"> • 3,88 ppm - Asp • 2,06 ppm - Glx + ML 	95,9	8,3
Pulso y adquisición FMW	<ul style="list-style-type: none"> • 3,89 ppm- Asp • 1,02 ppm - ML 	100	8,3
Espín eco N-FMW	<ul style="list-style-type: none"> • 2,40 ppm - Succinato 	100	33,3
Espín eco FMW	<ul style="list-style-type: none"> • 1,19 ppm - ML • 4,00 ppm - Asparagina + ml 	92	8,3

Tabla 4.9. Resumen de los resultados obtenidos con el desarrollo de clasificadores para comprobar los posibles efectos discriminatorios en biopsias cerebrales humanas con y sin irradiación de FMW. Asignación tentativa del origen de las resonancias según el anexo 1.

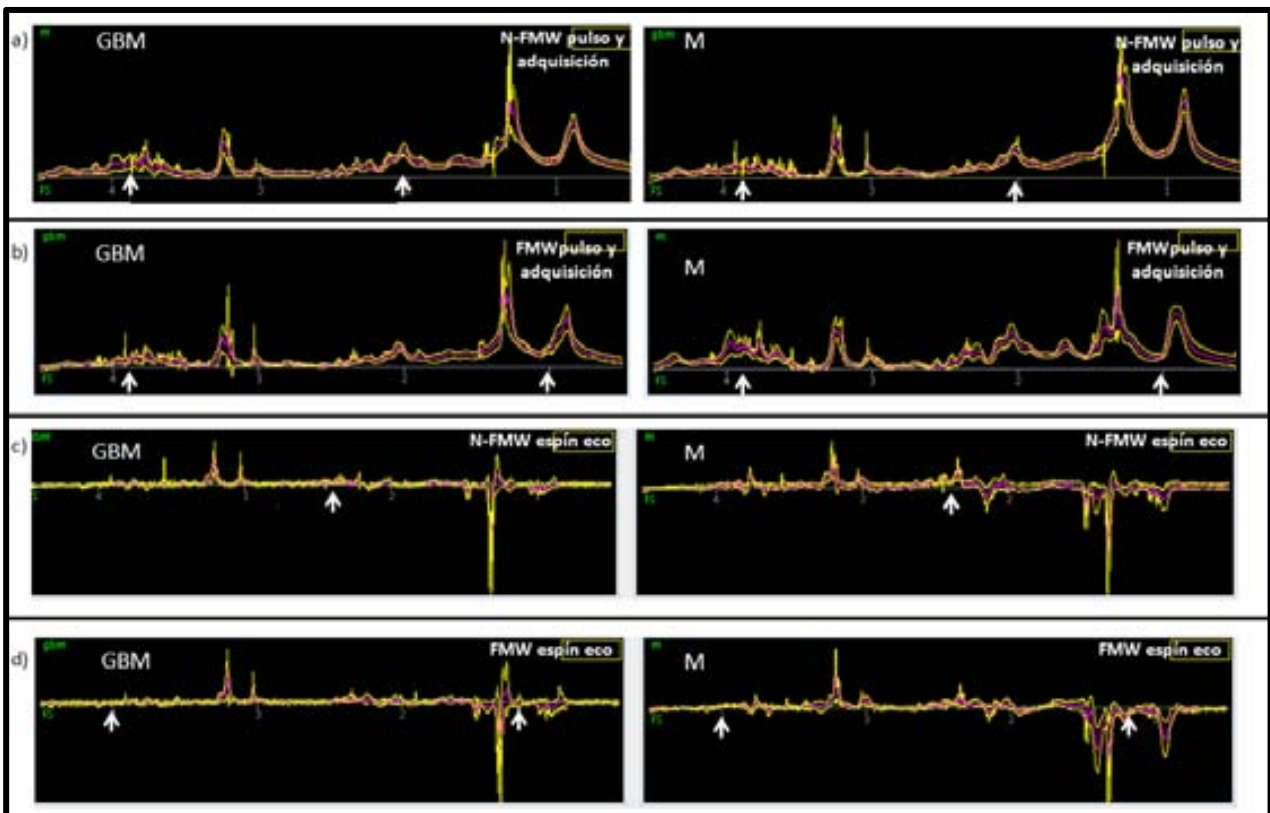


Figura 4.31. Espectros HRMAS promedio de cada clase estudiada (GBM y M) visualizados en el programa *SpectraClassifier*. a) y b) espectros promedio (en color lila) y desviación estándar (en color amarillo) obtenidos con la secuencia de pulso y adquisición a 37° C sin y con FMW respectivamente. c) y d) espectros promedio (en color lila) y desviación estándar (en color amarillo) obtenidos con la secuencia espín eco a 37° C sin y con FMW respectivamente. Las flechas indican los desplazamientos químicos (en ppm) de las características seleccionadas para el desarrollo del clasificador.

En la figura 4.32 se representa gráficamente el porcentaje de acierto tanto para el conjunto de entrenamiento como para el conjunto de testeo, además del porcentaje de BER para este último. También se observa el número óptimo de variables seleccionadas por el sistema, indicado con una flecha. Por otra parte, en la figura 4.33 se resumen gráficamente los resultados obtenidos al aplicar el clasificador desarrollado a la suma de todas las biopsias disponibles.

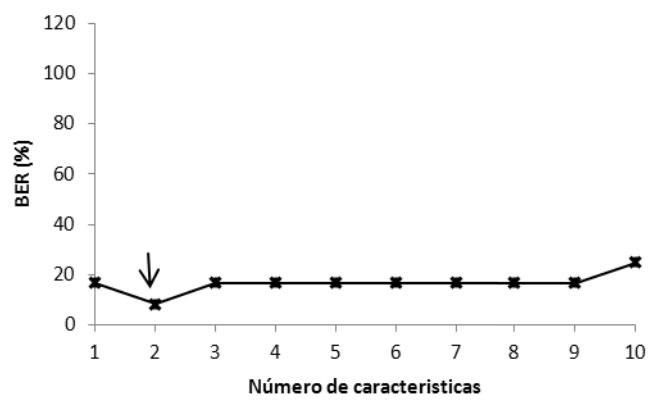
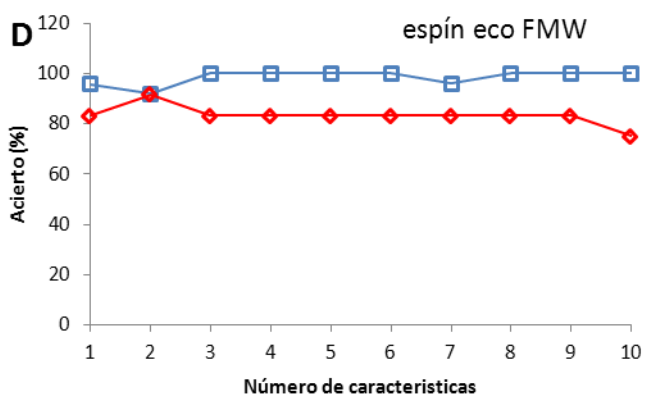
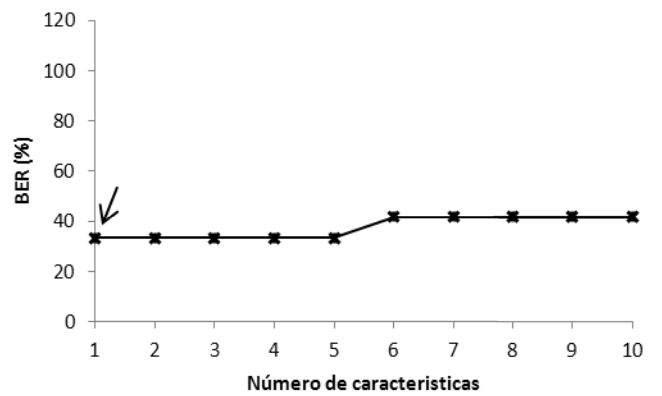
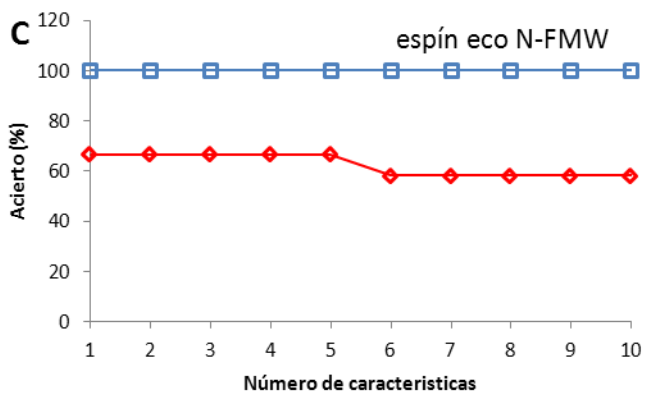
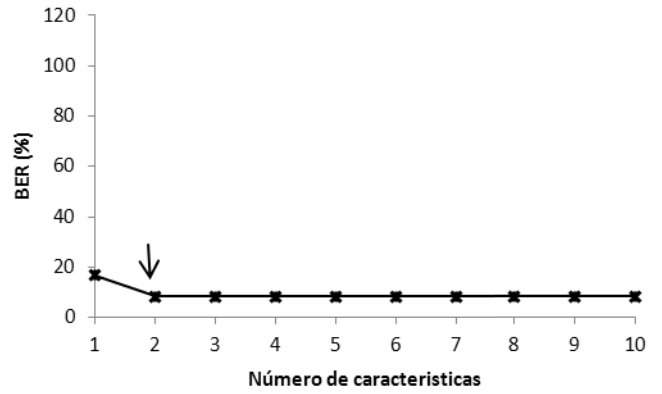
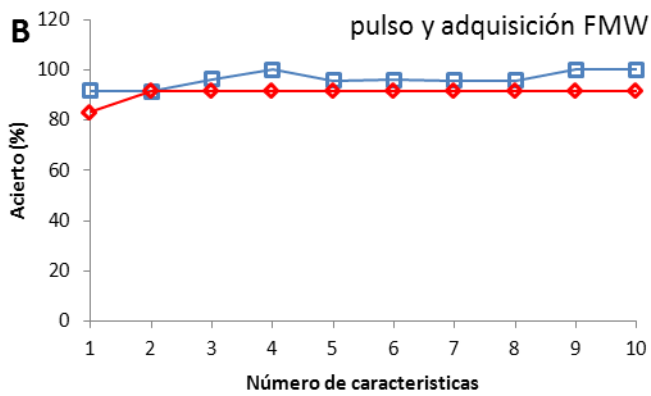
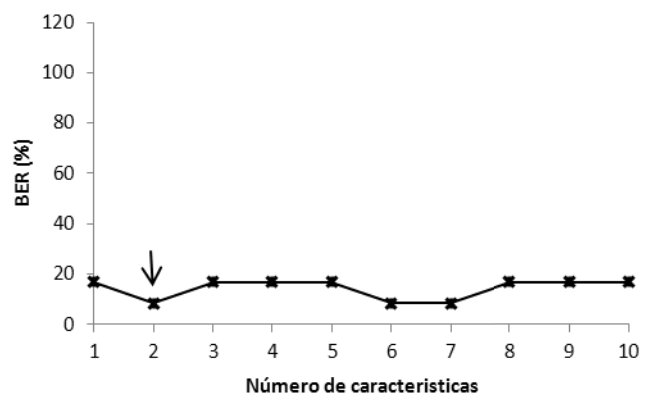
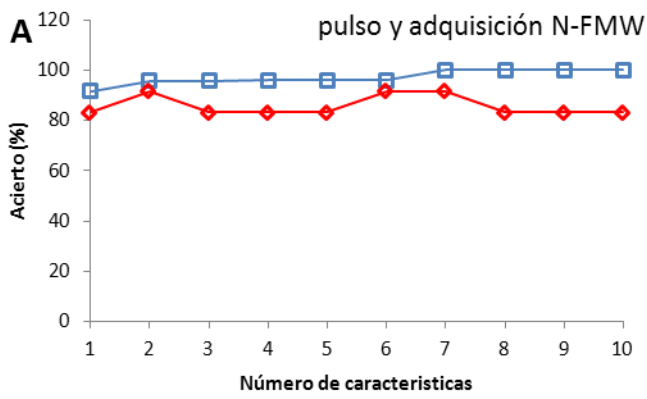


Figura 4.32 Gráficas representando el porcentaje de acierto para el conjunto de entrenamiento (azul) y de testeo (rojo), además de BER (negro). Las gráficas (A) y (B) muestran los resultados obtenidos para la secuencia de pulso y adquisición a 37° C sin o con FMW respectivamente, mientras las gráficas (C) y (D) muestran los resultados obtenidos para la secuencia de espín eco a 37° C.

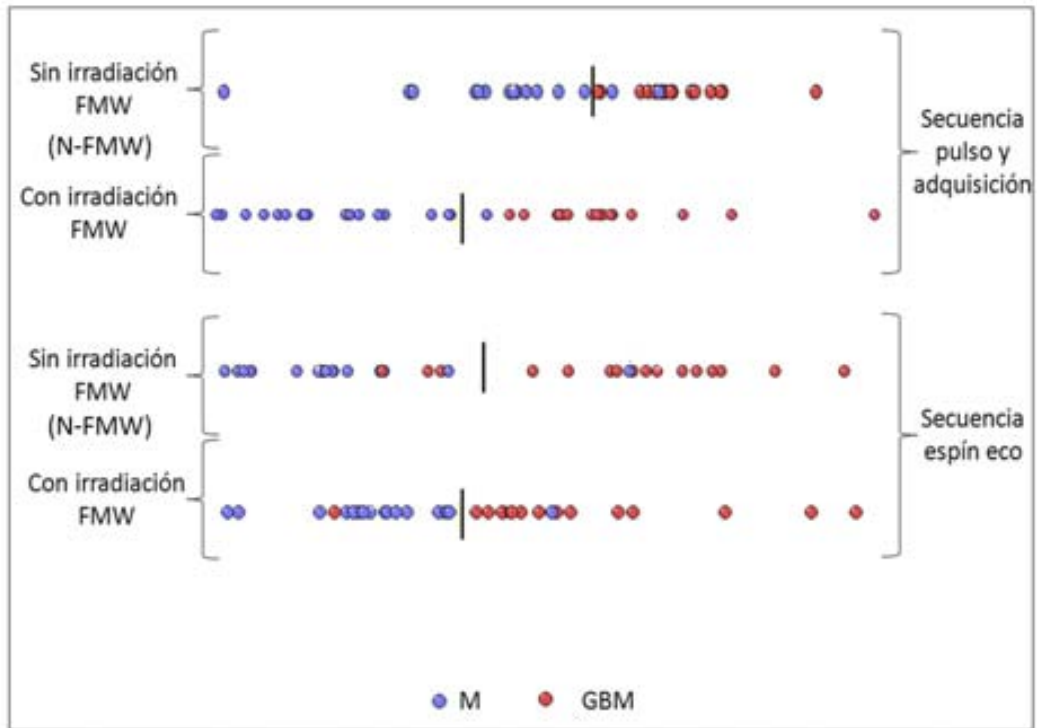


Figura 4.33. Espacio latente generado por el análisis LDA del conjunto de entrenamiento y testeo de los clasificadores desarrollados con el programa SC para la determinación de los posibles efectos discriminatorios de muestras de biopsias con (FMW) y sin (N-FMW) irradiación por FMW.

En la figura 4.34 se pueden observar algunos de los casos clasificados erróneamente, tanto para el grupo irradiado como para el no irradiado.

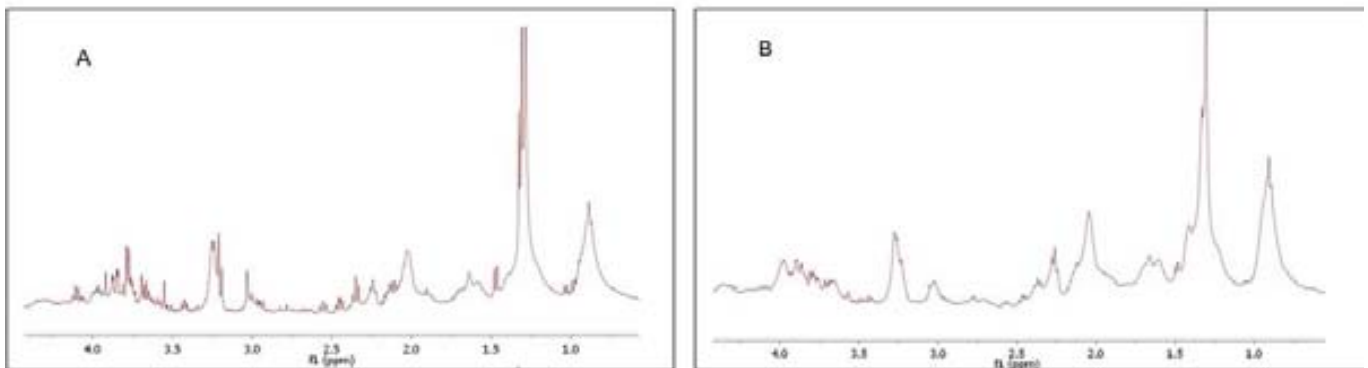


Figura 4.34 Espectros adquiridos a 9,4T y temperatura de 37° C de casos clasificados erróneamente por el sistema en los clasificadores del clasificador 4. A) Caso N-FMW de M clasificado como GBM y B) Caso FMW de M clasificado como GBM.

El caso de la figura 4.34A corresponde a un caso de M que se clasificó como GBM por el clasificador que utilizaba muestras N-FMW.

Se observa un espectro que no es consistente con los espectros representativos de M (ver figura 4.20), principalmente por la presencia de una señal de Cr relativamente intensa en comparación con la señal de Ala, lo que no sería compatible con un patrón espectral típico de meningioma. Dicho patrón típico debería reflejar relativamente poca presencia de Cr (en relación Ala) según lo descrito por Tugnoli y col. [154]. Cabe destacar, sin embargo, que este caso fue clasificado correctamente en el clasificador con biopsias irradiadas, lo que sugiere, para ese caso, un efecto positivo de la irradiación FMW en el desarrollo del clasificador. En relación al otro ejemplo de caso clasificado erróneamente (figura 4.34B), se observó con el clasificador con casos irradiados (FMW). En este caso, podemos observar un espectro de una muestra de meningioma con características espectrales compatibles con esta patología (ver figura 4.20C) que fue clasificado como un GBM. En este caso es muy posible que la clasificación errónea sea debida a una baja resolución espectral, quizás por falta de homogeneidad durante su adquisición. Sin embargo, dicho caso no fue descartado por los expertos espectroscopistas en el control de calidad. También cabe señalar que este caso también fue clasificado erróneamente en uno de los clasificadores realizados sin irradiación (N-FMW) y (espín eco 136ms) lo que sugiere que la irradiación FMW no fue un factor determinante que pudiese explicar su incorrecta clasificación.

Discusión general del análisis de los espectros de HRMAS mediante metodologías de reconocimiento de patrones

Poullet y col. [155] realizaron diversos estudios de clasificación de tumores cerebrales con el método LDA donde obtuvieron un 86,58% de acierto en un conjunto de testeo independiente (1/3 del total de casos) para la discriminación entre glioblastomas y meningiomas (total de casos: GBM, n = 22 y M, n=9) utilizando temperaturas bajas, entre 0 - 4° C. Este es un resultado similar al que se ha descrito en esta tesis para el estudio 2, con el que obtuvimos un 88,60% de acierto en el conjunto de entrenamiento, y un BER de 29,95% utilizando una temperatura de 2° C con una muestra de casos mayor (glioblastomas, n = 47 y meningiomas, n = 25). Avanzando un paso más, nuestros resultados han mejorado

lo descrito por otros al desarrollar el mismo clasificador con la adquisición de espectros a la temperatura fisiológica (37° C), donde obtuvimos un 95,40% de acierto para el conjunto de entrenamiento al desarrollar el clasificador y un BER de 7,50% al evaluarlo mediante un conjunto de testeo independiente.

Con relación a las variables relevantes para la discriminación de GBM vs M, distintos autores han descrito variables que coinciden parcialmente con lo observado en esta tesis. Por ejemplo, Poulet y colaboradores utilizaron para su discriminación la señal a 3,88 ppm, asignada tentativamente como Asp; esta variable también fue seleccionada por nuestro sistema para clasificación entre GBM y M, coincidiendo en la probable relevancia de esta señal en ésta discriminación. Además, autores como Erb y col. [152], que utilizaron muestras de glioblastoma para evaluar las propiedades predictivas de su modelo de estudio en su trabajo sobre grados de malignidad en oligodendrogliomas, observaron que los metabolitos que más contribuían a la discriminación para la pregunta planteada fueron ML, ChCCp, Tau, Gln, GABA, Cr entre otros. Algunas de estas señales también fueron seleccionadas para la discriminación entre GBM y M llevada a cabo en esta tesis (ver tabla 4.7 y 4.9). Cabe señalar que aunque los autores en [152] no estudiaron el mismo tipo de discriminación, la superposición parcial entre las variables descritas por ellos y las descritas en esta tesis sugieren su posible relevancia para la discriminación entre tumores.

Los estudios 2, 3 y 4 proponen también la relevancia de variables en la región de 2,05 y 2,10 ppm entre aquellas requeridas para la discriminación optimizada entre GBM vs M. Ésta variable se asignó tentativamente a Glx (Glu + Gln), el cual tiene una composición de multiplete pudiendo estar distribuida en un rango amplio de ppm, pero también puede tener una posible contribución adicional de ML. Tugnoli y col. [154] han sugerido que el Glu, entre otros metabolitos (Gln, Cho, ChCCp, Ala, Gly y Tau) es un componente habitual elevado de las biopsias de los meningiomas, lo que podría explicar su selección en los clasificadores que incluyeran esta clase en la discriminación. Finalmente, Monleón y col. [156] sugirieron los metabolitos Tau, ChCCp y Cr como marcadores de grado histológico de tumores en sus estudios sobre meningiomas, lo que concuerda con los resultados descritos en este apartado de la tesis y la relevancia de estas señales en la clasificación.

En lo que concierne a la temperatura de adquisición, los resultados obtenidos para los estudios 2 y 3 sugieren que se trata de un factor muy importante y que puede influir en el rendimiento de los clasificadores desarrollados para estos tipos de tumores cerebrales. En este sentido, los clasificadores desarrollados con espectros adquiridos a temperatura fisiológica parecen permitir una mejor detección de resonancias de lípidos móviles que puede ser relevante para dicha discriminación sea de manera directa, como características espectrales seleccionadas, o indirecta, afectando la normalización “*unit length*” del resto de resonancias. Con respecto a los ML, se ha demostrado en modelos celulares que dichas resonancias pueden actuar como marcadores de la tasa de proliferación celular [157,158] aunque en tumores intactos y en sus biopsias, la contribución de posibles zonas necróticas y/o hipóxicas a dichas resonancias de ML no es desdeñable [159,160]. El resultado obtenido con los clasificadores a temperatura fisiológica podría ser parcialmente explicado por resultados publicados anteriormente por nuestro grupo [117], en los que se ha descrito una mayor visibilización de resonancias como ML y ChCCp al aumentar la temperatura de registro de los espectros de HRMAS. Esto se debería posiblemente al posible cambio de fase observado con el aumento de temperatura de los ML contenidos en gotículas lipídicas intra o extracelulares (descrito en [117]), y esta mayor visibilidad parece contribuir al desarrollo de clasificadores, mejorando el rendimiento de la discriminación bilateral obtenida en este caso. Dicha contribución, sin embargo, no parecería ser directa según la mayor parte las variables seleccionadas en las secuencias de tipo pulso y adquisición, pero su efecto podría ser indirecto como se ha comentado antes, a través de la normalización UL2.

Encuanto a las secuencias de adquisición, los resultados descritos tanto para los estudios 2 y 3 como para el estudio 4, apuntan a un mejor rendimiento global (considerando el porcentaje de acierto y BER) para la secuencia pulso y adquisición en la clasificación entre GBM y M, en comparación con la secuencia de espín eco. Esto podría ser debido a que el patrón espectral observado en las secuencias espín eco se ve afectado de manera substancial por dos parámetros principales: el T_2 de las moléculas de estudio y el acoplamiento escalar “J” entre protones de una molécula. Aunque inicialmente esto podría repercutir positivamente en la discriminación (por ejemplo, con la identificación inequívoca

del lactato en las secuencias de espín eco a TE 136ms por su constante de acoplamiento que lleva a su inversión en el espectro), parece ser que la pérdida de información causada por la atenuación/desaparición de moléculas que presentan un T_2 muy corto (ML, macromoléculas) repercute de manera negativa en el rendimiento global de dichos clasificadores. Por lo tanto, creemos que la información metabólica es mayor en los espectros obtenidos con la secuencia pulso y adquisición con respecto a los espectros obtenidos con la secuencia de espín eco. Sin embargo, es importante una valoración conjunta del efecto secuencia de adquisición + temperatura en el rendimiento global de los clasificadores.

En este sentido, valorando conjuntamente la influencia de la secuencia de adquisición y de la temperatura en el rendimiento de los clasificadores, los resultados que se obtuvieron durante el estudio 3 sugieren que la eficacia de los clasificadores aumenta con los espectros obtenidos a 37° C, con ambas secuencias de adquisición. No así con la temperatura de 2° C en que la secuencia de pulso y adquisición mejora su rendimiento en el conjunto de entrenamiento pero empeora el porcentaje de BER en el conjunto de testeo (lo que se refleja en un peor rendimiento de éste). Asimismo, la secuencia de espín eco también experimenta un empeoramiento de su rendimiento cuando se utilizan los espectros adquiridos a 2° C. Esto podría deberse, como ya comentado previamente, a que la movilización aumentada de ciertos compuestos observada con la temperatura de 37° C tenga un papel destacable en esta discriminación. En efecto, para el clasificador desarrollado con la secuencia de pulso y adquisición a 37° C, la única variable seleccionada coincide parcialmente con el rango de ppm de la señal de ML (cuya movilización es relevante, como se ha comentado previamente). Tampoco se puede despreciar el posible efecto de homogenización de los grupos que haya tenido lugar después de la aplicación de los criterios de control de calidad, lo que no necesariamente tiene que reflejar un impacto positivo en la clasificación.

El análisis histopatológico post HRMAS fue posible en casi todos los casos, lo que ya había sido previamente descrito por Cheng y colaboradores [161] que describieron en sus estudios que después de la adquisición de espectros HRMAS a 3° C, con velocidades de giro entre 300 y 700 Hz era posible analizar la muestra por histopatología. Mahon y colaboradores [162,163] también encontraron que

después de sus estudios a 25° C con una velocidad de giro de 4500 Hz fue posible llevar a cabo el análisis histopatológico. Resultados comparables fueron también descritos en nuestros estudios previos [117]. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en ésta tesis, parece ser altamente recomendable llevar a cabo dicho análisis de manera regular, para evitar clasificaciones erróneas de los casos debido a un error de *sampling* de la muestra de histopatología, cogiendo una parte del tejido que no corresponda a la totalidad del tumor.

Por último, con respecto a los resultados obtenidos con el clasificador para comprobar los posibles efectos discriminatorios en biopsias cerebrales humanas con y sin irradiación de FMW (clasificador 4), se pudo observar un mejor rendimiento del clasificador desarrollado con muestras irradiadas por FMW con la secuencia pulso y adquisición. En la figura 4.32B se observa como el clasificador para la secuencia de pulso y adquisición, utilizando sólo dos variables, logra un 100% de acierto en el conjunto de entrenamiento y mantiene un promedio de 8,3% de BER independientemente del número de variables seleccionadas. También se puede observar que el porcentaje promedio de BER aumenta para la misma secuencia cuando se utilizan muestras N-FMW (14,18%, valor que se obtiene promediando todos los valores individuales de BER). Estos resultados nos permiten sugerir que el proceso optimizado en esta tesis, de irradiación de las biopsias para la preservación de su patrón espectral, no solo es eficaz para evitar el metabolismo *post mortem* sino que además parece tener también un ligero efecto positivo en el rendimiento de los clasificadores. En todo caso, su efecto no parece ser en ningún caso perjudicial.

Además, se ha observado que la separación entre los dos grupos en las representaciones del espacio latente parece más definida que en el grupo no irradiado, aunque los casos parecen distribuirse de manera más dispersa en el espacio latente obtenido para su clasificación. Estos resultados pueden estar relacionados con la rápida inactivación del metabolismo *post mortem* que es importante para evitar los cambios en los metabolitos resultantes del periodo isquémico [164]. Dichos cambios podrían introducir cierto “ruido experimental” y variabilidad inesperada en este tipo de estudios, llevando a una discriminación con peor rendimiento. Bazinet y col. [165], en ese sentido, describieron una mejora de sus resultados al reducir la variabilidad de mediciones basales de un

neurotransmisor en cerebro de rata, cuando utilizaron fijación inmediata por FMW después del sacrificio de una rata por decapitación, en comparación con resultados obtenidos utilizando la misma fijación 5 minutos después de del sacrificio. Esto sugirió la conveniencia de considerar el uso rápido del método de irradiación FMW para eliminar las variaciones que se producen por isquemia *post mortem*.

Como resumen general, cabe comentar que los distintos pasos llevados a cabo en este apartado de la tesis nos ha permitido estudiar y optimizar diferentes aspectos relacionados a los clasificadores basados en reconocimiento de patrones espectrales. Por una parte, en el estudio 1 se ha comprobado que el programa *SpectraClassifier*, desarrollado en el GABRMN, fue capaz de replicar los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo con el programa R y con el mismo conjunto de datos. En los estudios 2 y 3, se comprobó que el aumento de la población de casos, sobre todo si no se acompaña del debido control de calidad, muchas veces no tiene un impacto positivo en el rendimiento de un clasificador concreto, lo que lleva al planteamiento de la necesidad de un estricto control de calidad previo al desarrollo clasificadores similares. En nuestro caso, se han descartado entre el 30% y el 50% de los espectros según la patología en estudio, lo que también plantea la necesidad de trabajar con una población elevada de espectros, para que la realización del control de calidad no acabe imposibilitando la consecución de los clasificadores del estudio. Estos clasificadores también aportaron información relevante sobre la influencia de la temperatura y la secuencia de adquisición en el rendimiento de un clasificador en concreto. Más específicamente, se pudo comprobar que, por lo menos en lo que concierne a los casos estudiados en esta tesis, la temperatura fisiológica (37° C) y la secuencia de pulso y adquisición son las que presentan mejores resultados de manera global. Finalmente, en el estudio 4 se pudo optimizar el desarrollo de clasificadores para la discriminación entre GBM y M con la irradiación de biopsias humanas criopreservadas para minimizar posibles cambios *post mortem*, centrándonos en las condiciones de adquisición que mejores resultados habían producido en los clasificadores anteriores, y se pudo comprobar que la irradiación FMW no ejercía un efecto negativo sobre la performance del clasificador.

Hacen falta más estudios para profundizar, por un lado, y aplicar, por otro, lo que se ha descrito en esta tesis, sobre todo utilizando grupos de patologías cuya

separación sea conceptualmente más difícil, como por ejemplo gliomas de distintos grados o subtipos de glioblastomas. Sin embargo, es de esperar que las optimizaciones y resultados logrados en esta parte de la tesis sirvan como el punto de partida indispensable para la consecución de dichos clasificadores en estudios discriminativos más complejos.

5. CONCLUSIONES

Bloque 1. Conclusiones relativas al estudio de la influencia del método de sacrificio en el patrón espectral de HRMAS en cerebro de ratón wt C57BL/6 y en el modelo de infarto cerebral de rata

1. Se pusieron a punto los parámetros experimentales para la correcta realización del sacrificio de ratones por irradiación de FMW y a partir de esto, las estrategias para sacrificio por irradiación de FMW en rata.
2. Se llevó a cabo un estudio exhaustivo por análisis de HRMAS en muestras obtenidas de ratones wt C57BL/6 para determinar si el método de sacrificio utilizado (sobredosis de anestesia vs. irradiación por FMW) resultaba determinante en la preservación del patrón espectral. Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en metabolitos relacionados con cambios *post mortem* como Lac, Ace y PCr.
3. Se logró una estabilización del patrón espectral en animales irradiados con FMW en comparación con animales sacrificados por sobredosis de anestesia. La presencia/ausencia de PCr elevada es un buen indicador de la minimización de cambios *post mortem* ya que está involucrada en el metabolismo energético de tejidos con demanda fluctuante de energía. Se ha observado un cociente de las alturas de las señales de PCr/Cr de $0,80 \pm 0,1$ que es coherente con la estabilización del patrón espectral en la colaboración establecida al efecto.
4. La estabilidad del patrón espectral en las adquisiciones efectuadas a lo largo de 187 minutos de ratas con infarto sacrificadas por FMW es evidente. No se han observado cambios superiores al de la PtdCho que presentó un factor de cambio de 1,02 (0,02%). Esto nos proporcionó la posibilidad de realizar un estudio metabolómico completo y fiable por inactivación de enzimas como la cretina fosfoquinasa donde todos los cambios observados se debieron tan solo a la presencia de infarto y no de metabolismo *post mortem* en la muestra.

Bloque 2. Conclusiones relativas al estudio de la minimización de cambios en el patrón espectral por irradiación de muestras de tumores preclínicos (tumor glial GL261) después de su extracción y congelación

1. Se ha puesto a punto un método intermediario de conservación del patrón espectral llevando a cabo irradiación FMW de muestras de tumor después de su extracción y congelación. Dicho método pretendía poder aplicarse a las biopsias humanas para preservación de su patrón espectral durante adquisiciones HRMAS a temperatura fisiológica, imposible de lograr por intermedio de otro método.
2. Este método aseguró una estabilidad del patrón espectral casi absoluta y muy consistente, en comparación con las muestras que no fueron sometidas a la irradiación, que mostraron cambios estadísticamente significativos ($p < 0,05$) por ejemplo en el caso del acetato, N-acetil aspartato, colina y fosfocolina.
3. Se realizaron comprobaciones por análisis de alturas de los vectores espectrales y por análisis de las áreas calculadas por integración de los metabolitos con cambios más significativos en ausencia de irradiación. El cambio más relevante observado en las muestras no irradiadas se produjo en la señal a 3,19 ppm, que aumentó alrededor de 1,7 veces a lo largo de los 374 minutos de adquisición HRMAS a 37° C, además de un aumento de 1,1 veces en la señal de fosfocolina a 3,21 ppm. La señal de GPCho a 3,23 ppm disminuyó hasta un 90% de su valor inicial. Otra variación importante tuvo lugar en la intensidad del Ac a 1,90 ppm, con un aumento de 1,5 veces en su señal. Por otro lado, no hubo variación apreciable en el caso de muestras irradiadas con FMW.
4. El método desarrollado se aplicó a muestras de biopsias humanas de glioblastomas y meningiomas para el estudio de la influencia de la irradiación por FMW en el desarrollo de clasificadores automáticos de reconocimiento de patrones utilizando espectros HRMAS.

Bloque 3. Conclusiones relativas al estudio y desarrollo de clasificadores automáticos de reconocimiento de patrones espectrales utilizando espectros de HRMAS: prueba de concepto para distinción entre glioblastomas multiformes y meningiomas.

1. Se ha puesto a punto el método de desarrollo de clasificadores automáticos de reconocimiento de patrones espectrales utilizando el programa *SpectraClassifier*, donde se ha llevado a cabo una prueba de concepto inicial reproduciendo clasificadores previamente desarrollados en el grupo, lográndose resultados similares que han reflejado la simplicidad y robustez del nuevo sistema.
2. Se han estudiado clasificadores a distintas temperaturas y secuencias de adquisición, en una población considerable de casos (GBM n=47 y M n=25). No obstante no se ha logrado reproducir los porcentajes de acierto previamente logrado con este tipo de clasificadores en nuestro grupo. No se logró ningún porcentaje de acierto superior a 95,50% con el grupo de entrenamiento, y ningún BER inferior al 7,5%.
3. Se ha comprobado que el aumento de la población de casos, sobre todo si no se acompaña del debido control de calidad en dichos casos, muchas veces no tiene un impacto positivo en el rendimiento de un clasificador concreto, lo que llevó al planteamiento de un estricto control donde se han descartado entre el 30% y el 50% de los casos inicialmente utilizados.
4. Se ha repetido el clasificador utilizando distintas secuencias y temperaturas de adquisición una vez realizado el control de calidad de los espectros incluidos y se obtuvo un 100% de acierto en el grupo de entrenamiento en las dos secuencias a 37° C. Por otro lado, el BER fue más elevado en las adquisiciones realizadas a 2° C. Esto nos llevó a concluir que las secuencias que se adquieren a 37° C son más adecuadas para el desarrollo de clasificadores de este tipo y permiten un mejor análisis de ciertos componentes como los lípidos móviles y compuestos de colina.
5. El desarrollo de clasificadores con muestras que habían sido previamente irradiadas con FMW presentó un mejor rendimiento (100%) con la secuencia pulso y adquisición en comparación con el clasificador que utilizaba espectros de biopsias irradiadas (95,9%). El BER, no obstante, fue igual en ambos casos. Respecto a la secuencia espín eco, el grupo de biopsias no

irradiadas presentó un 100% de acierto en el conjunto de entrenamiento, aunque con un BER elevado (33,3%), mientras que el grupo de biopsias irradiadas presentó un 92% de acierto y un BER de 8,3%.

6. Las variables escogidas para la clasificación son coherentes con lo esperado para estos tipos de tumorales y reflejan la presencia de lípidos móviles en muchos casos (típicos de tumores agresivos como los glioblastomas) y glutamato/glutamina, compuestos de colina y alanina (típicos de tumores meningeales). Esto sugiere que el sistema de clasificación detecta correctamente elementos característicos en el patrón espectral y los aplica adecuadamente para la separación de los grupos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Rabi I, Millman S, Kusch P (1938). A new method of measuring nuclear magnetic moment. *Phys Rev* 53:318.
2. Gadian DG (1996). *NMR and its applications to living systems*. Oxford: Oxford Science Publications.
3. Campbell ID and Dwek RA (1984). *Nuclear magnetic resonance. Biological spectroscopy*. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings Publishing Co.
4. Michigan State University Department of Chemistry. <http://www.cem.msu.edu/~reusch/OrgPage/nmr.htm>. (último acceso 18/10/2013).
5. Macomber RS (1998). *Obtaining an NRM spectrum. A complete introduction to modern NMR spectroscopy*. New York: Wiley-Interscience.
6. Gili J and Capdevila A (1992). *La relajación nuclear. Resonancia Magnética*. Barcelona: Centre de Diagnòstic Pedralbes.
7. Rinck PA (2003). *Magnetic Resonance in Medicine*. Berlín: Blackwell Science Ltd.
8. Dwek RA (1973). *Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry*. London: Oxford Univ. Press.
9. Westbrook C (2002). *MRI at a Glance*. Massachusetts: Blackwell Science Ltd.
10. Majos C, Alonso J, Aguilera C, Serrallonga M, Perez-Martin J, Acebes JJ, Arus C, Gili J (2003). 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* 13:582-591.
11. Westbrook CK (1998). *MRI in Practice*. Osney Mead, Oxford: Blackwell Science Ltd.
12. Tate AR, Underwood J, Acosta DM, Julià-Sapé M, Majós C, Moreno-Torres A, Howe FA, van der Graaf M, Lefournier V, Murphy MM, Loosemore A, Ladroue C, Wesseling P, Luc Bosson J, Cabanas ME, Simonetti AW, Gajewicz W, Calvar J, Capdevila A, Wilkins PR, Bell BA, Remy C, Heerschap A, Watson D, Griffiths JR, Arús C (2006). Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra. *NMR Biomed* 19:411-434.
13. Majós C (1999). *Espectroscopía por resonancia magnética de protón en el diagnóstico de tumores cerebrales*. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, Barcelona, España. <http://hdl.handle.net/10803/2456> (enlace TDX, último acceso 19/10/2013).
14. Millis KK, Maas WE, Cory DG, Singer S (1997). Gradient, high-resolution, magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy of human adipocyte tissue. *Magn Reson Med* 38:399-403.

15. Cheng L, Ma M, Becerra L, Ptak T, Tracey I, Lackner A, González R (1997). Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci* 12:6408–6413.
16. Moestue S, Sitter B, Bathen TF, Tessem MB, Gribbestad IS (2011). HR MAS MR spectroscopy in metabolic characterization of cancer. *Curr Top Med Chem* 11:2-26.
17. Andrew ER, Newing RA (1958). The narrowing of nuclear magnetic resonance spectra by molecular rotation in solids. *Proc Physical Society* 72:959-972.
18. Lowe IJ (1959). Free Induction Decays of Rotating Solids. *Phys Rev Lett* 2:285-287.
19. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK (2009). High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy: Application to biomedical studies. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 5:79-100.
20. Burns MA, Taylor JL, Wu CL, Zepeda AG, Bielecki A, Cory D, Cheng LL (2005). Reduction of spinning sidebands in proton NMR of human prostate tissue with slow high-resolution magic angle spinning. *Magn Reson Med* 54:34-42.
21. Beckonert O, Coen M, Keun HC, Wang Y, Ebbels TM, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK (2010). High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nat Protoc* 5:1019-1032.
22. Cuellar-Baena S, Morales JM, Martinetto H, Calvar J, Sevlever G, Castellano G, Cerda-Nicolas M, Celda B, Monleon D (2010). Comparative metabolic profiling of paediatric ependymoma, medulloblastoma and pilocytic astrocytoma. *Int J Mol Med* 26:941-948.
23. De Silva SS, Payne GS, Thomas V, Carter PG, Ind TE, deSouza NM (2009). Investigation of metabolite changes in the transition from pre-invasive to invasive cervical cancer measured using (1)H and (31)P magic angle spinning MRS of intact tissue. *NMR Biomed* 22:191-198.
24. Grinde MT, Moestue SA, Borgan E, Risa O, Engebraaten O, Gribbestad IS (2011). ¹³C high-resolution-magic angle spinning MRS reveals differences in glucose metabolism between two breast cancer xenograft models with different gene expression patterns. *NMR Biomed* 24:1243-1252.
25. Levin YS, Albers MJ, Butler TN, Spielman D, Peehl DM, Kurhanewicz J (2009). Methods for metabolic evaluation of prostate cancer cells using proton and (13)C HR-MAS spectroscopy and [3-(13)C] pyruvate as a metabolic substrate. *Magn Reson Med* 62:1091-1098.
26. Chen JH, Wu YV, DeCarolis P, O'Connor R, Somberg CJ, Singer S (2008). Resolution of creatine and phosphocreatine 1H signals in isolated human skeletal muscle using HR-MAS 1H NMR. *Magn Reson Med* 59:1221-1224.

27. Opstad KS, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA (2009). Taurine: a potential marker of apoptosis in gliomas. *Br J Cancer* 100:789-794.
28. Santos CF, Kurhanewicz J, Tabatabai ZL, Simko JP, Keshari KR, Gbegnon A, Santos RD, Federman S, Shinohara K, Carroll PR, Haqq CM, Swanson MG (2010). Metabolic, pathologic, and genetic analysis of prostate tissues: quantitative evaluation of histopathologic and mRNA integrity after HR-MAS spectroscopy. *NMR Biomed* 23:391-398.
29. Martínez-Bisbal MC, Martí-Bonmatí L, Piquer J, Revert A, Ferrer P, Llacer JL, Piotto M, Assemat O, Celda B (2004). ¹H and ¹³C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo ¹H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed* 17:191-205.
30. Valonen PK, Griffin JL, Lehtimäki KK, Liimatainen T, Nicholson JK, Grohn OH, Kauppinen RA (2005). High-resolution magic-angle-spinning ¹H NMR spectroscopy reveals different responses in choline-containing metabolites upon gene therapy-induced programmed cell death in rat brain glioma. *NMR Biomed* 18:252-259.
31. Sitter B, Lundgren S, Bathen TF, Halgunset J, Fjosne HE, Gribbestad IS (2006). Comparison of HR MAS MR spectroscopic profiles of breast cancer tissue with clinical parameters. *NMR Biomed* 19:30-40.
32. Swanson MG, Zektzer AS, Tabatabai ZL, Simko J, Jarso S, Keshari KR, Schmitt L, Carroll PR, Shinohara K, Vigneron DB, Kurhanewicz J (2006). Quantitative analysis of prostate metabolites using ¹H HR-MAS spectroscopy. *Magn Reson Med* 55:1257-1264.
33. Tate AR, Foxall PJ, Holmes E, Moka D, Spraul M, Nicholson JK, Lindon JC (2000). Distinction between normal and renal cell carcinoma kidney cortical biopsy samples using pattern recognition of (¹H) magic angle spinning (MAS) NMR spectra. *NMR Biomed* 13:64-71.
34. Jordan KW, Nordenstam J, Lauwers GY, Rothenberger DA, Alavi K, Garwood M, Cheng LL (2009). Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy. *Dis Colon Rectum* 52:520-525.
35. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97 - 109.
36. Burnet NG, Jefferies SJ, Benson RJ, Hunt DP, Treasure FP (2005). Years of life lost (YLL) from cancer is an important measure of population burden - and should be considered when allocating research funds. *Br J Cancer* 92:241-245.
37. Bernstein M, Berger M (2001). *Neuro-oncology. The essentials*. New York: Thieme Medical Publishers Inc.

38. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:215-225.
39. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer cell* 9:157-173.
40. Popov S, Jury A, Laxton R, Doey L, Kandasamy N, Al-Sarraj S, Jurgensmeier JM, Jones C (2013). IDH1-associated primary glioblastoma in young adults displays differential patterns of tumour and vascular morphology. *PLoS one* 8:e56328.
41. Instituto Nacional del Cáncer. <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/canceres-infantiles-poco-comunes/HealthProfessional/page1#Reference5> (último acceso 18/10/2013).
42. Stewart BW and Kleihues, P. (2003). World cancer report. Lyon: IARC Press.
43. EUCAN. <http://eco.iarc.fr/EUCAN/Cancer.aspx?Cancer=34> (último acceso 18/10/2013).
44. Armstrong TS, Cohen MZ, Eriksen LR, Hickey JV (2004). Symptom clusters in oncology patients and implications for symptom research in people with primary brain tumors. *J Nurs Scholarsh* 36:197-206.
45. Lovely MP (2004). Symptom management of brain tumor patients. *Semin Oncol Nurs* 20:273-283.
46. Magrini S, Feletti A, Marton E, Longatti P (2013). Gliomas of the pineal region. *J Neurooncol* 115:103-111.
47. Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY (2003). Primary brain tumours in adults. *Lancet* 361:323-331.
48. Base de datos del proyecto INTERPRET <http://lithium.uab.es/interpretvalidateddb/publico/> (último acceso 11/11/2013).
49. Favre J, Taha JM, Burchiel KJ (2002). An analysis of the respective risks of hematoma formation in 361 consecutive morphological and functional stereotactic procedures. *Neurosurgery* 50 (1):48-56
50. Field M, Witham TF, Flickinger JC, Kondziolka D, Lunsford LD (2001). Comprehensive assessment of hemorrhage risks and outcomes after stereotactic brain biopsy. *J Neurosurg* 94:545-551.
51. Pizzo PA and Poplack DG (2006). Principles and Practice of Pediatric Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

52. Herminghaus S, Pilatus U, Moller-Hartmann W, Raab P, Lanfermann H, Schlote W, Zanella FE (2002). Increased choline levels coincide with enhanced proliferative activity of human neuroepithelial brain tumors. *NMR Biomed* 15:385-392.
53. Caivano R, Lotumolo A, Rabasco P, Zandolino A, D'Antuono F, Villonio A, Lancellotti MI, Macarini L, Cammarota A (2013). 3 Tesla magnetic resonance spectroscopy: cerebral gliomas vs. metastatic brain tumors. Our experience and review of the literature. *Int J Neurosci* 123:537-543.
54. Bulik M, Jancalek R, Vanicek J, Skoch A, Mechl M (2013). Potential of MR spectroscopy for assessment of glioma grading. *Clin Neurol Neurosurg* 115:146-153.
55. Rijpkema M, Schuurin J, van der Meulen Y, van der Graaf M, Bernsen H, Boerman R, van der Kogel A, Heerschap A (2003). Characterization of oligodendrogliomas using short echo time 1H MR spectroscopic imaging. *NMR Biomed* 16:12-18.
56. Shanware NP, Mullen AR, DeBerardinis RJ, Abraham RT (2011). Glutamine: pleiotropic roles in tumor growth and stress resistance. *J Mol Med* 89:229-236.
57. Chawla S, Oleaga L, Wang S, Krejza J, Wolf RL, Woo JH, O'Rourke DM, Judy KD, Grady MS, Melhem ER, Poptani H (2010). Role of proton magnetic resonance spectroscopy in differentiating oligodendrogliomas from astrocytomas. *J Neuroimaging* 20:3-8.
58. Lai PH, Weng HH, Chen CY, Hsu SS, Ding S, Ko CW, Fu JH, Liang HL, Chen KH (2008). In vivo differentiation of aerobic brain abscesses and necrotic glioblastomas multiforme using proton MR spectroscopic imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 29:1511-1518.
59. Ramadan S, Andronesi OC, Stanwell P, Lin AP, Sorensen AG, Mountford CE (2011). Use of in vivo two-dimensional MR spectroscopy to compare the biochemistry of the human brain to that of glioblastoma. *Radiology* 259:540-549.
60. Sibtain NA, Howe FA, Saunders DE (2007). The clinical value of proton magnetic resonance spectroscopy in adult brain tumours. *Clin Radiol* 62:109-119.
61. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA (2000). Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed* 13:129-153.
62. Remy C, Arus C, Ziegler A, Lai ES, Moreno A, Le Fur Y, Decorps M (1994). In vivo, ex vivo, and in vitro one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy of an intracerebral glioma in rat brain: assignment of resonances. *J Neurochem* 62:166-179.
63. Kinoshita Y, Yokota A (1997). Absolute concentrations of metabolites in human brain tumors using in vitro proton magnetic resonance spectroscopy. *NMR Biomed* 10:2-12.

64. Cheng LL, Chang IW, Louis DN, Gonzalez RG (1998). Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens. *Cancer Res* 58:1825-1832.
65. Middleton DA, Bradley DP, Connor SC, Mullins PG, Reid DG (1998). The effect of sample freezing on proton magic-angle spinning NMR spectra of biological tissue. *Magn Reson Med* 40:166-169.
66. Barba I, Moreno A, Martinez-Perez I, Tate AR, Cabanas ME, Baquero M, Capdevila A, Arus C (2001). Magnetic resonance spectroscopy of brain hemangiopericytomas: high myoinositol concentrations and discrimination from meningiomas. *J Neurosurg* 94:55-60.
67. Candiota AP, Majos C, Bassols A, Cabanas ME, Acebes JJ, Quintero MR, Arus C (2004). Assignment of the 2.03 ppm resonance in in vivo ¹H MRS of human brain tumour cystic fluid: contribution of macromolecules. *Magn Reson Mater Phy* 17:36-46.
68. McGinty DA, Gesell R (1925). The chemical regulation of respiration, vol II. A quantitative study of the accumulation of lactic acid in the isolated brain during anaerobic conditions and the role of lactic acid as a continuous regulator of respiration. *Amer J Physiol* 75:70-83.
69. Kinnersley HW, Peters RA (1929). Observations upon carbohydrate metabolism in birds: The relation between the lactic acid content of the brain and the symptoms of opisthotonus in rice-fed pigeons. *J Biochem J* 23:1126-1136.
70. Kerr SE (1935). Studies on the phosphorus compounds of brain.I. Phosphocreatine. *J Biol Chem* 110:625-636.
71. Ferrendelli JA, Gay MH, Sedgwick WG, Chang MM (1972). Quick freezing of the murine CNS: comparison of regional cooling rates and metabolite levels when using liquid nitrogen or Freon-12. *J Neurochem* 19:979-987.
72. Schmidt DE, Speth RC, Welsch F, Schmidt MJ (1972). The use of microwave radiation in the determination of acetylcholine in the rat brain. *Brain Res* 38:377-389.
73. Stavinoha WB, Weintraub ST, Modak AT (1973). The use of microwave heating to inactivate cholinesterase in the rat brain prior to analysis for acetylcholine. *J Neurochem* 20:361-371.
74. Maruyama Y, Iida N, Horikawa A, Hosoya E (1978). A new microwave device for rapid thermal fixation of the murine brain. *J Microw Power* 13:53-57.
75. Schneider DR, Felt BT, Goldman H (1981). Microwave radiation energy: a probe for the neurobiologist. *Life Sci* 29:643-653.

76. Foster CS, Gosden CM, Ke YQ (2006). Primer: tissue fixation and preservation for optimal molecular analysis of urologic tissues. *Nat Clin Pract Urol* 3:268-278.
77. O'Callaghan J, Sriram K (2004). Focused microwave irradiation of the brain preserves in vivo protein phosphorylation: comparison with other methods of sacrifice and analysis of multiple phosphoproteins. *J Neurosci Meth* 135:159-168.
78. Delaney SM, Geiger JD (1996). Brain regional levels of adenosine and adenosine nucleotides in rats killed by high-energy focused microwave irradiation. *J Neurosci Meth* 64:151-156.
79. Lei H, Morgenthaler F, Yue T, Gruetter R (2007). Direct validation of in vivo localized ¹³C MRS measurements of brain glycogen. *Magn Reson Med* 2:243-248
80. Simões RV, Delgado-Goñi T, Lope-Piedrafita S, Arus C (2010). ¹H-MRSI pattern perturbation in a mouse glioma: the effects of acute hyperglycemia and moderate hypothermia. *NMR Biomed* 23:23-33.
81. Simões RV, Candiota AP, Julià-Sapé M, Arús C (2013). In Vivo Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging and Ex Vivo Quantitative Neuropathology by High Resolution Magic Angle Spinning Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. In *Animal Models of Brain Tumors, Neuromethods* (vol 77, pp 329 – 365). New York: Human Press.
82. Julià-Sapé M, Acosta D, Majos C, Moreno-Torres A, Wesseling P, Acebes JJ, Griffiths JR, Arus C (2006). Comparison between neuroimaging classifications and histopathological diagnoses using an international multicenter brain tumor magnetic resonance imaging database. *J Neurosurg* 105:6-14.
83. El-Deredy W (1997). Pattern recognition approaches in biomedical and clinical magnetic resonance spectroscopy: a review. *NMR Biomed* 10:99-124.
84. Pérez-Ruiz A, Julià Sapé M, Mercadal G, Olier I, Majos C, Arus C (2010). The INTERPRET Decision-Support System version 3.0 for evaluation of Magnetic Resonance Spectroscopy data from human brain tumours and other abnormal brain masses. *BMC Bioinformatics* 11:581.
85. INTERPRET DSS DSS, v3.0. <http://gabrmn.uab.es/dss> (último acceso 18/10/2013).
86. Julià-Sapé M, Coronel I, Majós C, Candiota AP, Serrallonga M, Cos M, Aguilera C, Acebes JJ, Griffiths JR, Arús C (2011). Prospective diagnostic performance evaluation of single-voxel ¹H MRS for typing and grading of brain tumours. *NMR Biomed* 25:661-673.
87. Fellows GA, Wright AJ, Sibtain NA, Rich P, Opstad KS, McIntyre DJ, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA (2010). Combined use of neuroradiology and ¹H-MR

spectroscopy may provide an intervention limiting diagnosis of glioblastoma multiforme. *J Magn Reson Imaging* 5:1038-1044.

88. L Lukas L, Devos A, Suykens JA, Vanhamme L, Howe FA, Majos C, Moreno-Torres A, Van der Graaf M, Tate AR, Arus C, Van Huffel S (2004). Brain tumor classification based on long echo proton MRS signals. *Artif Intell Med* 31:73-89.

89. Devos A, Lukas L, Suykens JA, Vanhamme L, Tate AR, Howe FA, Majos C, Moreno-Torres A, van der Graaf M, Arus C, Van Huffel S (2004). Classification of brain tumours using short echo time 1H MR spectra. *J Magn Reson* 170:164-175.

90. García-Gomez JM, Tortajada S, Vidal C, Juliá-Sapè M, Luts J, Moreno-Torres A, Van Huffel S, Arús C, Robles M (2008). The effect of combining two echo times in automatic brain tumor classification by MRS. *NMR Biomed* 21:1112-1125.

91. Hagberg G (1998). From magnetic resonance spectroscopy to classification of tumors. A review of pattern recognition methods. *NMR Biomed* 11:148-156.

92. Metsis V, Huang H, Andronesi OC, Makedon F, Tzika A (2012). Heterogeneous data fusion for brain tumor classification. *Oncol Rep* 28:1413-1416.

93. Ortega-Martorell S, Olier I, Julià-Sapé M, Arús C (2010). SpectraClassifier 1.0: a user friendly, automated MRS-based classifier-development system. *BMC Bioinformatics* 11:106.

94. Hall MA (1999). Correlation-based feature subset selection for machine learning. *FLAIRS Conference*: Hamilton, New Zealand.

95. Efron B, Tibshirani RJ (1998). An introduction to the Bootstrap. In *Monographs on Statistics and Applied probability* (p 57). London: Chapman & Hall.

96. Fawcett T (2006). An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognit Lett* 27:861-874.

97. García-Gomez JM, Luts J, Julia-Sape M, Krooshof P, Tortajada S, Robledo JV, Melssen W, Fuster-Garcia E, Olier I, Postma G, Monleon D, Moreno-Torres A, Pujol J, Candiota AP, Martinez-Bisbal MC, Suykens J, Buydens L, Celda B, Van Huffel S, Arus C, Robles M (2009). Multiproject-multicenter evaluation of automatic brain tumor classification by magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Mater Phy* 22:5-18.

98. Manual de ayuda del software SpectraClassifier http://gabrmn.uab.es/sites/default/files/sc/SC_help.v3.0.09.pdf (último acceso 11/11/2013).

99. Borges AR, Lopez-Larrubia P, Marques JB, Cerdan SG. (2012). MR Imaging Features of High-Grade Gliomas in Murine Models: How They Compare with Human Disease, Reflect Tumor Biology, and Play a Role in Preclinical Trials. *AJNR Am J Neuroradiol* 33:24-36.

100. Huse JT, Holland EC (2009). Genetically engineered mouse models of brain cancer and the promise of preclinical testing. *Brain Pathol* 19:132-143.
101. Fomchenko EI, Holland EC (2006). Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Cancer Res* 12:5288-5297.
102. Hann B, Balmain A (2001). Building 'validated' mouse models of human cancer. *Curr Opin Cell Biol* 13:778-784.
103. Jacobs VL, Valdes PA, Hickey WF, De Leo JA (2011). Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN Neuro* 2:20-28.
104. Newcomb EW and Zagzag D (2009). The murine GL261 glioma experimental model to assess novel brain tumor treatments. In: *CNS Cancer Models, markers, prognostic factors, targets and therapeutic approaches* (pp 227-241). New York: Human Press.
105. Marumoto T, Tashiro A, Friedmann-Morvinski D, Scadeng M, Soda Y, Gage FH, Verma IM (2009). Development of a novel mouse glioma model using lentiviral vectors. *Nat Med* 15:110-116.
106. Zhuo L, Theis M, Alvarez-Maya I, Brenner M, Willecke K, Messing (2001). A hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genesis* 31:85-94.
107. Weiss WA, Burns MJ, Hackett C, Aldape K, Hill JR, Kuriyama H, Kuriyama N, Milshteyn N, Roberts T, Wendland MF, DePinho R, Israel MA (2003). Genetic determinants of malignancy in a mouse model for oligodendroglioma. *Cancer Res* 63:1589-1595.
108. Gutmann DH, Baker SJ, Giovannini M, Garbow J, Weiss W (2003). Mouse models of human cancer consortium symposium on nervous system tumors. *Cancer Res* 63 :3001-3004.
109. Serres S, Bezancon E, Franconi JM, Merle M (2004). Ex vivo analysis of lactate and glucose metabolism in the rat brain under different states of depressed activity. *J Biol Chem* 279:47881-47889.
110. Garcia-Bonilla L, Rosell A, Torregrosa G, Salom JB, Alborch E, Gutierrez M, Diez-Tejedor E, Martinez-Murillo R, Agulla J, Ramos-Cabrer P, Castillo J, Gasull T, Montaner J (2011). Recommendations guide for experimental animal models in stroke research. *Neurologia* 26:105-110.
111. Bacigaluppi M, Comi G, Hermann DM (2010). Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. *Open Neurol J* 4:34-38.
112. Simões RV, García-Martin ML, Cerdán S, Arús C (2008). Perturbation of mouse glioma MRS pattern by induced acute hyperglycemia. *NMR Biomed* 21:251-264.

113. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91.
114. Braun S, Kalinowski HO and Berger S (1998). A practical course. In 150 and more basic NMR experiments. Weinheim: Wiley.
115. Proyecto R. www.r-project.org/ (último acceso 18/10/2013).
116. Broadhurst DI, Kell DB (2006). Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics* 2:171 - 196.
117. Valverde-Saubí D, Candiota AP, Molins MA, Feliz M, Godino O, Davila M, Acebes JJ, Arús C (2010). Short-term temperature effect on the HRMAS spectra of human brain tumor biopsies and their pattern recognition analysis. *Magn Reson Mater Phy* 23:203–215.
118. Hebrew University of Jerusalem. <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/solid/solid.html>. (último acceso 18/10/2013)
119. Bruker HR-MAS Manual. <http://triton.iqfr.csic.es/guide/man/hrmas/chap5-2.html>. (último acceso 18/10/2013).
120. Yang M, Wang S, Hao F, Li Y, Tang H, Shi X (2012) NMR analysis of the rat neurochemical changes induced by middle cerebral artery occlusion. *Talanta* 88:136-144.
121. Opstad KS, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA (2008). 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. *NMR Biomed* 21:1138-1147.
122. Hertz L (2008). Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology* 55:289-309.
123. Glunde K, Artemov D, Penet MF, Jacobs MA, Bhujwala ZM (2010). Magnetic resonance spectroscopy in metabolic and molecular imaging and diagnosis of cancer. *Chem Rev* 110:3043-3059.
124. Waters NJ, Garrod S, Farrant RD, Haselden JN, Connor SC, Connelly J, Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK (2000). High-resolution magic angle spinning (1)H NMR spectroscopy of intact liver and kidney: optimization of sample preparation procedures and biochemical stability of tissue during spectral acquisition. *Anal Biochem* 282:16-23.
125. Esteve V, Celda B, Martínez-Bisbal MC (2012). Use of 1H and 31P HRMAS to evaluate the relationship between quantitative alterations in metabolite concentrations and tissue features in human brain tumour biopsies. *Anal Bioanal Chem* 403:2611-2625.

126. De Graaf RA, Chowdhury GM, Brown PB, Rothman DL, Behar KL (2009). In situ 3D magnetic resonance metabolic imaging of microwave-irradiated rodent brain: a new tool for metabolomics research. *J Neurochem* 109:494–501.
127. Detour J, Elbayed K, Piotto M, Moussallieh FM, Nehlig A, Namer IJ (2011). Ultrafast in vivo microwave irradiation for enhanced metabolic stability of brain biopsy samples during HRMAS NMR analysis. *J Neurosci Methods* 201:89-97.
128. Piotto M, Moussallieh FM, Imperiale A, Benahmed MA, Detour J, Bellocq JP, Namer IJ and Elbayed K (2013). Reproducible Sample preparation and spectrum acquisition techniques for metabolic of human tissues by proton high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance. In: *Methodologies for metabolomic* (pp 496 – 524). Cambridge: Cambridge University Press.
129. Risa O, Melo TM, Sonnewald U (2009). Quantification of amounts and ¹³C content of metabolites in brain tissue using high- resolution magic angle spinning ¹³C NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 22:266-271.
130. Violante IR, Anastasovska J, Sanchez-Canon GJ, Rodrigues TB, Righi V, Nieto-Charques L, Parkinson JR, Bloom SR, Bell JD, Cerdan S (2009). Cerebral activation by fasting induces lactate accumulation in the hypothalamus. *Magn Reson Med* 62:279-283.
131. Po C, Kalthoff D, Kim YB, Nelles M, Hoehn M (2012). White matter reorganization and functional response after focal cerebral ischemia in the rat. *PLoS One* 7:22-35.
132. Harada K, Honmou O, Liu H, Bando M, Houkin K, Kocsis JD (2007). Magnetic resonance lactate and lipid signals in rat brain after middle cerebral artery occlusion model. *Brain Res* 1134:206-213.
133. Lei H, Berthet C, Hirt L, Gruetter R (2009). Evolution of the neurochemical profile after transient focal cerebral ischemia in the mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:811-819.
134. Tkac I, Keene CD, Pfeuffer J, Low WC, Gruetter R (2001). Metabolic changes in quinolinic acid-lesioned rat striatum detected non-invasively by in vivo ¹H NMR spectroscopy. *J Neurosci Res* 66:891-898.
135. Funfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Mobius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S, Nave KA (2012). Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485:517-521.
136. Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD (2012). Oligodendrogli

metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487:443-448.

137. Delgado-Goñi T (2011). Aproximación a la caracterización morfológica y molecular por IRM y ERM de la respuesta a la terapia en modelos pre-clínicos de glioma. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España. <http://hdl.handle.net/10803/83967> (enlace TDX, último acceso 18/10/2013).

138. Delgado-Goñi T, Martin-Sitjar J, Simoes RV, Acosta M, Lope-Piedrafita S, Arus C (2013). Dimethyl sulfoxide (DMSO) as a potential contrast agent for brain tumors. *NMR Biomed* 26:173-184.

139. Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, Namboodiri AM (2007). N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol* 81:89-131.

140. Petroff OA, Ogino T, Alger JR (1988). High-resolution proton magnetic resonance spectroscopy of rabbit brain: regional metabolite levels and postmortem changes. *J Neurochem* 51:163-171.

141. Paris L, Cecchetti S, Spadaro F, Abalsamo L, Lugini L, Pisanu ME, Iorio E, Natali PG, Ramoni C, Podo F (2010). Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C downregulates HER2 overexpression on plasma membrane of breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 12:R27.

142. Roberts SJ, Stewart AJ, Sadler PJ, Farquharson C (2004). Human PHOSPHO1 exhibits high specific phosphoethanolamine and phosphocholine phosphatase activities. *Biochem J* 382:59-65.

143. Wright A, Fellows G, Griffiths J, Wilson M, Bell B, Howe F (2010). Ex vivo HRMAS of adult brain tumours: metabolite quantification and assignment of tumour biomarkers. *Mol Cancer* 9:66.

144. Andronesi O, Blekas KD, Mintzopoulos D, Astrakas LG, Black PM, Tzika AA (2008). Molecular classification of brain tumor biopsies using solid-state magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy and robust classifiers. *Int J Oncol* 33:1017-1025.

145. Martínez-Bisbal MC, Esteve V, Martínez-Granados B, Celda B (2011). Magnetic resonance microscopy contribution to interpret high-resolution magic angle spinning metabolomic data of human tumor tissue. *J Biomed Biotechnol.* 2011: pii: 763684.

146. Cheng LL, Anthony DC, Comite AR, Black PM, Tzika AA, Gonzalez RG (2000). Quantification of microheterogeneity in glioblastoma multiforme with ex vivo high-resolution magic angle spinning (HRMAS). *Neuro Oncol* 2:87-95.

147. Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J (2001). A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 61:439-444.
148. McMullen CA, Ferry AL, Gamboa JL, Andrade FH, Dupont-Versteegden EE (2009). Age-related changes of cell death pathways in rat extraocular muscle. *Exp Gerontol* 44:420-425.
149. Righi V (2008). Biochemistry in Healthy and Neoplastic Human Tissues: Metabolic Alteration Revealed by HR-MAS Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Doctoral Thesis, University of Bologna, Italia. http://amsdottorato.cib.unibo.it/647/1/Tesi_Righi_Valeria.pdf Último acceso 18/10/2013.
150. SpectraClassifier <http://gabrmn.uab.es/SC> (último acceso 18/10/2013).
151. Vellido A, Romero E, Gonzalez-Navarro F, Belanche-Muños LA, Julia-Sape M, Arus C (2009). Outlier exploration and diagnostic classification of a multi-centre 1H-MRS brain tumour database. *Neurocomput* 72:3085-3097.
152. Erb G, Elbayed K, Piotta M, Raya J, Neuville A, Mohr M, Maitrot D, Kehrli P, Namer IJ (2008). Toward improved grading of malignancy in oligodendrogliomas using metabolomics. *Magn Reson Med* 59:959-965.
153. Candiota AP, Majos C, Julia-Sape M, Cabanas M, Acebes JJ, Moreno-Torres A, Griffiths JR, Arus C (2011). Non-invasive grading of astrocytic tumours from the relative contents of myo-inositol and glycine measured by in vivo MRS. *JBR-BTR* 94:319-329.
154. T Tugnoli V, Schenetti L, Mucci A, Parenti F, Cagnoli R, Righi V, Trincherio A, Nocetti L, Toraci C, Mavilla L, Trentini G, Zunarelli E, Tosi MR (2006). Ex vivo HR-MAS MRS of human meningiomas: a comparison with in vivo 1H MR spectra. *Int J Mol Med* 18:859-869.
155. Pouillet JB, Martinez-Bisbal MC, Valverde D, Monleon D, Celda B, Arus C, Van Huffel S (2007). Quantification and classification of high-resolution magic angle spinning data for brain tumor diagnosis. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007: 5407-5410.
156. Monleon D, Morales JM, Gonzalez-Darder J, Talamantes F, Cortes O, Gil-Benso R, Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Celda B (2008). Benign and atypical meningioma metabolic signatures by high-resolution magic-angle spinning molecular profiling. *J Proteome Res* 7:2882-2888.

157. Barba I, Cabanas ME, Arús C (1999). The relationship between nuclear magnetic resonance-visible lipids, lipid droplets, and cell proliferation in cultured C6 cells. *Cancer Res* 59:1861-1868.
158. Quintero M, Cabanas ME, Arús C (2007). A possible cellular explanation for the NMR-visible mobile lipid (ML) changes in cultured C6 glioma cells with growth. *Biochim Biophys Acta* 1771:31-44.
159. Remy C, Fouilhe N, Barba I, Sam-Lai E, Lahrech H, Cucurella MG, Izquierdo M, Moreno A, Ziegler A, Massarelli R, Decorps M, Arus C (1997). Evidence that mobile lipids detected in rat brain glioma by ¹H nuclear magnetic resonance correspond to lipid droplets. *Cancer Res* 57:407-414.
160. Zoula S, Herigault G, Ziegler A, Farion R, Decorps M, Remy C (2003). Correlation between the occurrence of ¹H-MRS lipid signal, necrosis and lipid droplets during C6 rat glioma development. *NMR Biomed* 16:199-212.
161. Cheng LL, Burns MA, Taylor JL, He W, Halpern EF, McDougal WS, Wu CL (2005) Metabolic characterization of human prostate cancer with tissue magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res* 65:3030-3034.
162. Mahon MM, deSouza NM, Dina R, Soutter WP, McIndoe GA, Williams AD, Cox IJ (2004). Preinvasive and invasive cervical cancer: an ex vivo proton magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy study. *NMR Biomed* 17:144-153.
163. Mahon MM, Williams AD, Soutter WP, Cox IJ, McIndoe GA, Coutts GA, Dina R, deSouza NM (2004). ¹H magnetic resonance spectroscopy of invasive cervical cancer: an in vivo study with ex vivo corroboration. *NMR Biomed* 17:1-9.
164. Srivastava S, Kashiwaya Y, Chen X, Geiger JD, Pawlosky R, Veech RL (2012). Microwave irradiation decreases ATP, increases free [Mg²⁺], and alters in vivo intracellular reactions in rat brain. *J Neurochem* 123:668-675.
165. Bazinet RP, Lee HJ, Felder CC, Porter AC, Rapoport SI, Rosenberger TA (2005). Rapid high-energy microwave fixation is required to determine the anandamide (N-arachidonylethanolamine) concentration of rat brain. *Neurochem Res* 30:597-601.

7. ANEXOS

Anexo 1. Desplazamiento químico de algunos de los principales metabolitos detectados por ERM y HRMAS.

Metabolito	Abreviatura	Desplazamiento químico (ppm)	Grupo
Lípidos móviles	ML	0,90	CH ₃
		1,29	(CH ₂) _n
		1,59-1,60	CH ₂ CC=O
		2,02	CH ₂ C=
		2,24	CH ₂ C=O
		2,78	=CCH ₂ C=
		5,30-5,32	CH=CH
Isoleucina	Ile	0,94	δ-CH ₃
		1,02	γ-CH ₃
		1,29-1,48	γ-CH ₂
		1,97	β-CH
		3,69	α-CH
Leucina	Leu	0,95	δ-CH ₃
		0,97	δ-CH ₃
		1,70	γ-CH
		1,72	β-CH ₂
		3,74	α-CH
Valina	Val	0,99	γ-CH ₃
		1,04	γ-CH ₃
		2,25	β-CH
		3,61	α-CH
Treonina	Thr	1,33	γ-CH ₃
		4,26	β-CH
		3,60	α-CH
Lactato	Lac	1,33	CH ₃
		4,11	CH
Alanina	Ala	1,46	β-CH ₃
		3,78	α-CH
Acetato	Ace	1,92	CH ₃ C=O
N – acetil aspartato	Naa	2,02	NC=OCH ₃
		2,49	β-CH ₂
		4,38	α-CH
Lisina	Lis	3,02	ε-CH ₂
		1,71	δ-CH ₂
		1,48	γ-CH ₂
		1,91	β-CH ₂
		3,79	α-CH
Arginina	Arg	3,23	δ-CH ₂
		1,69	γ-CH ₂
		1,92	β-CH ₂
		3,78	α-CH
Glutamato	Glu	2,36	γ-CH ₂
		2,06, 2,14	β-CH ₂
		3,77	α-CH
Glutamina	Gln	2,44	γ-CH ₂
		2,14	β-CH ₂
		3,78	α-CH
Prolina	Pro	3,43, 3,34	δ-CH ₂
		2,01	γ-CH ₂

		2,34, 2,07	β -CH ₂
		4,12	α -CH
Acido aspártico	Asp	2,68, 2,82	β -CH ₂
		3,90	α -CH
Asparagina	Asn	2,85, 2,96	β -CH ₂
		4,01	α -CH
Creatina	Cr	3,03	NCH ₃
		3,93	CH ₂
Fosfocreatina	PCr	3,04	NCH ₃
		3,95	CH ₂
Tirosina	Tyr	3,06, 3,20	β -CH ₂
		3,93	α -CH
Fenilalanina	Phe	3,11, 3,28	β -CH ₂
		3,99	α -CH
Etanolamina	Etanolamina	3,15	CH ₂
		3,82	CH ₂
Colina libre	Cho	3,19	N(CH ₃) ₃
		3,53	NCH ₂
		4,08	OCH ₂
Fosfocolina	PCho	3,21	N(CH ₃) ₃
		3,61	NCH ₂
		4,22	OCH ₂
Glicerofosocolina	GPC	3,23	N(CH ₃) ₃
		3,68	NCH ₂
		4,33	OCH ₂
Fosfatidilcolina	PtdCho	3,25	N(CH ₃) ₃
Taurina	Tau	3,26	SCH ₂
		3,42	NCH ₂
Mio-inositol	ml	3,53	1,3-CH
		4,06	2-CH
		3,63	4,6-CH
		3,29	5-CH
Glicina	Gly	3,53	CH ₂
Glicerol	Glicerol	3,56, 3,65	1- CH ₂
		3,81	2-CH
β -Glucosa	β -Glucosa	4,67	1-CH
		3,26	2-CH
		3,49	3-CH
		3,40	4-CH
		3,47	5-CH
α -glucosa	α -glucosa	5,24	1-CH
		3,54	2-CH
		3,73	3-CH
		3,42	4-CH
Glutation (reducido)	GSH	4,57	α -CH-Cys
		2,96	β -CH ₂ -Cys
		3,80	α -CH-Glu
		2,16	β -CH ₂ -Glu
		2,55	γ -CH ₂ -Glu
		3,77	CH ₂ -Gly
Serina	Ser	3,96	1,3-CH ₂
		3,84	2-CH
Acido γ -aminobutírico	GABA	3,01	2-CH ₂
		1,88	3-CH ₂
		2,28	4-CH ₂

Tabla 7.1. Desplazamiento químico de los principales metabolitos en el cerebro detectados por HRMAS [117,149,29] en el parénquima cerebral normal y en tumor.

Anexo 2. Clasificación de tumores del sistema nervioso central [35]

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	<i>9382/3²</i>
Ependymal tumours	
Ependymoma	9391/3
Cellular	<i>9391/3</i>
Papillary	9393/3
Clear cell	<i>9391/3</i>
Tanycytic	<i>9391/3</i>
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	<i>9444/1</i>

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.

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

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 meningeothelial cells		Haemangioblastoma	9161/1
Meningioma	9530/0		
Meningothelial	9531/0		
Fibrous (fibroblastic)	9532/0		
Transitional (mixed)	9537/0		
Psammomatous	9533/0		
Angiomatous	9534/0		
Microcystic	9530/0		
Secretory	9530/0		
Lymphoplasmacyte-rich	9530/0		
Metaplastic	9530/0		
Clear cell	9538/1		
Chordoid	9538/1		
Atypical	9539/1		
Papillary	9538/3		
Rhabdoid	9538/3		
Anaplastic meningioma	9530/3		
		LYMPHOMAS AND HAEMOPOIETIC NEOPLASMS	
Mesenchymal, non-meningothelial tumours		Malignant lymphomas	9590/3
Lipoma	8850/0	Plasmacytoma	9731/3
Angiolipoma	8861/0	Granulocytic sarcoma	9930/3
Hibernoma	8880/0		
Liposarcoma (intracranial)	8850/3		
Solitary fibrous tumour	8815/0		
Fibrosarcoma	8810/3		
Malignant fibrous histiocytoma	8830/3		
Leiomyoma	8890/0		
Leiomyosarcoma	8890/3		
Rhabdomyoma	8900/0		
Rhabdomyosarcoma	8900/3		
Chondroma	9220/0		
		GERM CELL TUMOURS	
		Germinoma	9064/3
		Embryonal carcinoma	9070/3
		Yolk sac tumour	9071/3
		Choriocarcinoma	9100/3
		Teratoma	9080/1
		Mature	9080/0
		Immature	9080/3
		Teratoma with malignant transformation	9084/3
		Mixed germ cell tumours	9085/3
		TUMOURS OF THE SELLAR REGION	
		Craniopharyngioma	9350/1
		Adamantinomatous	9351/1
		Papillary	9352/1
		Granular cell tumour	9582/0
		METASTATIC TUMOURS	

Anexo 3. Recogida y almacenamiento de biopsias

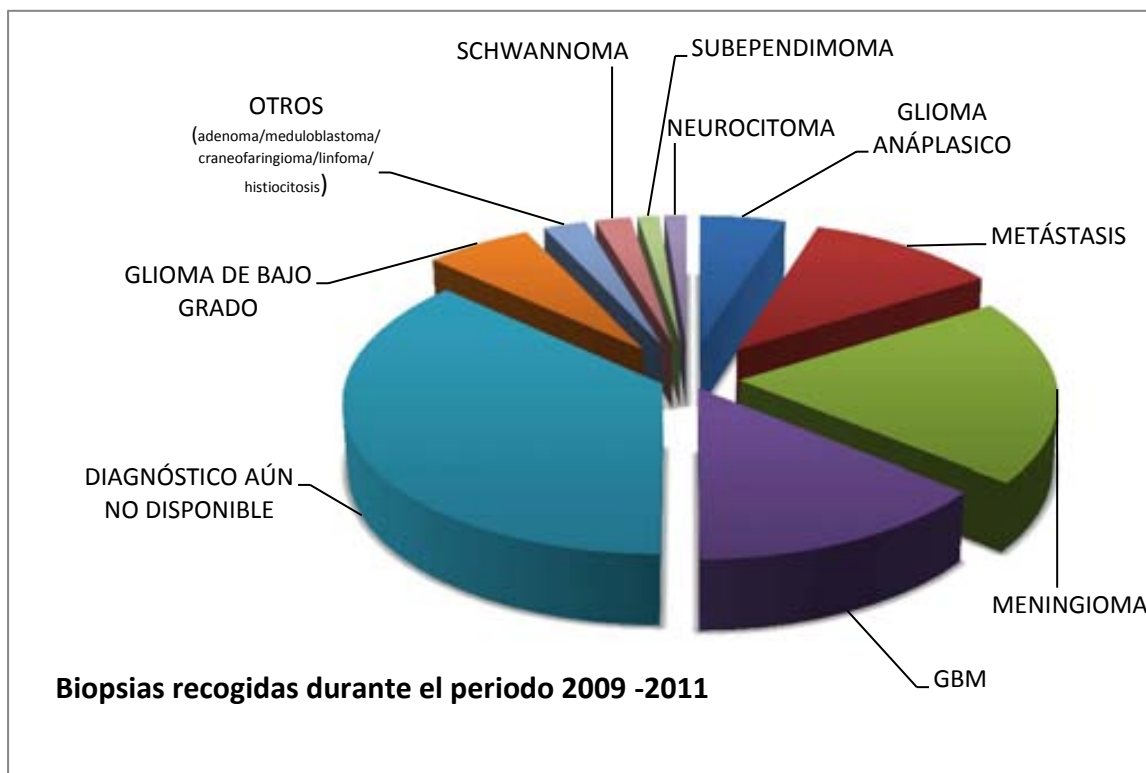


Figura 7.1. Esquema de la distribución tipológica de las iopsias recogidas durante el periodo 2009 - 2011. Se indica su patología.

TOTAL DE BIOPSIAS RECOGIDAS	242
GLIOMA ANÁPLASICO	12
METÁSTASIS	27
MENINGIOMAS	48
GBM	34
DIAGNÓSTICO AÚN NO DISPONIBLE	89
GLIOMA DE BAJO GRADO	15
OTROS (Adenoma/Meduloblastoma/Craneofaringioma/Linfoma/Histiocitosis)	6
SCHWANNOMA	5
SUBEPENDIMOMA	3
NEUROCITOMA	3

Tabla 7.2. Distribución numérica del total de biopsias recogidas durante el periodo 2009 - 2011.

Anexo 4. Hoja de información para el proyecto I+D+I de estudio de lesiones cerebrales

En breve se le practicará una operación quirúrgica que usted deberá autorizar. La muestra de tejido obtenida será sometida a análisis en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital.

Nuestro hospital participa conjuntamente con la Universidad Autónoma de Barcelona en un proyecto europeo (de ayuda al diagnóstico y pronóstico de lesiones cerebrales) que pretende una mejora de los métodos de diagnóstico en enfermedades como la suya. Para ello querríamos solicitarle que autorizara que la parte de la biopsia que no sea necesaria para el análisis por Anatomía Patológica pueda ser utilizada para ser analizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de dicha Universidad juntamente con la resonancia magnética que le ha sido practicada. Sus datos clínicos serán almacenados en la base de datos del proyecto de forma **anonimizada** para preservar en todo momento su derecho a la privacidad.

Dicho estudio no le supondrá ningún inconveniente ni afectará la asistencia que reciba, aunque puede ayudar a mejorar el diagnóstico futuro en otros pacientes. Sus datos serán utilizados siempre de forma totalmente confidencial y anónima.

Su participación es totalmente voluntaria y si se niega a participar no se verá afectada la calidad de la atención que reciba.

Una vez dado su consentimiento puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que explicar sus motivos y sin que ello afecte a la asistencia que reciba.

Estamos a su disposición para cualquier pregunta o aclaración que desee.

Si acepta participar en el estudio, le rogamos firme el modelo que se adjunta.

Proyecto de estudio de lesiones cerebrales

Yo,

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1) Cuando quiera; 2) Sin tener que dar explicaciones; 3) Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha: Firma:

Firma de la Persona Autorizada por el Paciente para que le Represente en la Historia

Clínica: _____ DNI: _____

Anexo 5. Programas de pulsos de las secuencias utilizadas para la adquisición de espectros HRMAS

5.1 Secuencia de pulso de adquisición con presaturación de agua.

```
;zgpr
;avance-version (02/05/31)
;1D sequence with f1 presaturation
#include <Avance.incl>
"d12=20u"

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

;p1 : 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
;d12: delay for power switching          [20 usec]
;NS: 1 * n, total number of scans: NS * TD0
;$ld: zgpr,v 1.7 2002/06/12 09:05:24 ber Exp $
```

5.2 Secuencia de espín eco (TE = 136ms)

```
;jrhard
spin(jump and return)-echo pulse sequence with presaturation

d12 = 20 us
d13 = 4 us
2=p1
p3=p1*2
1 ze
2 d1
d12 pl9:f1
p18:f1 ph29
d13
```


d12 p1:f1
p1:f1 ph0
d2

p2 ph1
d3

p3 ph2
d3

go=2 ph31

wr #0

exit

ph0 = 0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3

ph1 = 2 2 2 2 3 3 3 3 0 0 0 0 1 1 1 1

ph2 = 0 1 2 3 1 2 3 0 2 3 0 1 3 0 1 2

ph29 = 0

ph31 = 0 2 0 2 1 3 1 3 2 0 2 0 3 1 3 1

-OUTPUT POWERS-----

p1: transmitter high power level (0dB)

p19: transmitter low power level (50dB) for presat

-DELAYS-----

d1 : relaxation delay (3-5 times T1*)

d2 : delay to select max irradiation point, symmetrical with respect to O1 (133us is OK for max irradiation at 1.33 ppm with respect to water signal)

d3 : half echo time (68 ms is OK for lactate signal to be inverted)

d12: short delay to change power (20us)

d13: short delay to allow for recovery (3us)

-PULSES-----

p1 : 90deg pulse

p2 : 90deg pulse (finely adjust to optimize null excitation at O1)

p3 : 180deg pulse

p18: presaturation pulse (ie 1.5sec)

-ACQUISITION COMMENTS-----

set O1 on resonance with the frequency where null excitation is desired. The pulse sequence results in a sin excitation profile, with opposite signs at each side of O1, at a

distance (in Hz) of

$$d = 1/(4*d2)$$

-PROCESSING COMMENTS-----

hence, when phasing the spectrum beware that ie peaks upfield of O1 will be positive and peaks downfield from O1 will look negative

Anexo 6. Desarrollo de clasificadores de biopsias de tumores cerebrales humanos

BIOPSIA	DIAGNÓSTICO ORIGINAL	DIAGNÓSTICO POST HRMAS HOSPITAL
509	GBM	GLIOBLASTOMA
824	GBM	GLIOBLASTOMA
786	GBM	GLIOBLASTOMA
963	GBM	GLIOMA DE ALTO GRADO
1107	GBM	GLIOMA
824	GBM	GLIOBLASTOMA
1080	GBM	GLIOBLASTOMA
792	GBM	GLIOMA DE ALTO GRADO
829	GBM	SIN TEJIDO
934	GBM	NECROSIS
988	GBM	NECROSIS
1061	GBM	GLIOBLASTOMA
725	GBM	GLIOMA
1061_bis	GBM	GLIOBLASTOMA
969	GBM	GLIOBLASTOMA
1107_bis	GBM	SIN TEJIDO
835_bis	GBM	SIN TEJIDO
989	GBM	SIN TEJIDO
986	GBM	NO DISPONIBLE
945	GBM	NO DISPONIBLE
1076	GBM	NO DISPONIBLE
413	GBM	NO DISPONIBLE
992	GBM	NO DISPONIBLE
342	GBM	NO DISPONIBLE
418	GBM	NO DISPONIBLE
824_bis	GBM	NO DISPONIBLE
361	GBM	NO DISPONIBLE
779	GBM	NO DISPONIBLE
900	GBM	NO DISPONIBLE
923	GBM	NO DISPONIBLE
504	GBM	NO DISPONIBLE
1105	MM	MENINGIOMA
1033	MM	MENINGIOMA
1043	MM	MENINGIOMA
1052	MM	MENINGIOMA
1066	MM	MENINGIOMA
1071	MP	MM
1187	MT	MM
1162	MT	MM
1193	MM	MM
1192	MM	MENINGIOMA
1146	MM	DURAMADRE
897	MM	DURAMADRE
1152	MM	DURAMADRE
907_bis	MT	MM
907	MT	MM
873	MM	NO DISPONIBLE

Tabla 7.3. Muestras correspondientes al conjunto de entrenamiento (31 GBM y 16 M) del estudio 2. "No disponible" se refiere a que no se llevó a cabo el diagnóstico histopatológico post HRMAS en el momento del desarrollo del clasificador. "Sin tejido" significa que el patólogo no pudo llevar a cabo el diagnóstico ya que la muestra observada en la placa no era suficiente para evaluar el diagnóstico. GBM = glioblastoma, MM = meningioma meningiotelial, MF = meningioma fibroso, MP = meningioma psamomatoso, MT = meningioma transicional. El número de biopsia corresponde al código interno UAB.

BIOPSIA	DIAGNÓSTICO ORIGINAL	DIAGNÓSTICO POST HRMAS HOSPITAL
502	GBM	GLIOMA DE ALTO GRADO
515	GBM	GLIOMA
520	GBM	GLIOMA DE ALTO GRADO
1341	GBM	GLIOMA
1075	GBM	GLIOBLASTOMA
1095	GBM	GLIOBLASTOMA
963	GBM	GLIOBLASTOMA
1050	GBM	NO DISPONIBLE
1103	GBM	NO DISPONIBLE
1107	GBM	NO DISPONIBLE
931	GBM	NO DISPONIBLE
1095	GBM	NO DISPONIBLE
1103	GBM	NO DISPONIBLE
1107	GBM	NO DISPONIBLE
824	GBM	NO DISPONIBLE
681	GBM	NO DISPONIBLE
1105_bis	MM	NO DISPONIBLE
1109	MM	NO DISPONIBLE
1178	MM	MM
1154	MM	MM
1086	MM	MM
872	MP	MP
1342	MM	NO DISPONIBLE
1197	MP	NO DISPONIBLE
1087	MP	NO DISPONIBLE

Tabla 7.4 Muestras correspondientes al conjunto de testeo (31 GBM y 16 M) del estudio 2. "No disponible" se refiere a que no se llevó a cabo el diagnóstico histopatológico post HRMAS en el momento del desarrollo del clasificador. "Sin tejido" significa que el patólogo no pudo llevar a cabo el diagnóstico ya que la muestra observada en la placa no era suficiente para evaluar el diagnóstico. GBM = glioblastoma, MM = meningioma meningiotelial, MF = meningioma fibroso, MP = meningioma psamomatoso, MT = meningioma transicional. El número de biopsia corresponde al código interno UAB.

Casos utilizados para el desarrollo de clasificadores a 11,7 T, en el estudio del aumento de la población de casos con diferentes secuencias y temperaturas de adquisición y control de calidad (estudio 3).

BIOPSIA	DIAGNÓSTICO ORIGINAL	DIAGNÓSTICO POST HRMAS HOSPITAL	DIAGNÓSTICO POST HRMAS UAB
725	GBM	GLIOBLASTOMA	GLIOMA
824	GBM	GLIOBLASTOMA	GLIOMA DE ALTO GRADO
835	GBM	GLIOBLASTOMA	GLIOMA
779	GBM	GLIOMA DE ALTO GRADO	GLIOMA
900	GBM	GLIOMA	GLIOMA
923	GBM	GLIOBLASTOMA	GLIOMA DE ALTO GRADO
1080	GBM	GLIOBLASTOMA	GLIOMA DE ALTO GRADO
792	GBM	GLIOMA DE ALTO GRADO	GLIOMA DE ALTO GRADO
829	GBM	SIN TEJIDO	GBM
934	GBM	NECROSIS	NEOPLASIA GLIAL
988	GBM	NECROSIS	NEOPLASIA GLIAL
1061	GBM	GLIOBLASTOMA	NEOPLASIA GLIAL
1107	GBM	GLIOMA	NEOPLASIA GLIAL
969	GBM	GLIOBLASTOMA	NEOPLASIA GLIAL
989	GBM	GLIOBLASTOMA	NEOPLASIA GLIAL
1105_bis	MM	MENINGIOMA	MENINGIOMA
1087_bis	MM	MENINGIOMA	MENINGIOMA
1087	MM	MENINGIOMA	MENINGIOMA
1092	MM	MENINGIOMA	MENINGIOMA
1093	MM	MENINGIOMA	MENINGIOMA
1062	MM	MENINGIOMA	MENINGIOMA
1046	MP	MM	MM
907	MT	MM	MM
872	MT	MM	MM
1071	MM	MM	MF

Tabla 7.5. Muestras correspondientes al conjunto de entrenamiento (15 GBM y 10 M) con la implementación del control de calidad de los expertos espectroscopistas y el análisis post HRMAS UAB. MM = meningioma meningiotelial, MF = meningioma fibroso, MP = meningioma psamomatoso, MT = meningioma transicional. El número de biopsia corresponde al código interno UAB.

BIOPSIA	DIAGNÓSTICO ORIGINAL	DIAGNÓSTICO POST HRMAS HOSPITAL	DIAGNÓSTICO POST HRMAS UAB
1061_bis	GBM	GLIOMA DE ALTO GRADO	GBM
835_bis	GBM	GLIOMA	NEOPLASIA GLIAL
986	GBM	GLIOMA DE ALTO GRADO	GBM
945	GBM	GLIOMA	GBM
413	GBM	GLIOBLASTOMA	GBM
992	GBM	GLIOBLASTOMA	GBM
342	GBM	GLIOBLASTOMA	GBM
1105	MM	MENINGIOMA	MENINGIOMA
1097	MM	MENINGIOMA	MENINGIOMA
872	MM	MM	MF
1090	MM	MM	MM
1182	MM	MM	MM
966	MP	MP	MP

Tabla 7.6. Muestras correspondientes al conjunto de testeo (7 GBM y 6 M) con la implementación del control de calidad de los expertos espectroscopistas y el post HRMAS UAB. MM = meningioma meningiotelial, MF = meningioma fibroso, MP = meningioma psamomatoso, MT = meningioma transicional. El número de biopsia corresponde al código interno UAB.