Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Espectroscopia de hidrógeno por resonancia magnética en resonadores clínicos y químicos de alto campo. Estudio de caracterización y seguimiento de tumores cerebrales

Calvar, Jorge Andrés

2013

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Calvar, Jorge Andrés. (2013). Espectroscopia de hidrógeno por resonancia magnética en resonadores clínicos y químicos de alto campo. Estudio de caracterización y seguimiento de tumores cerebrales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Calvar, Jorge Andrés. "Espectroscopia de hidrógeno por resonancia magnética en resonadores clínicos y químicos de alto campo. Estudio de caracterización y seguimiento de tumores cerebrales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Espectroscopia de hidrógeno por resonancia magnética en resonadores clínicos y químicos de alto campo. Estudio de caracterización y seguimiento de tumores cerebrales.

Trabajo de Tesis para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Físicas

Jorge Andrés Calvar

Director de Tesis:……Dr. Gerardo Burton

Director Asistente de Tesis:……..….Dr. Gustavo Sevlever

Consejero de Estudios:……..……Dr. Rubén Contreras

Lugar de Trabajo

- Fundación para la Lucha contra Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI)

- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Julio 2013

Título: Espectroscopia de hidrógeno por resonancia magnética en resonadores clínicos y químicos de alto campo. Estudio de caracterización y seguimiento de tumores cerebrales

Resumen

La espectroscopia por resonancia magnética (ERM) es una técnica que utiliza las propiedades magnéticas de los núcleos y moléculas para estudiar estructuras químicas. Una de sus aplicaciones es brindar información metabolómica de tejidos y soluciones. En particular, la ERM clínica permite analizar el metabolismo de los tejidos “in-vivo”, sin interferir con los procesos bioquímicos de los mismos. En este trabajo de tesis, se analizó la utilidad de la ERM de alto campo en la clasificación y caracterización de tumores gliales cerebrales y el valor de la ERM clínica en el análisis de la evolución de los tumores gliales.

Siendo la ERM clínica una técnica de adquisición de espectros muy dependiente de la ubicación, tamaño de la lesión y la homogeneidad de campo, la primera parte del estudio consistió en analizar distintos métodos de cuantificación de espectros clínicos en tumores cerebrales, teniendo en cuenta estas variables y el tiempo de adquisición. Este análisis permitió establecer que para el análisis cuantitativo, un método paramétrico con una base de metabolitos individuales es más fiable y estable que uno con una base modelada con Lorentzianas-Gaussianas puras. Además, se estimó el tiempo mínimo necesario de adquisición de un espectro clínico que se quiera cuantificar a partir del espectro sin cancelación del agua. En el caso de una clasificación cualitativa se vio que existe un número fijo de adquisiciones a partir del cual el espectro no cambia significativamente.

Siendo hoy la ERM de alto campo con HR-MAS (High Resoution Magic Angle Spinning) una técnica muy utilizada en el estudio metabólico de tejidos, en particular de tumores, se analizó la posibilidad de caracterizar tumores gliales con un equipo de alto campo sin la facilidad de HR-MAS. Aquí, a través de una técnica de preparación sencilla y repetitiva, se consiguió adquirir espectros de muy buena calidad y obtener patrones de espectros que clasifican los tumores, tanto por su anatomía patológica como por su genética, los dos métodos de referencia en la clasificación tumoral actual. En particular con el gen IDH1, un nuevo e importante marcador en tumores gliales asociado con la sobrevida de los pacientes, se identificó una clara relación cualitativa

entre metabolitos. Se detectó además la presencia de 2-hidroxiglutarato (2HG) en los espectros, producto de la mutación IDH1. Las conclusiones de este trabajo con ERM de alto campo se utilizaron en un análisis retrospectivo con espectros clínicos de bajo campo.

Conocida la limitación de la ERM clínica en la clasificación de tumores cerebrales, se analizó su utilidad en el seguimiento de tumores gliales de distintos niveles de agresividad. Del análisis no fue posible establecer por ERM un patrón de comportamiento definido de los tumores menos agresivos. En particular y de considerable importancia, la ERM no permite identificar claramente cuando un tumor va a malignizar y progresar. Sin embargo, sí permite definir cuando el tumor responde al tratamiento al cambiar el patrón del espectro a menos agresivo o mantenerse estable. Finalmente, se analizaron los cambios necesarios en la planificación y adquisición para hacer reproducibles y comparables los espectros en estudios clínicos longitudinales como los de tumores cerebrales.

Palabras claves: espectroscopia, tumores gliales, resonancia magnética, MRI, IDH1, 1p/19q, MGMT, hidrógeno, fósforo, monovoxel, cerebro, glicina, mio-inosotol, colina, glicerocolina, glicerofosfoclina, hipotaurina, glutamina, glutamato. jMRUI, Quest, ADC/NMR, PLS-DA, quantile normalization

Title: Hydrogen spectroscopy in medical scanner and high-field spectrometers in the characterization and monitoring of brain tumors.

Abstract

Magnetic resonance spectroscopy (MRS) is a technique that uses the magnetic properties of nuclei and molecules to study chemical structures. One of its applications is to provide metabolomic information of tissues and solutions. In particular, the clinical MRS allows analyzing the metabolism of different tissues "in vivo", without interfering with their biochemical processes. In this thesis, the usefulness of high-field MRS in the classification and characterization of glial brain tumors and the clinical value of MRS in analyzing the evolution of glial tumors, are examined.

As a clinical MRS acquisition is a technique highly dependent on the location and size of the lesion and on field homogeneity, the first part of the study consisted in the analysis of different methods for quantifying clinical brain tumor spectra, taking in account these variables and the acquisition time. This analysis established that for a quantitative analysis, a parametric method with a database of individual metabolites is more reliable and stable than modeling with plain Lorentzian-Gaussian functions. It also established the minimum time necessary to acquire a clinical spectrum, given a quantification method, from the spectrum without water cancellation. In the case of a qualitative classification, it could be established that a fixed number of acquisitions exists, after which the spectrum does not change significantly.

Nowadays being high-field MRS with HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning) a technique widely used in metabolic studies of tissues, including tumors, we examined the possibility of characterizing glial tumors with a high-field spectrometer without the HR-MAS facility. Thus, by using a simple and repetitive preparation technique, it was possible to obtain good quality spectra and find spectral patterns that classify tumors according its pathological anatomy and its genetics, the two reference methods currently used for ranking tumors. In particular with the IDH1 gene, an important new marker in glial tumors associated with patient survival, a clear qualitative relationship was identified among metabolites. Also, the presence of 2-hydroxyglutarate (2HG), a product of IDH1 mutation, was detected in the spectra. We also used the findings of this high-field study in a retrospective analysis of clinical low-field spectra.

Knowing the limitation of MRS in the clinical classification of brain tumors, their usefulness in monitoring progression in glial tumors of different levels of aggressiveness was then analyzed. This showed that a defined behavior pattern could not be established by MRS in the less aggressive tumors. In particular and quite importantly, MRS does not clearly identify when a tumor will become malignant and grow. However it does allow defining when the tumor responds to treatment by changing the pattern of the spectrum to a less aggressive one or remaining stable. Finally, an analysis is made of the necessary changes required in the planning and acquisition of spectra in clinical MRS, to make them reproducible and comparable in longitudinal clinical studies as those used for brain tumors.

Key words: spectroscopy, glial tumours, magnetic resonance, MRI, IDH1, 1p/19q, MGMT, hydrogen, phosphorous, monovoxel, brain, glycine, mio-inosotol, choline, phosphocoline, glycerophosphocoline, hipotaurine, glutamine, glutamate, jMRUI, Quest ADC/NMR, PLS-DA, quantile normalization.

Agradecimientos

Al director de esta tesis, Gerardo, por el apoyo, tiempo e ideas para poder realizar las mediciones y su paciencia en el análisis y corrección.

Al co-director, Gustavo y a la jefa del servicio de Imágenes Silvia, por respaldarme todos estos años con este proyecto.

A Horacio por ayudarme en el manejo de las muestras y aclararme el rol de la genética en los tumores gliales.

A mis compañeros de laboratorio, Gaby y Fernando….., es más agradable trabajar junto a Uds., me ayudaron con algunos problemas, a veces solo con charlas…… , la pasamos bien. A Mirta por los consejos de una post-doctorada.

A FLENI, una institución clínica que permite, sustenta y avala proyectos de investigación propios.

A mi consejero de estudios Rubén, siempre atento y dispuesto cuando lo necesitaba.

A José y Gernok por las horas de compañía cuando hacíamos las mediciones en el equipo de 500 Mhz.

Al grupo de médicos del servicio de imágenes de FLENI, por recibirme, considerarme e involucrarme en este ámbito de trabajo.

Al grupo de técnicos del servicio de imágenes de FLENI por la ayuda y colaboración en las adquisiciones en los resonadores.

A Yanina, porque si bien Malena nos cambio mucho nuestras vidas y nos reoriento las prioridades, me diste en estos últimos dos años el tiempo y entendimiento para terminar este proyecto.

A Malena por reorientarme las prioridades y sellar con una mirada cuales son las cosas realmente importantes.

Lista de abreviaturas

Ala: Alanina
AMARES: Advanced Method for Accurate, Robust and Efficient Spectral fitting algorithm
Asp: Aspartato
ATP: Adenosin trifosfato
OA Oligotstrocitoma grado III
Cho: Colina
Cr: Creatina
CHESS: CHemical Shift Selective
CSF: Líquido cefalorraquídeo (Cerebrospinal fluid)
CT: Tomografía Computada
CP: Componentes Principales
CRLB: Cramer Rao Lower Bound
ERM-MRS: Espectroscopia por resonancia magnética (Magnetic Resonance Spectroscopy)
FID: Free Induction Decay
FOV: Field Of View
FT: Transformada de Fourier
DWI: Imagenes de Difusión (Diffusion Weigthed Imaging)
DFT: Transformada Discreta de Fourier
DICOM: Digital **I**maging and **Co**mmunication in **M**edicine
FWHM: Ancho máximo a mitad de altura
GABA: γ-aminobutyrate acid
Glc: Glucosa
Gln: Glutamina
Glu: Glutamato
Glux: Glutamato y Glutamina
Gly: Glicina
GBM: Glioblastoma Multiforme grado IV
Gd-DTPA: Gadolinio-diethylenetriamine penta-acetic acid
Glc: Glucosa
GM: Sustancia gris (Grey Matter)
GPCho: Glicerofosfocolina
GPE: Glicerofosfoethanolamina
GSH: Glutation
HR-MAS: High Resolution Magic Angle Spinning
Hz: Herzios
IRM-MRI: Imágenes por resonancia magnética (Magnetic Resonance Imaging)
J(ω): Función de densidad del campo magnético
jMRUI: Java Magnetic Resonance Users Interface
mIno: Myo-inositol
MM: Macromoléculas
ML Máxima verosimilitud (maximum-likelihood)
MRSI: Imágenes de espectroscopia por resonancia magnética
NAA: N-acetylaspartato
NAAG: N-acetyl aspartate glutamate
RMN-NMR: Resonancia Magnética Nuclear -Nuclear Magnetic Resonance
NLLS: Cuadrados mínimos no lineales
LS: Cuadrados mínimos (Least Squire)
Lac: Lactato
LCModel: Linear Combination Model
LOH : Loss of heterozygosity (perdida de heterocigosidad)
O: Oligodendroglioma grado II
PC: Fosfocolina
PCA: Análisis de componentes principales (Principal Component Analysis)
PLS-DA: Partial Least Squares Discriminate Analysis
PCr: Fosfocreatina
PET: Positron emission tomography
ppm: partes por million
PRESS: Point Resolved Spectroscopy
Quest:: Método de cuantificar ERM con base de metabolitos en el espacio temporal
RF: Radio frecuencia
RM: Resonancia Magnética
ROI: Región de interés
S-Ino: scyllo-Inositol
SE: Spin Echo
SNR: Relación señal ruido
STEAM: StimulaTed Echo Acquisition Mode
SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography.
Suc: Sucinato
SVS: Single Voxel Spectroscopy
Tau: Taurina
TE: Tiempo de Eco
TR: Tiempo de Repetición
VOI: Volumen de interés
VARPRO: Variable projection spectral fitting algorithm
WM: Sustancia blanca (White matter)

Símbolos

H^1: Hidrógeno
P^{31}: Fósforo-31
F^{19}: Fluor-19
B_0: campo magnético principal [T]
B_1: pulso de RF [T]
δ: corrimiento químico [ppm]
γ : cte. giromagnética [Hz/T]
G: amplitud de gradientes [mT/m]
h: cte. de Planck (6.63·10-34Js)
μ: momento magnético [A/m]
M: magnetización [A/m]
ν: frecuencia [Hz]
T_1: tiempo de relajación longitudinal [s]
T_2: tiempo de relajación transversa [s]
T_2*: tiempo de relajación transversa [s] con inhomogeneidades microscópicas
θ: ángulo de rotación del pulso de RF [º]
ω: frecuencia [Hz]

Fe de Erratas

1- A pedido de la Jurado de esta tesis Blanca Diez (Médica NueroOncóloga), en relación a los nombres dados en la clasificación de los distintos grupos tumorales analizados, donde dice Oligodendrogliomas (O), debería decir **gliomas difusos grado II**, donde dice Oligoastrocitomas (OA) debería decir **gliomas difusos grado III**.

2- En la página 191, párrafo 3, donde dice “deleción IDH1” debe decir “mutación IDH1”.

3- En el Capítulo VII a pedido de la Jurado de esta tesis Blanca Diez (Médica NueroOncóloga) la deleción 10q debe de considerarse como muy agresiva y eso sería la explicación de la mala evolución de varios de los pacientes.

4- En página 196 en el párrafo 25, la quimioterapia puede ser también oral y es también sistémica.

Índice General

Introducción

Metabolómica y HR-MAS **1**

Capítulo I

Resonancia Magnética Nuclear e Imágenes por Resonancia Magnética

I.1 Propiedades magnéticas de la materia
I.1.1 Magnetismo Nuclear y RMN **5**
I.1.2 Descripción cuántica de la RMN **6**
I.1.3. RMN de un sistema de núcleos. **7**
I.2- Mecanismos de relajación **10**
I.2.1 Mecanismos de relajacion dipolo-dipolo **10**
I.2.1.1 Relajación longitudinal o spín-red. T_1 **12**
I.2.1.2 Relajación transversal o espín-espín. T_2 **13**
I.2.1.3 Relajación transversal aparente T^*_2 **15**
I.3 Descripción de un resonador magnético médico
I.3.1 Introducción **16**
I.3.2 Componentes de un resonador **16**
I.4 Generación de imágenes por IRM
I.4.1 Gradientes en IRM. Generación del los cortes anatómicos **18**
I.4.2 Formación de la imagen **19**
I.4.3 I mágenes de IRM cerebrales **21**
Referencias **24**

Capítulo II

Espectroscopia por resonancia magnética nuclear

II.1 Introducción **25**
II.2 Principios básicos de espectroscopía magnética nuclear
II.2.1 Introducción **25**
II.2.2 Desplazamiento químico **26**
II.2.3 Acoplamiento espín espín **27**
II.3 Espectroscopia clínica por resonancia magnética **27**
II.3.1 Homogeneización del campo magnético y cancelación de la señal del agua **28**
II.3.2 Secuencias de espectroscopia clínica **30**
II.3.3 Parámetros relevantes en la adquisición de espectros clínicos **33**
II.4 Procesamiento de la señal **35**
II.5 Espectroscopia de alto campo **36**
II.6 Metabolitos en MRS de tejido cerebral tumoral **38**
Referencias **47**

Capítulo III

Tumores gliales del sistema nervioso central

III.1 Introducción a los tumores gliales
III.1.1 Clasificaciones histológicas **49**
III.1.2 Clasificación general **50**
III.1.3 Tumores gliales – Clasificación de la OMS **51**
III.1.4 Características de los tumores gliales **53**
III.2 Marcadores genéticos de tumores gliales
III.2.1 Introducción **55**
III.2.2 Alteraciones genéticas y marcadores genéticos tumorales en gliomas **56**
Referencias **61**

Capítulo IV

Cuantificación de espectros de resonancia magnética y análisis de concentraciones

IV.1 Modelaje de Señales
IV.1.1 Introducción **63**
IV.1.2 Método de Estimados de Máxima Verosimilitud **63**
IV.1.3 Funcional de proyección variable **65**
IV.2 jMRUI (java Magnetic Resonance User Interface)
IV.2.1 Introducción **66**
IV.2.2 AMARES **68**
IV.2.2.1 Incorporación de Conocimiento Previo **69**
IV.2.3 Quest **70**
IV.3 Valoración de la calidad de la estimación. Coeficientes de Cramer-Rao
IV.3.1 Introducción **72**
IV.3.2 Ejemplo de cálculo de parámetros estimados de CRB en Amares **73**
IV.3.3 Expresiones de CRB
IV.3.3.1 CRB para un pico aislado **74**
IV.3.3.2 CRB para picos con superposición **75**
IV.4 Procesamiento segmentado (“bins”) de espectros de alto campo
IV.4.1 ACD/NMR Processor **76**
IV.5 Análisis multivariados no supervisados y supervisados de datos metabólicos
IV.5.1 Método no supervisado - PCA **78**
IV.5.2 Método supervisado - PLS-DA **80**
IV.6 Procesamiento estadístico metabólico- MetaboAnalyst **83**
IV.6.1 Descripción del programa y métodos **83**
Referencias **85**

Capítulo V

Estimación del número de adquisiciones necesarias para una cuantificación precisa de un espectro clínico de hidrógeno a partir de la señal de agua

V.1 Introducción **87**
V.2 Teoría **88**
V.3 Métodos
V.3.1 Adquisición de los espectros **90**
V.3.2 Análisis de los espectros **91**
V.3.3 Procesamiento
V.3.3.1 Análisis clínico **92**
V.3.3.2 AMARES **92**
V.3.3.3 Quest **93**
V.4 Métodos de Análisis
V.4.1 Estimación del cambio en la cuantificación por aumento del número de adquisiciones **94**
V.4.2 Análisis No lineal paramétrico **94**
V.5 Resultados **95**
V.5.1 Convergencia **97**
V.5.2 Estimación de las variables *bi* **97**
V.6 Discusión **100**
V.7 Conclusiones **103**
Referencias **105**

Capítulo VI

Espectroscopia de alto campo por resonancia magnética aplicada a la clasificación de tumores gliales caracterizados genéticamente.

VI.1 Introducción **107**
VI.2 Metodología
VI.2.1 Obtención y preparación de las muestras **107**
VI.2.2 Adquisición de los espectros **108**
VI.2.3 Procesamiento de los espectros
VI.2.3.1 Programa Topspin 2.1 (Bruker) **108**
VI.2.3.2 Programa Quest **109**
VI.2.3.3 Programa ACD/NMR **109**
VI.2.4 Programa MetaboAnalyst **110**
VI.3 Resultados
VI.3.1 Cuantificación con Quest **110**
VI.3.2 Cuantificación con ACD/NMR **111**
VI.3.3 Grupos tumorales de análisis **114**
VI.4 Análisis de los resultados **119**
VI.5 Discusión **121**
VI.6 Conclusiones **129**

Corolario

IDH1 mutación en tumores gliales y producción de 2-hidroxiglutarato (2HG*)* medido por RMN

C.1 Introducción **132**
C.2 Resultados **133**
Oligodendrogliomas (O) **133**
Astrocitomas (OA) **136**
Glioblastomas (GB) **138**
C.3 Análisis **139**
Referencias **141**

Capítulo VII

Estudio de la evolución tumores gliales por espectroscopia de ^{1}H clínica

VII.1 Introducción **145**
VII.2 Métodos y mediciones
VII.2.1 Imágenes y espectros **146**
VII.2.2 Análisis de las imágenes **147**
VII.2.3 Análisis de los espectros **148**
VII.2.4 Clasificación del los tumores **149**
VII.3 Resultados **149**
VII.4 Análisis **188**
VII.5 Discusión **192**
VII.6 Conclusiones **197**
Referencias **199**

Conclusiones generales **201**

Anexo I: Características genéticas de los tumores **203**

Anexo II: Gráficos y resultados de la clasificación PLS-DA **205**

Introducción

Metabolómica y HR-MAS

En los últimos años, se ha producido un gran avance en la investigación biomédica al generarse las tecnologías que permiten realizar estudios del genoma (genómica), la transcripción de ARN (transcriptómica), las proteínas (proteómica) y los metabolitos (metabolómica) de tejidos y fluidos (Fig. I).

En particular, la metabolómica es una disciplina dedicada al estudio global de moléculas pequeñas (aminoácidos, ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas, lípidos y otras moléculas orgánicas de bajo peso molecular) en las células, tejidos y biofluidos. Cambios en la concentración de determinados grupos de metabolitos pueden originarse en factores tales como la dieta, la edad, cambios fisiológicos, distintas patologías, etapas del desarrollo, etc.

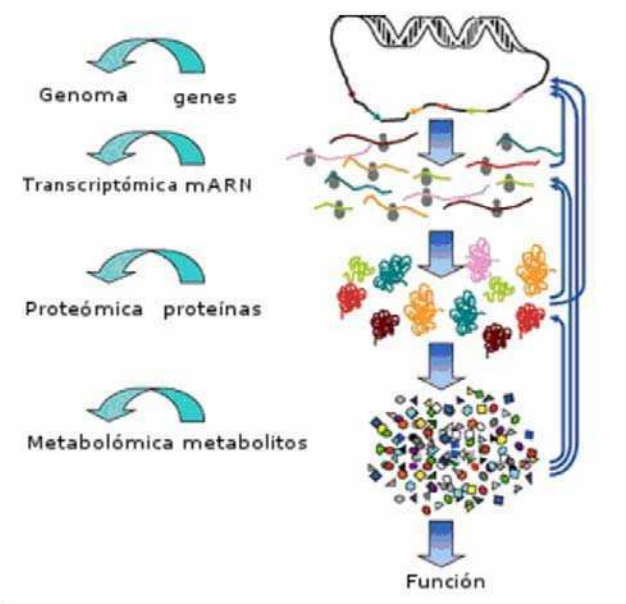


Figura I: Representación de los diferentes niveles de análisis "omicos" posibles en muestras biológicas según cual sea la principal función de expresión que se desea estudiar.

Actualmente existen varias tecnologías que permiten medir y cuantificar metabolitos y que generan datos altamente reproducibles, pero que implican sistemas de almacenamiento de datos y métodos de análisis complejos. Algunos análisis tienen la capacidad de poder relacionarlos con el resto de las "ómicas"[1-2] dada la integración existente entre ellas.

Cambios a un nivel genético, de transcripción o de generación de proteínas invariablemente llevan a cambios en la generación y la concentración de los metabolitos. Sin embargo, esta relación no es sencilla de analizar, ya que es sabido que el número de metabolitos que existen en los tejidos de los mamíferos es mucho menor que el número de proteínas que están

presentes en los tejidos, por lo tanto un patrón determinado de metabolitos puede reflejar varios cambios genómicos o transcriptómicos distintos (Fig. II).

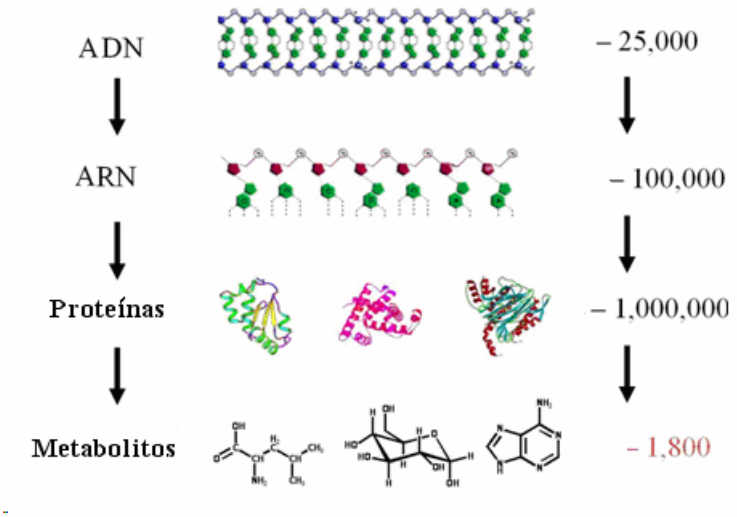


Figura II: Representación del número aproximado de "componentes" posibles en cada uno de los niveles de análisis "ómicos" en muestras biológicas. Claramente se infiere que los cambios a nivel de metabolitos pueden originarse en varios cambios distintos en los niveles anteriores.

El crecimiento que estas técnicas de análisis están teniendo, claramente permite inferir que la metabolómica será cada vez más utilizada en medicina[3] y resultará útil en el diagnóstico de enfermedades. También cabe esperar un papel importante en la mejora de la comprensión de los mecanismos fisiológicos y moleculares de muchas de ellas, en particular en el cáncer.

Actualmente, uno de los objetivos de la metabolómica aplicada a los distintos tipos de cáncer humanos, es clasificar una muestra tumoral por su perfil o patrón metabólico. El ideal es encontrar un conjunto limitado de metabolitos que claramente clasifique la muestra como un tipo/subtipo específico de tumor diferenciándolo del resto[4]. Por lo tanto, el análisis metabolómico es un enfoque prometedor para la identificación de biomarcadores que podrían ser utilizados en la clasificación de tumores, así como una herramienta más en el estudio de la progresión y tratamiento de tumores en modelos animales y en humanos que no se logra mediante la histología, la transcriptómica y la proteómica. Actualmente los estudios metabolómicos "in-vitro" realizados en muestras de tejidos o fluidos han demostrado que es posible encontrar patrones diferenciales en distintos tipos de patologías, en particular de distintos tumores[5-6-7].

En los estudios metabolómicos se utilizan diferentes técnicas, como cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida (HPLC) y HPLC con detección electroquímica, espectrometría de masas (EM) y espectroscopía por resonancia magnética (RMN).

En particular, la técnica llamada espectroscopia de alta resolución de ángulo mágico (High-Resolution Magic Angle Spinning -HR-MAS)[8], como se describe en el Capítulo III, produce espectros de RMN "ex vivo" de alta resolución a partir de muestras de tejido que permite detectar fácilmente los metabolitos y es además fácilmente cuantificable.

Lamentablemente, los estudios metabolómicos realizados "in-vivo" por medio de espectros de RMN clínicos (Capítulo II), tiene actualmente el inconveniente que el número de metabolitos que pueden ser detectados es relativamente pequeño, lo que hace complicado determinar que vías metabólicas están alteradas por una patología.

Es esperable que con el aumento de los campos magnéticos de los resonadores clínicos se consiga aumentar el número de metabolitos identificables y cuantificables "in-vivo" por espectroscopia clínica[9-10-11-12] (Fig. III). El aumento del campo magnético de los resonadores clínicos, edición de secuencias que permitan identificar sustancias particulares, mejoras en las adquisición y mejores técnicas de análisis de los espectros permitirán en poco tiempo reconocer más procesos metabólicos in-vivo y verificar datos obtenidos "in-vitro".

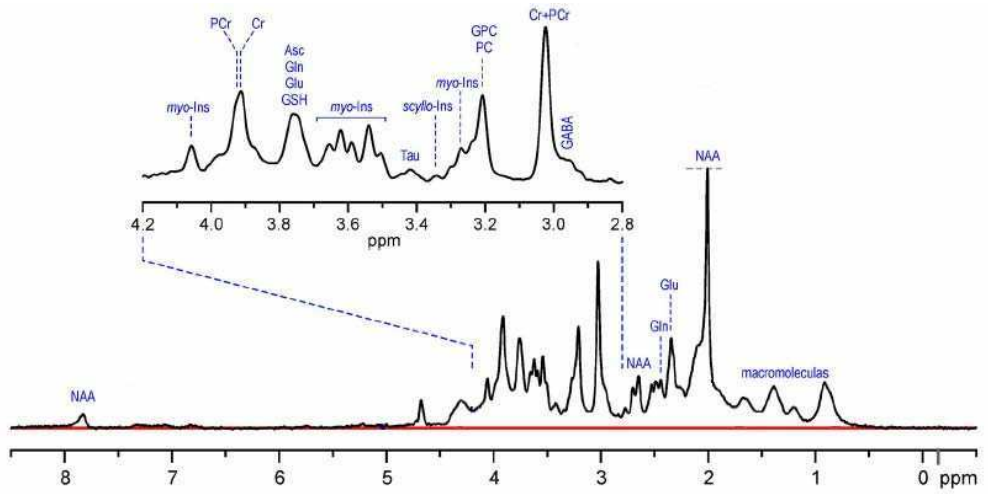


Figura III: Espectro monovoxel "in vivo" de sustancia gris occipital de cerebro humano adquirido a 7 Teslas[13] donde se aprecia la mayor separación de los distintos picos de las sustancias así como el aumento del ancho de los picos.

Referencias

[1] Kell DB **Metabolomics and systems biology: making sense of the soup**. *Curr Opin Microbiol.* 2004 Jun;7(3):296-307.

[2] Zhang W, Li F, Nie L **Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies**. *Microbiology.* 2010 Feb;156(Pt 2):287-301

[3] **Surgeons get real-time tissue profiling** *http://www.nature.com/news/2009/091214 /full/news.2009.1128.html*

[4] Jennifer L. Spratlin, Natalie J. Serkova, S. Gail Eckhardt **Clinical Applications of Metabolomics in Oncology: A Review** . *Clin Cancer Res*. 2009 January 15; 15(2): 431–440.

[5] Howell A **Can metabolomics in addition to genomics add to prognostic and predictive information in breast cancer?** *BMC Med.* 2010 Nov 16;8:73.

[6] Fong MY, McDunn J, Kakar SS **Identification of metabolites in the normal ovary and their transformation in primary and metastatic ovarian cancer**. *PLoS One.* 2011;6(5):e19963..

[7] Zira AN, Theocharis SE, Mitropoulos D, Migdalis V, Mikros E **(1)H NMR metabonomic analysis in renal cell carcinoma: a possible diagnostic tool**. . *J Proteome Res.*2010 Aug 6;9(8):4038-44.

[8] I Schnell Merging **Concepts from Liquid-State and Solid-State NMR Spectroscopy for the Investigation of Supra- and Biomolecular Systems** *Current Analytical Chemistry*, 2005, *1*, 3-27 3

[9] Stephenson M, Gunner F, Napolitano A, Greenhaff P, MacDonald I, Saeed N, Vennart W, Francis S Morris P. **Applications of multi-nuclear magnetic resonance spectroscopy at 7T** *World J Radiol.* 2011 April 28; 3(4): 105-113.

[10] R. Otazo, T. Li, A. Caprihan, B. Mueller, K. O. Lim, K. Ugurbil, L. L. Wald, B. G. Jenkins, B. R. Rosen, C. Zuo, P. Renshaw, J. R. Alger, S. Posse **SNR and Spectral Line-Width Improvements between 1.5 and 7 T in 1H Echo-Planar Spectroscopic Imaging** Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. 13 (2005)

[11] D Deelchand , P Van de Moortele, G Adriany, I Iltis, P Andersen, J Strupp, JVaughan, K Uğurbil, P Henry ***In vivo*^{1}H NMR spectroscopy of the human brain at 9.4 T: Initial results** Journal of Magnetic Resonance Volume 206, Issue 1**,** September 2010, Pages 74–80

[12] **Ultra-high-field magnetic resonance imaging** *www.cea.fr/var/cea/storage/static/gb/library/Clefs56/ pdfgb/Clefs_56_p30_35_LethimonierGB.pdf*

[13] Ivan Tkac **Requirements for reliable metabolite profiling** *.ismrm2011/proceedings /files/ ISMRM2011-8371.pdf*

Capítulo I

Resonancia Magnética Nuclear e Imágenes por Resonancia Magnética

I.1 Propiedades magnéticas de la materia

I.1.1- Magnetismo Nuclear y RMN

La propiedad magnética de los núcleos atómicos interesó a la física entrado el siglo XX, ya que su postulación permitió explicar la estructura fina que se observa en las líneas espectrales atómicas. El asociarle a algunas partículas un momento magnético intrínseco que interactua magnéticamente con su entorno, permitió explicar las transiciones energéticas entre núcleos y electrones que se manifiestan como "líneas espectrales"[1]. La idea original fue asociarle a los núcleos con espín, un momento magnetico $\vec{u}$ dado por la siguiente expresión:

$$\vec{u} = \gamma \cdot \vec{s} \qquad \text{I.1}$$

donde $\vec{u}$ es el momento magnético, $\vec{s}$ el espín y γ la constante giromagnética (depende del núcleo).

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es posible por la interacción de $\vec{s}$ (o $\vec{u}$) con un campo magnético intenso externo (**B_o**). En este sistema la energía del sistema es

$$U_{\text{int}} = -\vec{\mu} \,.\, \vec{B}_0 = -\gamma\, \vec{S}.\vec{B} \qquad \text{I.2}$$

donde, la proyección de $\vec{s}$ sobre B_o puede tomar los valores establecidos por la mecánica cuántica

$$-\left|\vec{S}\right| \le S_z \le \left|\vec{S}\right| \quad \text{y} \quad \Delta S_z = \pm 1.$$

Para el núcleo de ^1H (***s*** =1/2) se generan dos estados de distintas energías (correspondientes a $S_z = ½\hbar$ y $S_z = -½\hbar$, $\hbar$ la constante de Planck reducida), los cuales por simplicidad se definen como "***up*",** "α" o "paralelo" (S_z = ½) y, "***down*"**, "β" o "antiparalelo" (S_z = -½).

Además, el momento magnético $\vec{u}$ forma con **B_o** un ángulo de 54,7º, lo que hace que $\vec{u}$ (y por lo tanto $\vec{s}$) tenga un movimiento de precesión en torno a **B_o** (Fig. I.1) con una frecuencia (**ω_o**) dada por la relacion de Larmor[2], $\boldsymbol{\omega_o = \gamma B_0}$.

Figura I.1: Izq) Representación de los momentos magnéticos de los dos estados generados por la interaccion de un campo magnético en un núcleo de espín ½. Cada estado tiene una energía distinta, Der) Rotación de **μ** respecto de **z** a la frecuencia de Larmor por la presencia de $\mathbf{B_o}$.

I.1.2- Descripción cuántica de la RMN

El Hamiltoniano que representa un espín que se encuentra en presencia de un campo magnético está dado por:

$$H_{B_0} = -\gamma \, S_z B_o \qquad \text{I.3}$$

siendo S_z el operador de la proyección de espín sobre el eje z con autovalores $\hbar\, m_z$ (con m_z=-½ y +½) y B_o la magnitud del campo externo aplicado. Las autofunciones o bases de este operador H_{Bo} usualmente se denotan como $|m_z = ½\rangle \equiv |\alpha\rangle$ y $|m_z = -½\rangle \equiv |\beta\rangle$.

La transición entre el estado $|\alpha\rangle$ a $|\beta\rangle$ es posible sí y solo sí el núcleo puede absorber una cantidad de energía igual a la diferencia entre los dos estados, realizando por ende un salto cuántico e igual a:

$$E_{down} - E_{up} = \Delta E = \hbar\gamma \, B_o \qquad \text{I.4}$$

Con $\gamma \, B_o = \omega_0$ la frecuencia de Larmor.

Analíticamente, la perturbación generada por un campo transversal oscilante (sin pérdida de generalidad considerada en el eje x) contribuye con el siguiente término en la energía[3]:

$$H_{B\perp} = -\gamma \, S_x B_\perp \, 2\cos(\omega.t) \qquad \text{I.5}$$

donde por teoría de perturbaciones, la probabilidad por unidad de tiempo de transición entre dos estados r y s con r,s= α o β, resulta:

$$\Pr ob_{r\to s} = \gamma \, B_\perp \;\; \delta(\Delta m_z \pm 1) \;\; \delta(\hbar.\omega - |\hbar.\omega_0|) \qquad \text{I.6}$$

siendo γ la constante giromagnética, $B_\perp$ la magnitud del campo transversal en x (debiendo cumplirse $B_\perp << B_0$ para poder utilizar teoría de las perturbaciones), ω la frecuencia de oscilación del campo transversal, ω_0 la frecuencia de Larmor y δ(arg) es 1 si arg=0 y 0 si arg $\neq 0$. Por lo tanto la probabilidad $\neq 0$ solo se cumple si $\Delta m_z = \pm 1$ y $\omega = \omega_0$. Físicamente este resultado dice que solo se inducirán transiciones $|\alpha\rangle$ a $|\beta\rangle$ (y viceversa) cuando la frecuencia del campo que perturbe al sistema sea igual a la frecuencia de precesión $\vec{u}$ en torno a $\mathbf{B_o}$, dada por la ley de Larmor. Estas frecuencias están en el orden de las radiofrecuencias (RF).

Terminada la excitación, el núcleo retorna al estado de equilibrio a través de mecanismos de relajación (a través de la interacción con campos magnéticos de frecuencia $\omega = \omega_0$) que están ligados íntimamente a las interacciones entre los núcleos y su entorno. A través de estos mecanismos el exceso de energía magnética es entregado al medio (muchas veces referido como "la red").

I.1.3- RMN de un sistema de núcleos

En un volumen, con una gran número de nucleos de ^{1}H, los dos estados $|\alpha\rangle$ y $|\beta\rangle$**,** coexisten en la muestra y sus concentraciones relativas están fijadas por la distribución de Boltzman.

Para valores normales de campo magnético y temperatura, la energía magnética $\hbar\gamma B_o$ de un conjunto de núcleos de ^{1}H es mucho menor que la energía térmica kT. En esas circunstancias la relación entre las poblaciones de los dos estados posibles es[4]

$$N(\alpha)/N(\beta) \approx 1 + \left(\frac{\hbar\gamma B_o}{k\,T} \right) \qquad \text{I.7}$$

Donde N es la cantidad de protones en cada estado, T es la temperatura, k la constante de Boltzmann, $\boldsymbol{\gamma}$ la constante giromágnetica y $\hbar$ la constante de Planck. A modo de referencia, en un campo de 9 Teslas a temperatura ambiente la diferencia entre el número de protones en estado **up** y **down** es solo 1 en 300.000 núcleos.

El resultado de esta coexistencia de estados en un volumen lleva a definir una magnitud macroscópica (no cuántica) $\mathbf{M_o}$**,** que es la suma vectorial de cada momento magnético nuclear individual (Fig I.2). El módulo de la magnetización macroscópica, M_0, está directamente relacionado con la densidad de núcleos en el volumen.

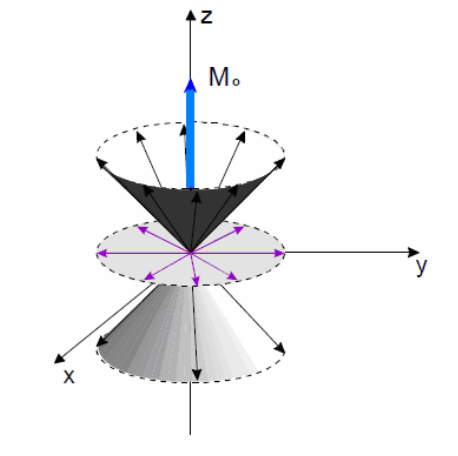


Figura I.2: Generación del momento magnético M_o en un volumen por la presencia de un campo magnético en la dirección del eje z. Este se origina por la suma vectorial de los momentos de cada núcleo. Las proyecciones en el plano x,y, se anulan por las diferencias de fase**.**

En el estado de equilibrio estacionario la suma de las componentes transversales de los momentos magnéticos de cada núcleo cancela la componente transversal de la magnetización (M_{xy}). Esto es, los momentos magnéticos se encuentren **desfasados** aleatoriamente entre sí. De este modo solo subsiste $\mathbf{M_o}$ paralela a $\mathbf{B_o}$.

Macroscopicamente, el fenómeno de RMN está asociado a la **posibilidad de rotar** a $\mathbf{M_o}$ para crear una magnetización transversal a $\mathbf{B_0}$. En el caso macroscópico, esta rotación nuevamente se consigue por medio de un campo magnético $\mathbf{B_1}$ (componente magnética de una onda electromagnética de radiofrecuencia) perpendicular a $\mathbf{B_o}$ que está descripto en las ecuaciones de Bloch[5]-[6].

De las ecuaciones de Bloch nuevamente surge que la condición de resonancia se establece cuando la frecuencia de oscilación temporal de $\mathbf{B_1}$ coincide con la frecuencia de Larmor. Esto se logra en los espectrómetros modernos con un pulso de RF de un ancho de banda tal que incluya $\boldsymbol{\omega_o}$, caso contrario $\mathbf{M_o}$ (promediado durante un ciclo de rotación), no sentiría el efecto del campo $\mathbf{B_1}$ y por lo tanto no se produciría la rotación. Esta descripción clásica de resonancia nuclear resulta simple e intuitiva, aunque es importante resaltar que la RMN es un fenómeno netamente cuántico.

El efecto de los campos magnéticos $\mathbf{B_1}$ y $\mathbf{B_o}$ en un volumen de espines da como resultado:

1- La posibilidad que los espines $|\alpha\rangle$ adquieran energía del campo $\mathbf{B_1}$ y pasen a $|\beta\rangle$.

2- Las componentes transversales de los momentos magnéticos nucleares que en presencia de $\mathbf{B_o}$ estaban en un estado de fase incoherente en **z**, por $\mathbf{B_1}$ (Ec I.5) **se colocan en fase** con una distribucion de Boltzmann, dando origen a una magnetización macroscópica transversal (Fig. I.3).

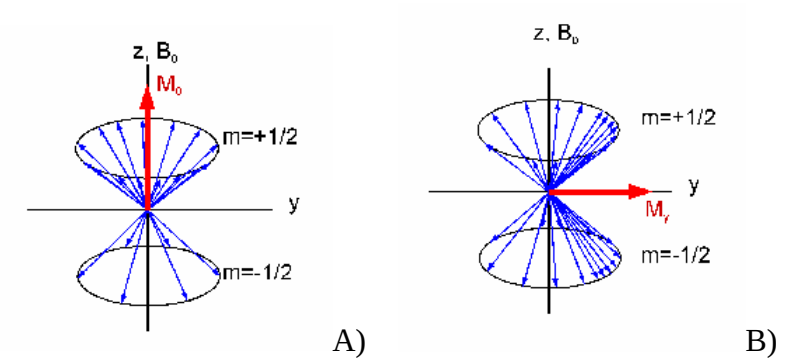


Figura I.3: Rotación de M_0 en 90º. A) Sistema de espines en un campo $\mathbf{B_o}$ desfasados aleatoriamente donde solo persiste la resultante $\mathbf{M_o}$ B) al quedar, por el campo de RF aplicado (ec. I.5), los dos niveles de energía igualmente pobladas (M_z = 0), la redistribución de los espines en el plano en xy es equivalente a la diferencia de poblaciones de Boltzmann según z, por eso My = Mz después de un pulso de 90°. Al sistema de espines en este estado se lo llama sistema de "coherencia de fase".

Es la transición $|\alpha\rangle \rightarrow |\beta\rangle$ de los núcleos inducida por $\mathbf{B}_1$, la que permite que la magnetización $\mathbf{M_o}$ originalmente alineada con $\mathbf{B}_0$, pueda ser llevada al plano transversal en su totalidad (rotación de 90º), o parcialmente (un ángulo menor o mayor de 90º) o también invertirla (rotación de 180º). Esto depende del tiempo que se deje actuar la excitación (mas tiempo, mayor ángulo de rotación) y/o amplitud de la excitación (mayor amplitud, mayor ángulo de rotación). Esto sucede aún cuando los valores de los campos magnéticos son realmente muy diferentes; en un resonador siempre $\mathbf{B_o}$ (0.5-19 Tesla) es mucho mayor que $\mathbf{B_1}$ (10^{-5}-$3x10^{-4}$ Tesla).

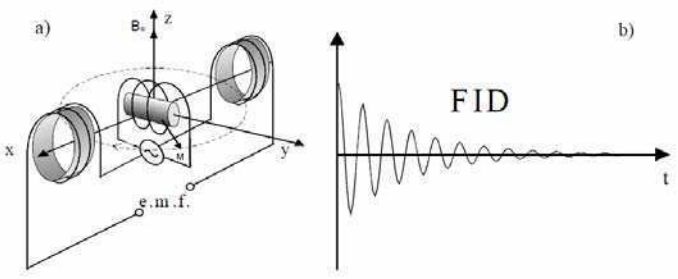


Figura I.4: Representación final del proceso resonante macroscópico. $\mathbf{B_1}$, un campo magnético transversal a $\mathbf{B_o}$ de frecuencia $w_o = \gamma B_o$ rota a $\mathbf{M_o}$. El ángulo de rotación dependerá de la amplitud y tiempo de aplicación de $\mathbf{B_1}$. La proyección de $\mathbf{M_o}$ sobre el plano xy ($\mathbf{M_{xy}}$) al ser variable (con frecuencia ω_o) es medida por antenas sintonizadas a esa frecuencia**.**

La rotacion de $\mathbf{M_o}$ crea una magnetización $\mathbf{M_{xy}}$ transversal a $\mathbf{B_0}$, que como se deduce de las ecuaciónes de Bloch, *rota con la frecuencia de Larmor* ($\vec{\omega}_0 = \gamma \vec{B}_0$). Es la rotación de $\mathbf{M_{xy}}$ la que genera una señal electromagnética que es la que se mide en RMN. La medición de la intensidad, frecuencia y fase de $\mathbf{M_{xy}}$ por bobinas sintonizadas (Fig. I.4), provee la información del medio donde se generó la señal que es la que luego va a ser utilizada para crear las imágenes y los espectros de RMN.

I.2- Mecanismos de relajación

En la descripcion de la RMN en el punto I.1 no se contemplaron dos fenómenos:

1. Los núcleos no interaccionan solo con los campos magnéticos externos $\mathbf{B_o}$ y $\mathbf{B_1}$.
2. Estos campos externos no son uniformes en toda la muestra.

Sin embargo, estos son los fenómenos que permiten explicar los mecanismos a través de los cuales los núcleos luego de haber sido excitados, relajan (decaen) y vuelven a la distribución de equilibrio de la muestra. Al considerar los procesos de relajación aparecen los tiempos de relajación (T_1, T_2 y T^*_2), imprescindibles para la comprensión del contraste en las imágenes y el análisis los espectros por RMN[7-8-9].

Los mecanismos de relajación provienen de dos efectos: i) transiciones entre estados de espín que implican transferencia de energía entre el sistema de espines y su entorno ("la red") y ii) modificaciones de las diferencias de energía entre los estados, que afectan a las frecuencias de precesión pero no implican cambios en las poblaciones y por tanto no suponen una transferencia neta de energía entre el sistema de espines y su entorno. Estas contribuciones se denominan adiabáticas.

I.2.1 Mecanismos de relajacion dipolo-dipolo

Así como la población relativa de estados de espín nuclear puede ser alterada por aplicación de un campo de RF, una formulación más general es decir **que cualquier campo magnético "fluctuante", oscilando cerca de la frecuencia de Larmor, puede inducir transiciones entre los estados de espín**. Y son precisamente las fluctuaciones de los campos magnéticos procedentes del sistema de espines y su entorno las que permiten el intercambio de energía y el proceso de relajación que vuelve el sistema al equilibrio. En particular, las interacciones dipolo-dipolo son la principal fuente de las fluctuaciones de campos magnéticos. Como se muestra en la Figura I.5 el momento magnético de un espín afecta localmente (B_{loc}) de manera aleatoria (tanto en amplitud y en orientación) a otro espín, debido al movimiento

browniano y molecular. Cuando estos campos fluctuantes presentan componentes de frecuencia cerca de la frecuencia de Larmor se induce a la relajación. Las frecuencias del movimiento molecular en un líquido cubren un rango amplio y solo las rotaciones ocurren a frecuencias comparables a las de resonancia de los núcleos.

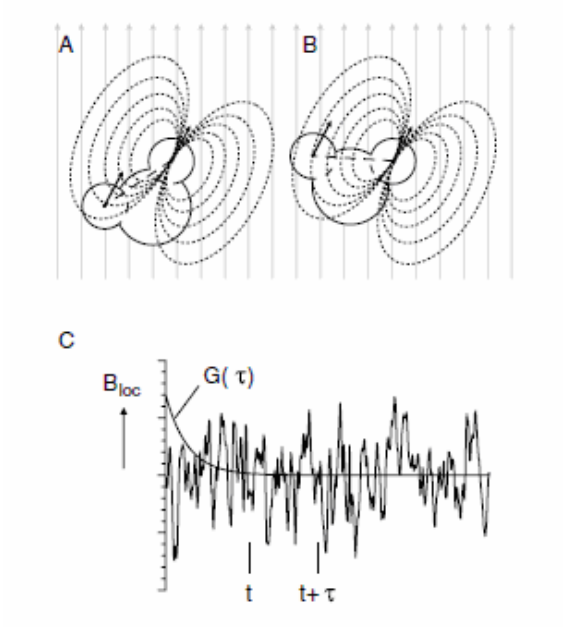


Figura I.5: Interacciones dipolo-dipolo del H_2O. (A) El momento magnético de un protón en un campo magnético externo B_0 perturba el campo magnético en otro protón de la misma molécula. (B) A medida que el agua gira y se traslada al azar, la dirección y magnitud de la interacción dipolo-dipolo cambia, dando lugar a la variación aleatoria del campo magnético requerido para la relajación. (C) La función de correlación $G(\tau)$ es una medida de la correlación del campo magnético en dos momentos. Cuando τ es grande, no existe correlación y $G(\tau)$ es igual a cero.

Para describir las fluctuaciones del campo magnético se introduce la función de correlación

$$G(\tau) = \overline{B_{loc}(t)B_{loc}(t+\tau)} \qquad \text{I.8}$$

que representa un promedio de los valores de correlación de B_{loc} en un parte macroscópica de la muestra. Por un tiempo breve τ, la orientación y la amplitud del campo magnético local no cambian mucho y se tendrá alta correlación, para τ largos el campo magnético local cambia mucho debido al movimiento browniano y molecular, dando lugar a una baja correlación.

La función de correlación $G(\tau)$ se suele describir como una exponencial decreciente

$$G(\tau) = \overline{B_{loc}^2} e^{-|\tau|/\tau_c} \qquad \text{I.9}$$

donde τ_c es el tiempo de correlación. En general τ_c corresponde más o menos a la duración media que le toma a una molécula girar más de 1 rad. Al cabo de τ_c el sistema pierde la "memoria" de la orientación anterior de las moléculas. Para espines en líquidos los τ_c son

cortos (10^{-12}-10^{-10} s), mientras que para espines "inmóviles" (en sólidos) τ_c son más largos (10^{-5}-10^{-3} s).

Al aplicar la Transformada de Fourier a $G(\tau_c)$ se tiene la función densidad de frecuencia del B_{loc} ($J(\omega)$)

$$J(\omega) = 2\overline{B_{loc}^2}\frac{\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2} \qquad \text{I.10}$$

Una representación de la curva $J(\omega)$ es la que se observa en la Figura I.6

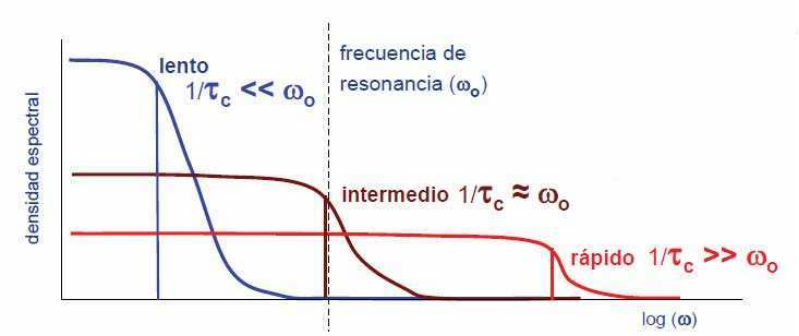


Figura I.6: Distintas curvas de $J(\omega)$ en función de la relación entre τ_c y ω_o. El área debajo de cada curva es constante por eso la mayor transferencia de energía se consigue cuando $1/\tau_c \approx \omega_o$.

En este contexto, un τ_c largo indica que el sistema molecular se mueve lentamente, las frecuencias disponibles están distribuidas en un rango pequeño y hay poca disponibilidad de frecuencias altas cercanas a ω_o. Por lo contrario, un τ_c corto indica que el sistema molecular se mueve rápido y las frecuencias están distribuidas en un rango muy amplio con una densidad baja para ω_o, en estos dos casos la relajación del sistema de espines es lenta. En cambio, con un τ_c intermedio, el sistema molecular se mueve rápido con valores que incluyen a ω_o y tiene muy buena disponibilidad de frecuencias, lo que permite una buena relajación de los espines.

I.2.1.1 Relajación longitudinal o spín-red. T_1

El tiempo que el sistema de espines permanece excitado depende de la capacidad que tenga la muestra de transferir esa energía al medio. Así, el regreso al estado de equilibrio de esos núcleos depende de cuan rápido pueden estos núcleos transferir esa energía al medio que lo rodea, acoplando termicamente el sistema de espines a las rotaciones y vibraciones de las moléculas. Esto último a su vez depende de las condiciones magnéticas y electrónicas locales de la muestra, definidas por el tipo de núcleo, su frecuencia de resonancia, la temperatura, la movilidad del núcleo (microviscosidad), la presencia de macromoléculas, la presencia de iones o moléculas paramagnéticas y otros.

La fórmula que describe el comportamiento temporal de $\mathbf{M_z}$ después de aplicar un pulso de RF de 90º a la muestra es

$$\mathbf{M_z = M_o \left(1 - e^{-t/T1}\right)} \qquad \text{I.11}$$

permitiendo definir T_1 como *el tiempo en que la magnetización longitudinal* $\boldsymbol{M_z}$ *tarda en recuperar el 63,2 % de su valor inicial a partir del instante de finalización de un pulso de rotacion de 90º*. En $5T_1$ $\mathbf{M_z}$ recupera casi el 99%.

Siendo la interación dipolar la mas importante en el proceso de relajación, para un sistema de dos espines que solo interactuan dipolarmente se tiene que T_1 es igual a[10]

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{10}\frac{\gamma^4 h^2}{4\pi^2 r^6}\left(J(\omega) + 4J(2\omega)\right) \qquad \text{I.12}$$

por lo cual T_1 es principalmente afectado por los campos magnéticos locales que oscilan a la frecuencia de Larmor y al doble de esa frecuencia.

I.2.1.2 Relajación transversal o espín-espín. T_2

La observación de la señal de RMN depende de la generación de coherencia de fase del sistema de espines (ec. I.5). Después de un pulso de rotación de 90º sobre el sistema, la coherencia de fase que se generó desaparece con una constante de tiempo determinada. Esa magnetización decae a cero por el desfasaje de las componentes transversales (xy) de los momentos dipolares de los núcleos que vuelven a tener una distribución al azar como tenían previamente al pulso de RF. En este proceso no hay involucrados cambios en la distribución de poblaciones de espines por lo que el sistema de espines **no entrega energía al medio**.

Técnicamente, se define T_2 como *el tiempo que tarda la magnetización transversal(*$\mathbf{M_{xy}}$*) en perder el 63,2 % de su valor inicial* ($\mathbf{M_o}$) *a partir del instante de finalización de un pulso de excitación de 90º.*

Nuevamente, en un sistema de dos espines que solo interactuan dipolarmente se tiene que T_2 es igual a[10]

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{20}\frac{\gamma^4 h^2}{4\pi^2 r^6}\left(3J(0) + 5J(\omega) + 2J(2\omega)\right) \qquad \text{I.13}$$

A diferencia de T_1, T_2 es dependiente de campos magnéticos de frecuencias ω bajas (primer termino de la ecuación). Reemplazando $J(\omega)$ en las ecuaciones de T_1 y T_2 se puede graficar sus dependencias con τ_c (Fig. I.7).

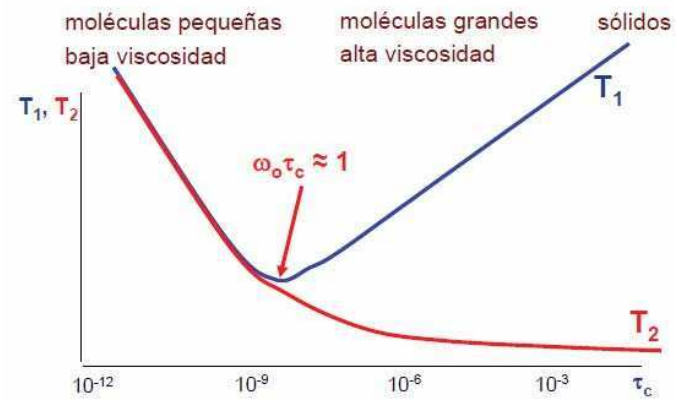


Figura I.7: Curvas de T_1 y T_2 para distintos tipos de sistema de espines. Para moléculas libres T_1=T_2, para sólidos T_1 aumenta y T_2 disminuye mucho por lo que es difícil de medir resonancias de sólidos.

Con sistemas con τ_c cortos (sistema de moléculas libres como el agua libre), se tiene que T_1=T_2. En el caso de sólidos o H_2O ligada, donde los τ_c son largos, T_2 se vuelve muy corto y las resonancias son difíciles de medir al decaer rápidamente.

Además de las interacciones dipolo-dipolo, un campo magnético variable también puede surgir de electrones no apareados. Y como el momento magnético del electrón es 650 veces mayor al de un protón, resulta que los tiempos de relajación T_1 y los tiempos de relajación T_2 se hacen muy cortos ya que los electrones actuan como buenos "absorbentes" de la energía que tienen los núcleos excitados y como "in-homogeneadores" del campo magentico cercano, siempre que la distancia entre los electrones y el núcleo sea lo suficientemente pequeña. Compuestos exógenos paramagnéticos, (por ejemplo, complejos de gadolinio como Gd-DTPA) son muy utilizados en imágenes por resonancia magnética (IRM) por su capacidad de acortar significativamente los valores de T_1 y T_2. Los ^1H del agua son especialmente sensibles a la presencia de núcleos paramagnéticos, ya que pueden llegar muy cerca de los electrones no apareados.

I.2.1.3 Relajación transversal aparente T^*_2

Al decaimiento T_2 intrínseco de una muestra, originado mayoritariamente en la interacción dipolar, se le debe sumar el decaimiento de la magnetización transversal debido a las inhomogeneidades de $\mathbf{B_o}$ en el volumen de la muestra. Las variaciones macro y microscópicas de $\mathbf{B_o}$ también ocasionan pérdida de coherencia de fase que se suma a la de las interacciones dipolares. La inhomogeneidad de $\mathbf{B_o}$ produce entonces una dispersión adicional de la magnetización transversal que resulta en un decaimiento con una constante de tiempo T_2*. En esas condiciones, la ecuación que describe el comportamiento temporal de $\mathbf{M_{xy}}$ después de aplicar un pulso de RF de 90º a la muestra es:

$$\mathbf{M_{XY} = M_O\, e^{-t/T^*_2}} \qquad \text{I.14}$$

$$\text{donde } \frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma\langle \Delta B_O \rangle}{2\pi} \qquad \text{I.15}$$

Es posible, a través de una secuencia de pulsos denominada espín-eco (SE), cancelar la contribución de $\langle \Delta B_O \rangle$ en el decaimiento de la señal de RMN.

Entonces, el proceso de relajación de una muestra de espines luego de su excitación consta tanto de una recuperación de M_z como de una disminución de M_{xy}. Ambos mecanismos de relajación son simultáneos y dependen de los tiempos T_1 y T_2/T^*_2 de la muestra. En general $T_1 \geq T_2$, con la igualdad válida para ^1H libres y $T_2 \geq T^*_2$, con la igualdad válida para B_o perfectamente homogéneo sobre toda la muestra (Fig. I.8) .

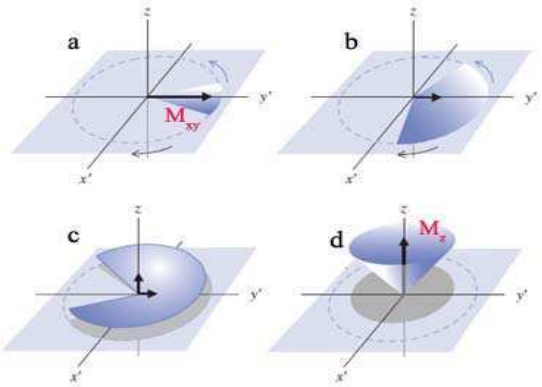


Figura I.8: Imagen del proceso de relajación macroscópico de un sistema de espines. Finalizada la rotación de 90º de M_o (a), M_{xy} empieza a disminuir por pérdida de coherencia de fase de los espines (T_2 o T^*_2) y M_z empieza a recuperar su valor de equilibrio (T_1) (b,c,d).

Los tiempos de relajación T_1 y T_2/T^*_2 son particularmente importantes en IRM porque el contraste entre los distintos tejidos, que es lo que en definitiva permite diferenciarlos, se basa en medir las diferencias de intensidad de señal que se producen por los diferentes tiempos de relajacion T_1 y/o T_2/T^*_2 de los mismos, siendo éste uno de las pilares sobre los que se asienta la IRM.

I.3 Descripción de un resonador magnético médico

I.3.1 Introducción

Un resonador magnético médico, a grandes rasgos, se puede dividir en 3 conjuntos de equipos:

1- El magneto principal con sus bobinas de gradientes y sus bobinas de RF de emisión y recepción de señal.

2- La electrónica con los generadores y amplificadores de los pulsos de RF y gradientes de campo magnético y el sistema de recepción y amplificación de la señal.

3- Computadoras y programas para procesamiento de las imágenes, espectros, etc.

I.3.2 Componentes de un resonador

Magneto principal: es por lo general un bobinado cilíndrico superconductor que genera el campo $\mathbf{B_o}$ al que opera el resonador. Se considera el eje mayor del cilindro como el eje de coordenadas "Z", el eje "X" coincide con la orientación arriba-abajo y el eje "Y" derecha-izquierda.

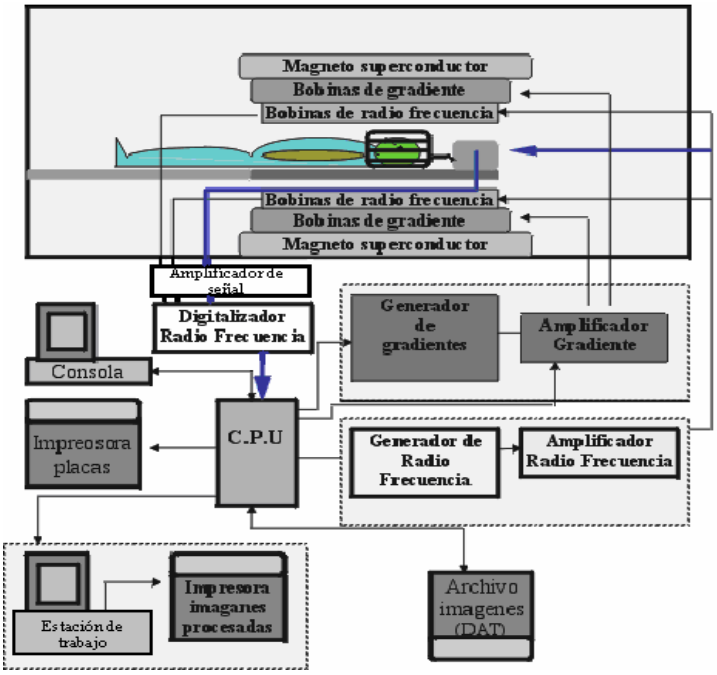


Figura I.9: Diagrama en bloques de los distintos componentes de un resonador clínico y las conexiones entre bloques.

Como se muestra en la Figura I.9, salvo el campo magnético $\mathbf{B_o}$ producido por el imán superconductor, el resto de los campos magnéticos utilizados tienen sus sistemas de

generación y amplificación asociados, que son controlados por la consola del equipo según la secuencia de imágenes que se va a utilizar.

Los valores de $\mathbf{B_o}$ que hoy pueden producir estos equipos de uso médico van de 0,2-3 T en la práctica clínica a 4-9.4 T[11-12] en investigación. Los bobinados de alto campo están hechos de aleaciones que adquieren el estado de superconductor a temperaturas entre 5 y 25 K, por lo cual deben mantenerse sumergidos en helio líquido.

Las bobinas de gradientes utilizadas en los sistemas superconductores van montadas dentro del magneto superconductor "coaxialmente" al mismo. Estas bobinas son utilizadas en la etapa de selección de planos tomográficos y durante la codificación espacial de la señal de RMN. Se utilizan tres bobinas, cada una de las cuales genera un gradiente lineal de campo magnético según los ejes principales X, Y, Z (Fig. I.10).

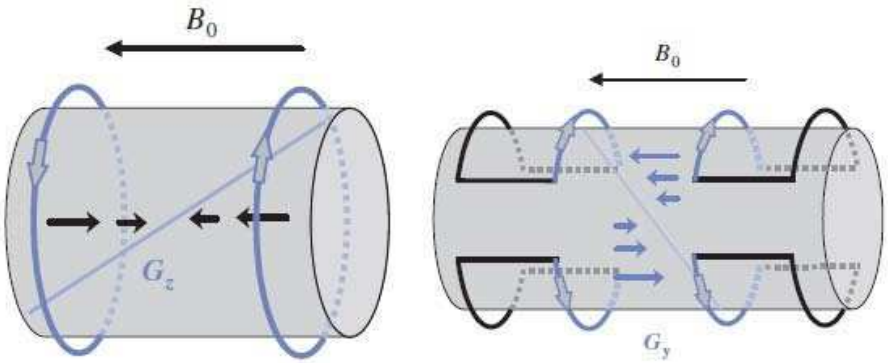


Figura I.10: Dibujo simplificado de las bobinas de gradientes Y (G_y) y Z (G_z), sus posiciones respecto del magneto superconductor y la dirección del gradiente magnético que generan respecto de B_o. Estas bobinas son concéntricas e internas al magneto principal. La bobina de gradientes de X es similar a la Y, solo que rotada 90ª.

Las **bobinas de RF** son utilizadas durante las etapas de transmisión y recepción de los pulsos de RF. Estas pueden estar fijas dentro del resonador (bobina de cuerpo o "body") o ser externas (removibles para cada estudio particular), como las bobinas de cerebro, columna, rodilla, hombro, corazón, abdomen, etc. La señal de RF medida es amplificada, digitalizada y guardada en memoria para el procesamiento posterior.

En general todos los centros de resonancia tienen además una computadora (tipo "estación de trabajo") para el procesamiento de imágenes y estudios que requieran de un trabajo de procesamiento particular, como es el caso de reconstrucciones de imágenes de 3D, angiografías, resonancia magnética funcional, espectroscopia, etc.

I.4 Generación de imágenes por IRM

I.4.1 Gradientes en IRM. Generación de los cortes anatómicos

La creación de imágenes por RM se basa en la combinación de pulsos de RF y gradientes de campo magnético a tiempos bien definidos para establecer la rotación ordenada de los espines en regiones específicas (generando cortes anatómicos) y codificar los espines para establecer su ubicación en el espacio[13-14].

La ubicación y el tamaño del corte anatómico de una imagen se consiguen a través de la combinación de pulsos de gradientes y de RF. Así, un gradiente lineal de campo magnético en la dirección X hace que el campo magnético dependa de la coordenada ***x*** y por lo tanto la frecuencia de resonancia de los espines está vinculada a su posición a través de

$$\omega(x) = \gamma\, B(x) = \gamma\, B_o + \gamma\ \ x\, G_x \qquad \text{I.16}$$

Entonces para obtener cortes anatómicos se utilizan pulsos de RF que tienen un ancho de banda $\Delta\omega$. De este modo solo aquellos espines que estén en el intervalo de campo magnético dado por

$$\frac{\Delta\omega}{\gamma} = \Delta B$$

centrado en B_o sentirán la excitación resonante y darán señal de RM necesaria para la generación de la imagen. El ancho de banda del pulso de RF y la amplitud del gradiente de selección de corte anatómico definen el ancho del corte anatómico que dará lugar a la imagen (Fig. I.11 y Fig. I.12).

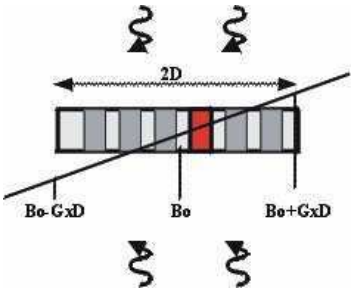


Figura I.11: Representación del único corte excitado en una secuencia de IRM. Excitando el volumen con un campo de RF de ancho de banda Δω en presencia de un gradiente lineal (G_x representado por la línea) que modifica el campo B_0, solo aquellos núcleos que se encuentren bajo un campo $\Delta\omega/\gamma = \Delta B$ percibirán el campo de RF (marcado con rojo). La combinación de gradiente y ancho de banda determina el ancho del corte anatómico.

Varios pulsos de radiofrecuencia, de distinto rango de frecuencia forman la serie de imágenes de una región (Fig. I.12).

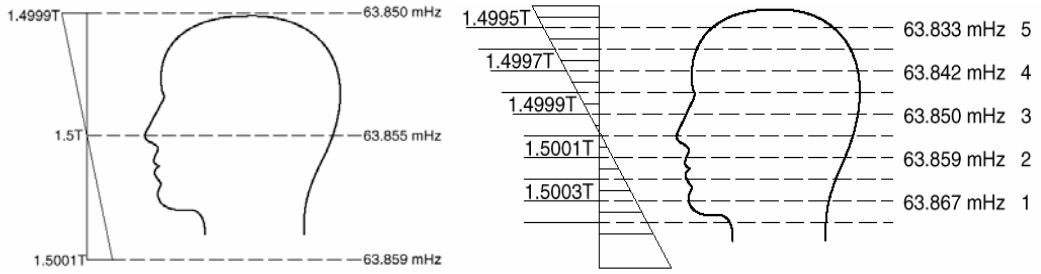


Figura I.12: Gradiente lineal y frecuencia de resonancia asociada a cada campo magnético para el núcleo de ^{1}H a 1,5T. Distintas frecuencias de RF producen excitación y rotación de los núcleos dentro de ciertos valores de campo magnético, generando así imágenes de las distintas regiones anatómicas.

Una de las características que hacen a la IRM única es su capacidad de hacer cortes oblicuos, esto es, cortes angulados respecto de los ejes X, Y y Z del resonador. Esto se consigue fácilmente dado que los gradientes que las distintas bobinas generan se pueden sumar linealmente para producir un gradiente de dirección arbitraria.

I.4.2 Formación de la imagen.

La obtención de imágenes bidimensionales por IRM se basa en la aplicación de una secuencia de pulsos de RF y gradientes a los núcleos que fueron rotados dentro de un corte anatómico de interés. Existe en IRM una amplia variedad de secuencias que permiten resaltar distintas características de los tejidos que se están estudiando. En lo que sigue se expone una breve descripción de los mecanismos de codificación espacial de la señal de RMN que se aplican en todas las secuencias para la obtención de IRM bidimensionales.

Es importante resaltar que en IRM la codificación de la señal magnética que se mide es una codificación en frecuencia (y fase), lo que la diferencia del resto de las técnicas de imágenes médicas donde la codificación es espacial. Es precisamente esta particularidad lo que le permite obtener el alto nivel de resolución espacial que la caracteriza.

Para la formación de una imagen bidimensional por IRM se necesita de una doble codificación que permita determinar la posición (x,y) de donde proviene la señal. La forma de realizar esta codificación se basa en la aplicación repetida, de dos gradientes perpendiculares de campo magnético (llamados de **fase** y **frecuencia**). Estos logran establecer en espines en posiciones distintas, frecuencias de rotación (y fase) distintas que luego se logran traducir nuevamente en coordenadas espaciales (Fig. I.13) por una transformada doble de Fourier (DFT).

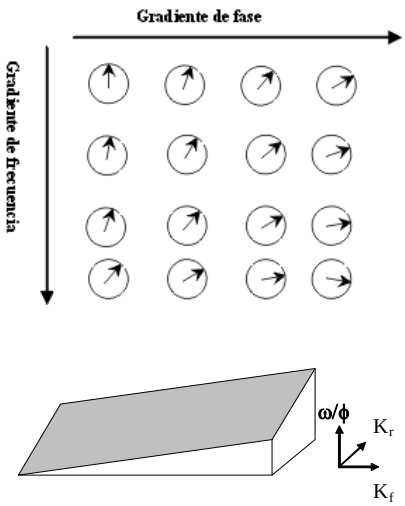


Figura I.13 Representación esquemática del efecto en la frecuencia y fase de rotación de M_O de dos gradientes perpendiculares. Dependiendo de la posición espacial en el corte anatómico, los momentos magnéticos M_O de cada voxel rotan a diferentes frecuencias. Estos dos gradientes permiten relacionar posiciones espaciales a través de frecuencias y fases. Sucesivas adquisiciones variando la amplitud del gradiente de fase permiten luego reconstruir la imagen del corte anatómico por medio de una doble transformada de Fourier**.** (K_f y K_r representan a los gradientes de fase y frecuencia (o lectura), ω/ϕ la frecuencia/fase de rotación/adquirida de los espines.

Así, una secuencia para la generación de una imagen por RM consiste en adquirir, para un mismo corte anatómico, varias señales de RM (típicamente entre 128 y 512) con la única modificación que las amplitudes del gradiente de fase (y por lo tanto la fase adquirida por los espines) sean diferentes. La señal que las bobinas receptoras miden por la rotación de M_{xy} es digitalizada (típicamente se utiliza una digitalización entre 128 y 512 valores) para completar lo que se conoce como el espacio K (Fig. I.14).

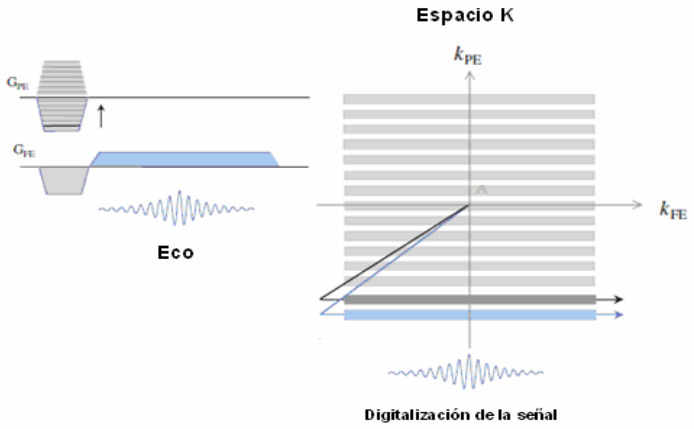


Figura I.14: Representación de la adquisición del espacio K para la generación de una imagen por RM. Además del campo de RF y del gradiente de localización del corte anatómico se necesitan dos gradientes más, el de fase (G_{PE}, de distintas amplitudes) y el de frecuencia (G_{FE}). Estos dos gradientes permiten definir el espacio K. Este espacio se va completando, línea por línea (cada línea es una amplitud de G_{FE} distinto) con los valores digitalizados de la señal. (k_{PE} y $k_{FE,}$ son los vectores del espacio K de fase y frecuencia respectivamente).

Las secuencias de IRM "son repetitivas" en el sentido que, para obtener una imagen de un corte anatómico, se repite la misma secuencia de pulsos de RF y gradientes con la única diferencia que solo se modifica la amplitud del gradiente de fase. El tiempo entre pulsos de RF se conoce como *tiempo de repetición* (TR).

Dos son las secuencias originales y las que primero se utilizaron en IRM, la secuencia espín-eco (SE) y la gradiente-eco (GE). En ambas secuencias la señal que se mide empieza a crecer, alcanza un máximo (el "eco") y luego decae. El tiempo desde el pulso de rotacion de RF al máximo de señal (eco) se conoce como *tiempo de eco* (TE). TR y TE son dos de los parámetros fundamentales en IRM ya que modificándolos se obtienen distintos contrastes de los tejidos. Finalmente la imagen se obtiene mediante una transformada de Fourier bidimensional de este espacio K (Fig. I.15).

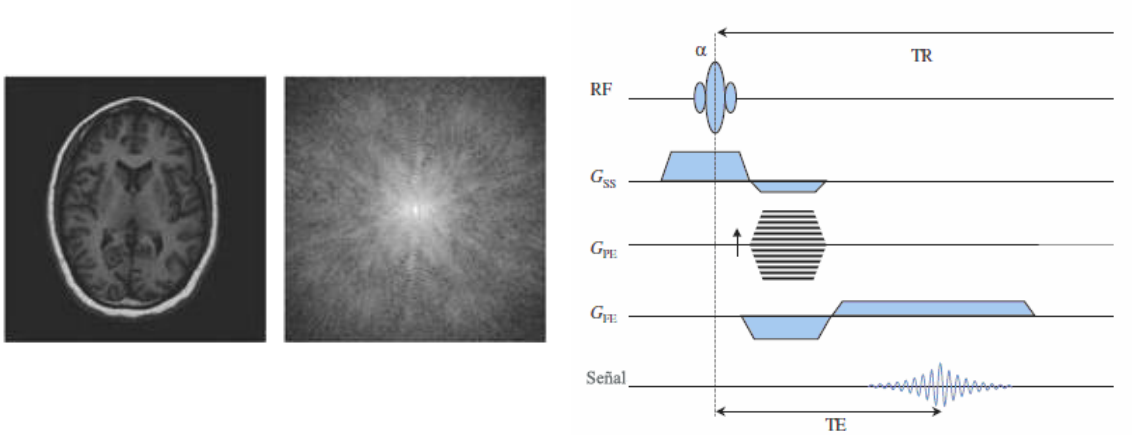


Figura I.15: Izq) Imagen T_1 de cerebro de un corte anatómico y su espacio K asociado. Der) Representación gráfica completa de una secuencia GE donde se representan los tiempos de encendido del pulso de RF, de los distintos gradientes y el eco medido. En particular, la amplitud del G_{PE} varía de un máximo a un mínimo en diferentes pasos de amplitud fija. RF: radio frecuencia; G_{ss}: gradiente de selección de corte anatómico; $G_{PE:}$ gradiente de fase; G_{FE}: gradiente de frecuencia; TR: tiempo de repetición; TE: tiempo de eco.

Como se verá en el próximo capítulo, la obtención de espectros monovoxel por RM se basa en principios similares, ya que a través de gradientes y campos de RF, se define un volumen (voxel) de interés y se excita únicamente a los espines ubicados en el interior de ese voxel. Sin embargo, en esas secuencias **no existe una codificación espacial de la señal.**

I.4.3 Imágenes de IRM cerebrales

En IRM, además de la posibilidad de adquirir imágenes con distintas angulaciones y alta resolución espacial por la codificación en frecuencias y fase que se realiza, existe la posbilidad de obtener una gran variedad de contrastes entre los tejidos o sustancias que se encuentran dentro del corte anatómico que se estudia[15]. Esto se origina por la gran

versatilidad de modificar pulsos de RF y gradientes, los distintos valores de TR y TE posibles y por la amplia posibilidad de combinarlos en las secuencias. Así, un estudio de IRM por lo general consta de varias imágenes con distintos tipos de contraste para un mismo corte anatómico.

Tomando como base las dos primeras secuencias que se utilizaron en IRM, la SE (espín-eco) y la GE (gradiente-eco), las sucesivas mejoras en hardware y software en los resonadores llevó al desarrollo de múltiples secuencias, que no son mas que modificaciones y combinaciones de las SE y GE, que permiten obtener imágenes con nuevos contrastes y adquirirlas en tiempos mas cortos (Fig. I.16).

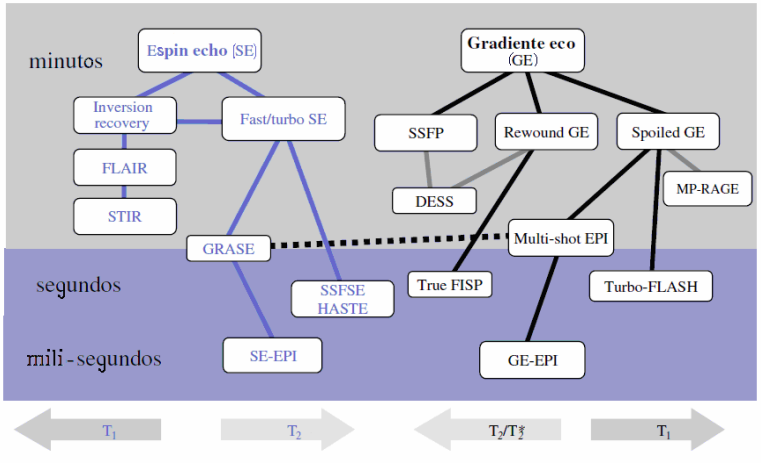


Figura I.16 Grupo de secuencias de IRM que permiten generar imágenes con distintos contrastes, derivadas de las dos secuencias básicas, SE y GE. Las secuencias del grupo de las SE son imágenes con mejor calidad de contraste, son secuencias más lentas y depositan más energía en los tejidos. Son de destacar la FLAIR y la FastSE por el excelente contraste que muestran del tejido edemetizado en lesiones cerebrales. Las secuencias del grupo GE son secuencias más rápidas y depositan menos energia en los tejidos. Del grupo de las GE son de destacar la GE-EPI por ser la base de las secuencias de perfusion, difusion y funcional, la Spoiled GE por ser la secuencia que originan las imagenes con contraste T_1 de alta resolucion y la GE básica por determinar regiones de mala homogeneidad y sangrado. (Modificado de ref 15).

En particular, en un estudio de IRM de cerebro se realizan un conjunto de secuencias que brindan tanto información anatómica como fisiológica de los tejidos. Así, es común obtener imágenes potenciadas en T_1 con y sin contraste, T_2 y T^*_2, FLAIR[16], difusión[17] y perfusión[18], donde todas dan algún tipo de información particular y complementaria para ayudar a establecer un diagnóstico (Fig. I.17).

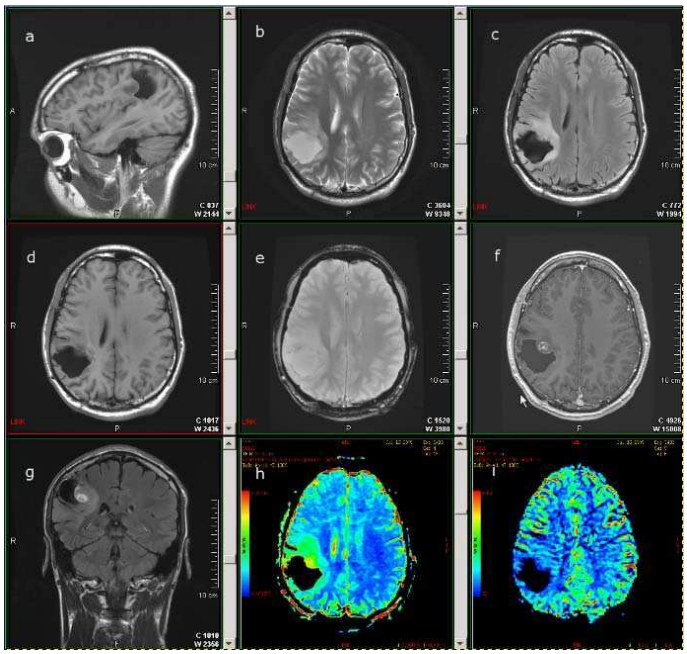


Figura I.17 Grupo de imágenes de un estudio de cerebro de un tumor post-cirugía, donde se ven imágenes potenciadas en T_1 en sagital (a) y axial (d), T_2 (b), FLAIR en coronal (g) y axial (c), GE (e), T_1 con contraste (f) y estudios funcionales de difusión DWI (h) y perfusion T_2 (i) donde cada imagen brinda algún tipo distinto de informacion sobre el estado de la lesión (tumor).

Referencias

[1] Robert Resnick **Física Vol. 2** 6ta impresión *Compañía Editorial Continental* Pág. 551-552 (1999)

[2] Tubridy N, McKinstry CS **Neuroradiological history: Sir Joseph Larmor and the basis of MRI physics**. *Neuroradiology.* Nov;42(11):852-5. (2000)

[3] Leslie Ballentine **Quantum Mechanics**. Chapter 12 *World Scientific* 2003

[4] J. W. Akitt ***NMR and Chemistry*** Ed. Chapman and Hall, 1992

[5] Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. **Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid**. Phys Rev;69:37-8 (1946).

[6] Bloch F, Hansen WW, Packard M**. Nuclear Induction**. *Phys Rev* ;69:680 1946)

[7] Bloch F. **Nuclear Induction**. *Phys Rev*;70:460-74 (1946)

[8] Bloembergen N, Purcell EM, Pound RV. **Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption**. *Phys Rev*;73:679-712 (1948)

[9] Robin A. De Graff **In Vivo NMR Spectroscopy** Cap 1 y 4 2nd Edition Principles and Techniques John Wiley & Sons (2007)

[10] Solomon I. **Relaxation processes in a system of two spins**. *Phys Rev* **99**, 559–565 (1955).

[11] Xiaoping Wu, J. Thomas Vaughan, Kâmil Uğurbil, Pierre-François Van de Moortele **Parallel excitation in the human brain at 9.4 T counteracting k-space errors with RF pulse design** *Magnetic Resonance in Medicine* Feb 63,2, pages 524–529, (2010)

[12] Juliane Budde, G. Shajan, Jens Hoffmann, Kâmil Uğurbil, Rolf Pohmann **Human imaging at 9.4 T using T2*-, phase-, and susceptibility-weighted contras**t *Magnetic Resonance in Medicine* Feb 65, 2, pages 544–550, (2011)

[13] E. Mark Haacke Robert W. Brown , Michael R. Thompson , Ramesh Venkatesan **Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design** J. Wiley & Sons, (1999)

[14] Zhi-Pei Liang Paul C. Lauterbur **Principles of Magnetic Resonance Imaging: A Signal Processing Perspective** IEEE Biomedical Enginniering (2000)

[15] Donald W. McRobbie Elizabeth A. Moore Martin J. Graves and Martin R. Prince **MRI From Picture to Proton** Cap. 12 2da edicion Cambridge University Press (2006)

[16] Rydberg JN, Riederer SJ, Rydberg CH, Jack CR. **Contrast optimization of fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) imaging.***Magn Reson Med*. Dec;34(6):868-77 (1995)

[17] Hagmann P, Jonasson L, Maeder P, Thiran JP, Wedeen VJ, Meuli R. **Understanding diffusion MR imaging techniques: from scalar diffusion-weighted imaging to diffusion tensor imaging and beyond** *Radiographics.* Oct;26 Suppl 1:S205-23 **(**2006**)**

[18] Keston P, Murray AD, Jackson A**. Cerebral perfusion imaging using contrast-enhanced MRI.** *Clin Radiol*. Jul;58(7):505-13. (2003)

Capítulo II

Espectroscopia por resonancia magnética nuclear

II.1 Introducción

La técnica de IRM se ha consolidado en los últimos años en el diagnóstico médico clínico por la excelente resolución y contraste de sus imágenes. Pero históricamente, no fueron las imágenes la primera aplicación de la RMN, ya que tras la observación del fenómeno de resonancia magnética nuclear en 1946 por los grupos de Stanford y Harvard, liderados respectivamente por F. Bloch[1] y E.M. Purcell[2], numerosos equipos de investigación comenzaron a realizar espectros de RMN con núcleos de ^{1}H, ^{31}P, ^{13}C, ^{23}Na, etc. Estos estudios fueron el inicio de la **espectroscopia por resonancia magnética nuclear (ERM)**. Rápidamente los químicos incorporaron esta técnica como una metodología rutinaria para el análisis estructural de moléculas.

A comienzos de la década del 80 empezaron a ser comercializados los primeros resonadores con aplicaciones tomográficas, y desde entonces el mayor esfuerzo se ha puesto en el desarrollo de técnicas de obtención de imágenes por RM, de tal forma que el desarrollo de la espectroscopía por resonancia magnética “in vivo” fue parcialmente relegada.

No obstante, el desarrollo de sistemas de alto campo magnético (1.5-8 Tesla), posibilitó un nuevo e interesante campo de estudio al permitir obtener espectros “in vivo” de distintos núcleos con suficiente resolución y sensibilidad[3-4-5]. La posibilidad que ofrece la ERM de estudiar de modo no invasivo algunos procesos metabólicos "in vivo", sin interferir en los procesos que originan estos metabolitos, es lo más apreciado de la espectroscopia clínica.

II.2 Principios básicos de espectroscopía magnética nuclear

II.2.1 Introducción

La ERM se fundamenta en que el campo magnético efectivo $\mathbf{B_{ef}}$ al que se encuentra expuesto un núcleo es la suma del

1- **Campo magnético principal producido por el imán (superconductor) y**

2- **Las pequeñas variaciones de campo magnético producidas por el entorno químico en que se encuentra el núcleo.**

Esto significa que la **frecuencia** de resonancia de un núcleo en particular depende del

"entorno magnético" en el que se encuentra, por lo tanto de su ubicación en la molécula[6]. Así, distintos núcleos de ^{1}H pueden estar sometidos a diferentes entornos electrónicos por estar ubicados en diferentes posiciones dentro de una molécula. Estos diferentes entornos electrónicos crean pequeñas diferencias en el campo magnético principal $\mathbf{B_o}$ sobre cada uno de los núcleos y, por consiguiente, cada ^{1}H dentro de la molécula estará caracterizado por una frecuencia de resonancia diferente. Del mismo modo, si dos núcleos de ^{1}H tienen un entorno electrónico similar, entonces tendrán similar frecuencia de resonancia.

II.2.2 Desplazamiento químico

La escala de valores en el eje de las frecuencias depende evidentemente del valor del campo magnético, a mayor campo $\mathbf{B_o}$, mayores son las frecuencias de resonancia de los núcleos (y las diferencias entre ellas). Esto es un inconveniente cuando hay que comparar espectros obtenidos con diferentes intensidades de campos (por ejemplo, 1 T, 3 T, 11 T). Para eliminar esta dependencia y lograr que los espectros adquiridos con imanes de diferente campo magnético sean comparables, se definen las posiciones de las distintas resonancias mediante una escala relativa denominada "**desplazamiento químico**".

Si $\mathbf{f_r}$ es la frecuencia de resonancia de un núcleo que se toma como referencia, cualquier otra frecuencia ($\mathbf{f_A}$) puede expresarse mediante su desplazamiento químico definido por

$$Despl.Químico = \frac{(f_r - f_A)}{f_r} \times 10^6$$

El desplazamiento químico es un valor adimensional que se expresa en partes por millón (**ppm**). La escala de desplazamiento químico permite establecer a veces una relación biunívoca entre posición y grupo químico o sustancia, que facilita la identificación de los diferentes compuestos presentes en la muestra analizada, independientemente del campo magnético en que se obtuvo el espectro.

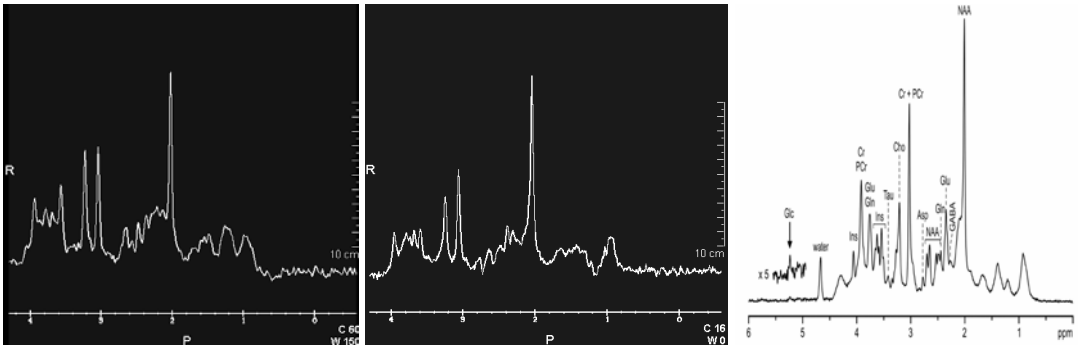


Figura II.1: Espectros de cerebro obtenidos en resonadores clínicos de 1.5 T (izq), 3T (cent) y 7T (der)[7], donde se observa la mejora en la resolución de los distintos metabolitos.

Si bien en términos de ppm los núcleos de una misma sustancia "resuenan" a valores definidos, a mayor amplitud de campo $\mathbf{B_o}$, la separación (en Hz) entre picos aumenta, lo que permite mejorar la resolución de los distintos picos de las diferentes sustancias de la muestra (Fig. II.1).

II.2.3 Acoplamiento espín-espín

Los núcleos con espín distinto de cero dentro de una molécula pueden interaccionar entre sí transmitiendo la información de su estado de espín por medio los electrones de los enlaces[8]. A este fenómeno se lo llama acoplamiento espín-espín y define un tipo de interacción en el cual los espines de los núcleos vecinos, no necesariamente del mismo tipo, afectan los niveles de energía del núcleo estudiado y producen desdoblamientos de las resonancias de este núcleo causando que un único pico se divida en varios picos (multiplete).

La separación entre las líneas de un multiplete se denomina constante de acoplamiento **J**, su valor es independiente del campo magnético y normalmente se expresa en hertzios (Hz). La magnitud de esta constante depende principalmente de la constante giromagnética de los núcleos acoplados, del tipo y número de enlaces químicos, de la electronegatividad de los átomos y grupos cercanos y de la geometría de los enlaces involucrados; y puede variar entre unos pocos a centenas de Hz. Si bien los espectros de RMN de ^{1}H de la mayoría de las sustancias presentan este tipo de acoplamiento, a veces no es posible observar el desdoblamiento por la imposibilidad de "resolver" picos muy próximos. Este efecto es particularmente notorio en el caso de los espectros clínicos en que las líneas son anchas (Fig. II.2). Sin embargo el lactato (Lac) y la alanina (Ala) son dos sustancias donde el acoplamiento espín-espín se resuelve muy bien en la ERM clínica.

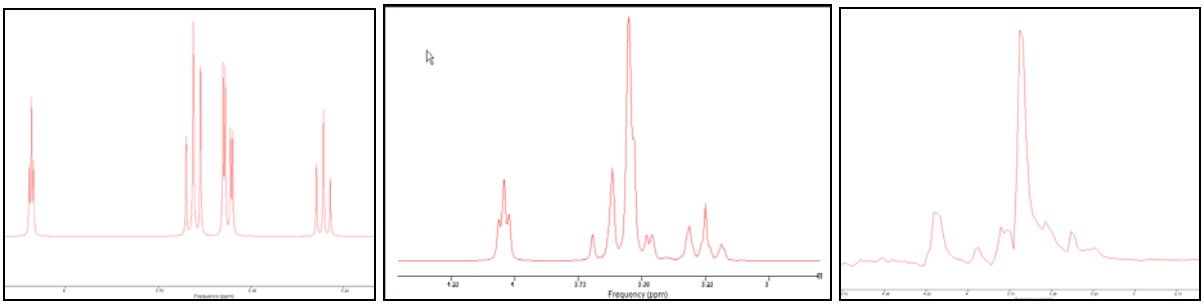


Figura II.2: Espectros medido de Mio-inositol (Mio) a 14 T (izq), simuladoa 3 T con un ancho de línea de 5 Hz (centro) y medido a 3 T (der) en un resonador clínico. Los distintos multipletes originados en el acoplamiento espín-espín se ven bien definidos y totalmente resueltos a 14 T pero no a 3 T. El espectro medido en el resonador clínico muestra una pérdida de resolución adicional debida a la mayor inhomogeneidad de B_o.

II.3 Espectroscopia clínica por resonancia magnética

El primer paso para adquirir un espectro con un resonador clínico consiste en adquirir una serie de imágenes que servirán para determinar la posición y el tamaño del voxel donde se desea obtener el espectro. Actualmente, los equipos permiten realizar distintos tipos de espectros, de un solo volumen (monovoxel) o de más de un voxel (multivoxel). En lo que respecta al monovoxel, los equipos permiten modificar el tamaño del voxel. El valor estandarizado es de 2x2x2 (8 cm^3), pero es posible agrandarlo o achicarlo para ajustarlo mejor a la región de interés.

En lo que sigue se presentan los "ítems" mas importantes a tener en cuenta en la obtención de un espectro clínico monovoxel como los utilizados en este trabajo.

II.3.1 Homogeneización del campo magnético y cancelación de la señal del agua.

Los tejidos y los órganos de las personas presentan diferencias en la susceptibilidad magnética que alteran la homogeneidad del campo magnético principal $\mathbf{B_o}$ (en general medido en partes por millón (ppm)). Cuando estas diferencias de susceptibilidad se producen dentro del volumen donde se quiere realizar el espectro, los núcleos de una molécula presentarán diferentes frecuencias de resonancia según sea la posición en la que se encuentre cada molécula en el voxel. Como resultado de esta inhomogeneidad del campo B_o dentro del voxel, el ancho de los picos en los espectros de resonancia aumenta (el ancho a mitad de altura está dado por $1/(\pi T_2^*)$ perdiéndose resolución, disminuyendo la relación señal-ruido (SNR, signal-to-noise ratio) y por lo tanto la calidad del espectro (Fig. II.3).

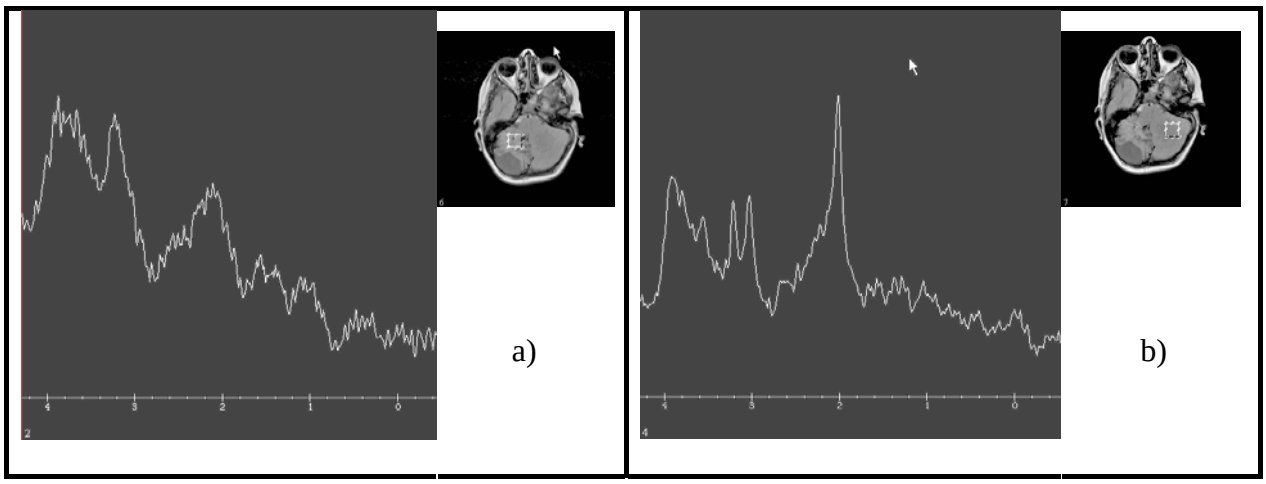


Figura II.3: Espectros de distintos tejidos pero en regiones anatómicas similares (imágenes laterales donde se muestra la ubicación del voxel) donde se puede ver las consecuencias de una mala homogeneización del campo B_o previo a la adquisición del espectro. a) Mala homogeneidad sobre el tejido lesional b) buena homogeneidad sobre tejido contralateral.

Para conseguir una adecuada homogeneidad de campo magnético los resonadores están equipados con un conjunto de bobinas, llamadas bobinas de “shimming”, que generan un conjunto de campos magnéticos armónicos[9-10]. La corriente que circula por estas bobinas se ajusta para compensar las inhomogeneidades del campo magnético principal y las que se producen por la “geometría” anatómica de la región que se está estudiando. Independientemente del núcleo a adquirir, este proceso de homogeneización se realiza antes de la obtención de un espectro y se realiza siempre con la señal espectral del agua debido a que su intensidad permite medirla fácilmente. El procedimiento consiste en registrar sucesivos espectros de protones mientras se varían las corrientes de “shimming” hasta que el ancho de la resonancia del agua es mínimo (o la altura del pico es máxima). En general los equipos lo realizan de manera automática en un tiempo breve con resultados suficientemente buenos, aunque es posible hacerlo manualmente. Conseguir una buena homogeneidad del campo magnético es un paso clave para obtener un espectro de calidad.

Una vez determinada la ubicación y el tamaño del voxel y realizada la homogeneización del campo en el voxel se puede empezar la adquisición del espectro según la secuencia deseada. Un factor limitante al momento de realizar un espectro de ^{1}H es el agua, que tiene una concentración en los tejidos varias veces mayor que la de los metabolitos de interés. El agua intracelular puede estar en una concentración que, dependiendo del tejido, puede oscilar entre 40 y 55 M mientras que la concentración de los metabolitos de interés biológico es de 1-3 mM, una diferencia de más de 4 órdenes de magnitud. Si la señal que proviene de las moléculas del agua cuando se realiza un espectro de ^{1}H no sé cancela o se cancela mal, el espectro que se obtiene tiene poca utilidad ya que muchas de las señales de los metabolitos de interés quedarán enmascaradas (Fig. II.4).

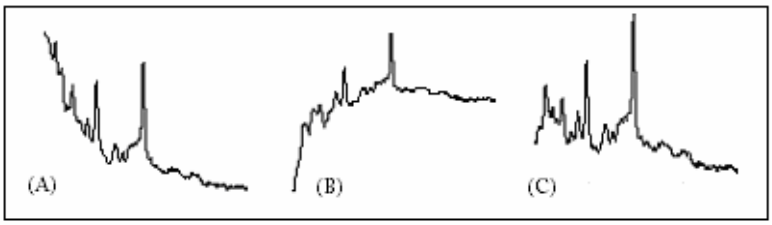


Figura II.4: A) y B) Espectros con una mala cancelación del agua C) espectro con una cancelación del agua adecuada. Claramente se observa como varios picos de algunas sustancias quedan ocultos por la mala cancelación del agua.

Es por eso que la mayoría de los protocolos de medición de espectros comienzan con secuencias de cancelación de agua. Todas estas secuencias, salvo pequeñas variaciones, lo que hacen es aplicar varios pulsos de RF que solo afectan a los núcleos de ^{1}H del agua (pulso

de 90º o más), para luego aplicarles un gradiente que desfasa los espines[11]. Mientras los núcleos de ^{1}H del agua tienen sus espines desfasados (en conjunto no dan señal), a la región de interés (voxel) se le aplica la secuencia de excitación elegida (Fig. II.5).

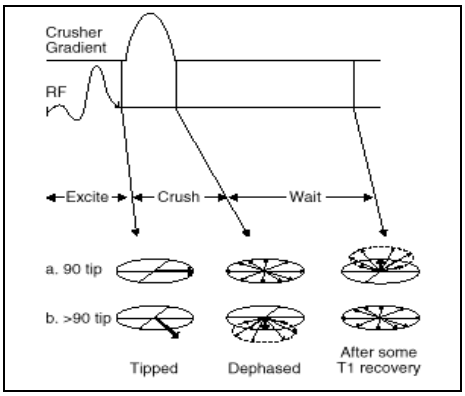


Figura II.5: Secuencia de cancelación del agua. Se rota con un pulso de RF mayor de 90º solo los protones del agua y se aplica un gradiente desfasador. Como resultado, el agua no emite señal**,** de *Manual for MRI and MRS Applications General Electric (2001).*

II.3.2 Secuencias de espectroscopia clínica

Dos son las secuencias mayormente utilizadas para ERM clínica que permiten definir el volumen (voxel) de adquisición. Estas secuencias son:

- **STEAM:** (**ST**imulated **E**cho **A**cquisition **M**ethod) y
- **PRESS:** (**P**oint **RE**solved **S**pectroscopy).

Estas dos secuencias se basan principalmente en definir por medio de gradientes, el volumen donde se quiere realizar el espectro. Al mismo tiempo que se aplican los gradientes, se aplican pulsos de RF específicos que solo afectan a los núcleos dentro de una región particular del gradiente. De la combinación de 3 gradientes perpendiculares se selecciona el voxel (Fig. II.6).

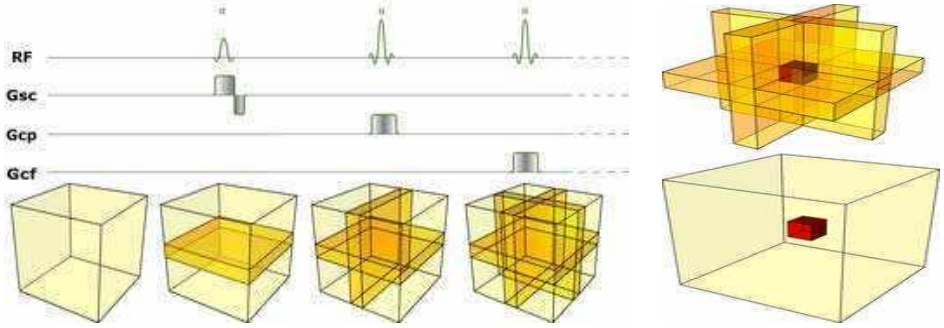


Figura II.6: Construcción del voxel a través de combinación de pulsos de RF y gradientes perpendiculares que lo van definiendo. La misma secuencia "trabaja" sobre los espines para producir la señal que se mide.

La secuencia STEAM[12] (Fig. II.7) consiste de

- 3 pulsos de RF de 90º que combinados con los 3 gradientes perpendiculares definen el voxel. La secuencia necesita además de otros gradientes para romper la coherencia (señal) de ciertos espines que no son del volumen de interés.

Esta secuencia tiene un tiempo TM, en el cual un grupo de los espines es desfasado (anulados) después del segundo pulso de RF de 90º y se mantiene lo mas corto posible. La secuencia tiene, en relación a la secuencia PRESS, una peor relación señal ruido (la mitad), aunque por sus características es la recomendada para tiempos TE cortos, ya que define mejor los metabolitos de T_2 cortos (20-60 ms). Esta secuencia también define mejor los bordes del voxel y para un voxel grande requiere menos energía de RF que la secuencia PRESS.

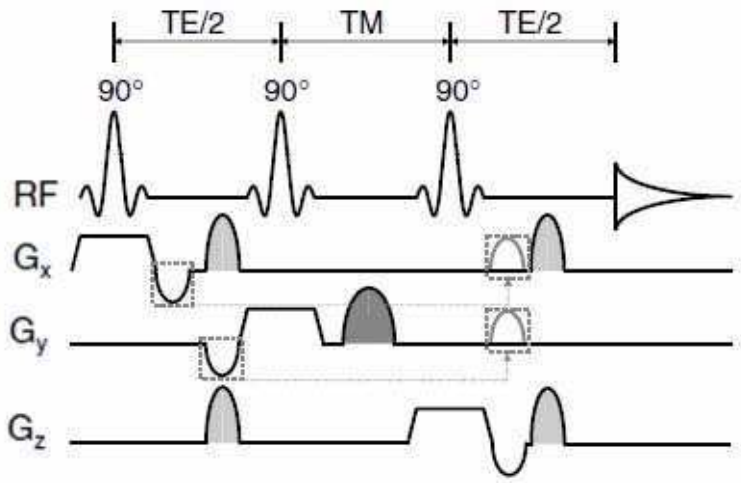


Figura II.7: Representación básica de la secuencia STEAM. Esta consta de 3 pulsos de excitación de 90º combinados con gradientes (trapezoides) que definen el voxel. Los gradientes en gris son de desfase de espines no deseados**.**

La secuencia PRESS[13] (Fig. II.8) consiste de

- un pulso inicial de 90º seguido de dos de 180º y los 3 pulsos de gradientes para definir el voxel, además de otros para romper la coherencia de ciertos espines que no son del volumen de interés.

Esta secuencia tiene una peor definición de bordes que la secuencia STEAM y es la secuencia preferida para adquirir espectros con tiempos TE largos.

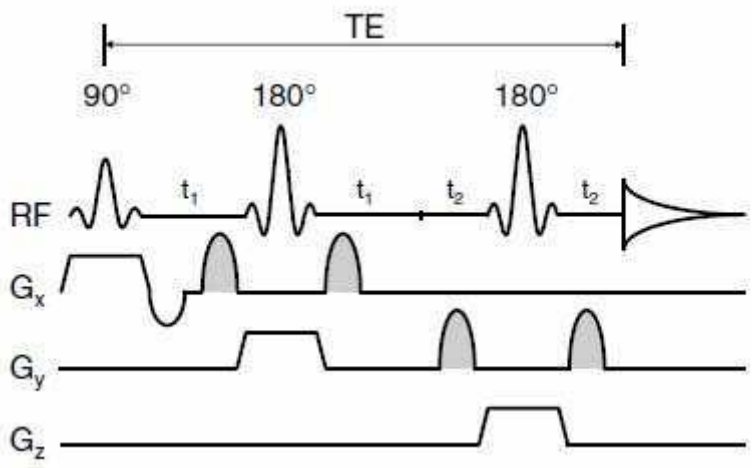


Figura II.8: Representación básica de la secuencia PRESS. Esta consta de 1 pulso de excitación de 90º seguido con dos pulsos de 180º combinados con gradientes que definen el voxel. Los gradientes pintados de gris son de desfase de espines no deseados**.**

La combinación de las secuencias PRESS o STEAM con gradientes que permiten codificar la ubicación espacial de donde proviene la señal (similar a lo que se hace para adquirir una imagen de IRM) genera lo que se conoce como C**SI** (Chemical Shift Image) o MRSI (Magnetic Resonance Spectrocopy Imaging) o espectro multivoxel en el cual se obtiene un conjunto de espectros localizados que abarcan parte de un corte anatómico[14-15] (Fig. II.9).

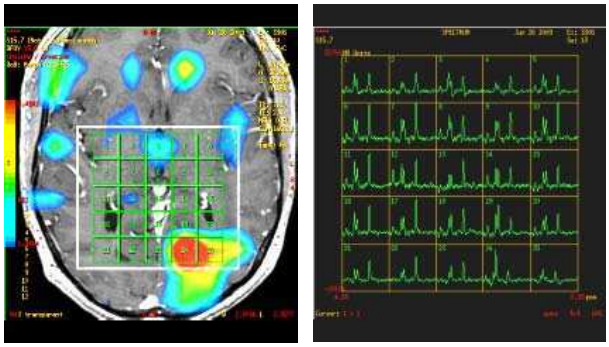


Figura II.9: RMSI-CSI integrada a un corte anatómico que permite ver la distribución de los distintos metabolitos de un espectro que se obtienen de una región extensa de tejido**.**

II.3.3 Parámetros relevantes en la adquisición de espectros clínicos

En lo que sigue, se presentan los parámetros que se pueden modificar en la adquisición de un espectro de ^{1}H en un equipo clínico con especial énfasis en las posibles modificaciones que aparecerán en el espectro al variarlos. En un espectro monovoxel, los cuatro parámetros más importantes son:

1- Secuencia de adquisición

Como se describió, existen dos secuencias distintas (STEAM y PRESS), en general se utiliza la secuencia STEAM para tiempos TE cortos (20 a 60 ms) y voxels grandes por la energía

que se deposita en el voxel. La secuencia PRESS es para voxel estándar (2x2x2 cm - 8 cm^3 o en ocasiones de 1,5x1,5x1,5 cm) y tiempos TE largos (30 a 270 ms por ejemplo). Por el diseño de la secuencia, la SNR es el doble con PRESS que con STEAM.

2- Cantidad de adquisiciones

En todo proceso de medición (digitalización), la acumulación de adquisiciones aumenta la SNR. La SNR se incrementa como la raíz cuadrada del número de adquisiciones (N).

$$S / R \propto \sqrt{N}$$

Es por esto que al aumentar el número de adquisiciones se mejora la capacidad de diferenciar los picos del ruido de base que tiene toda señal (Fig. II.10).

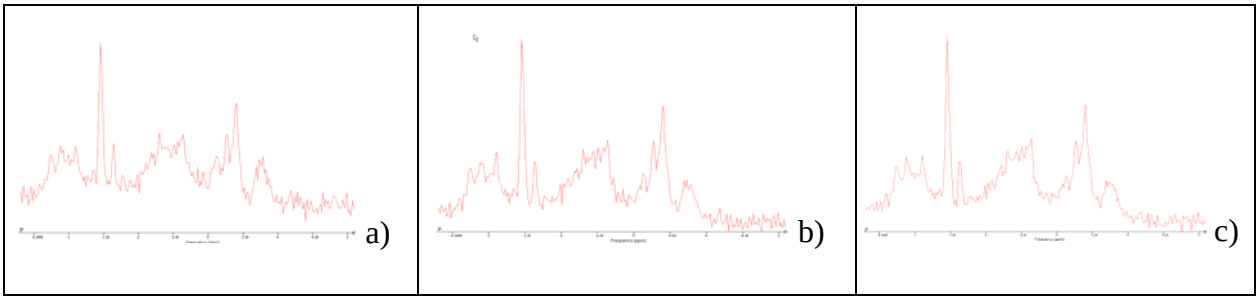


Figura II.10: Espectros clínicos de un mismo voxel con distinta cantidad de adquisiciones (a) 62 (b) 128 (c) 192 donde se observa mejora en la SNR al aumentar la cantidad de adquisiciones.

3- Tamaño de voxel

La señal que se obtiene del voxel en ERM depende de la concentración de las sustancias que se encuentren dentro del voxel (Fig. II.11). Es claro también que a mayor tamaño mayor señal (Fig. II.12).

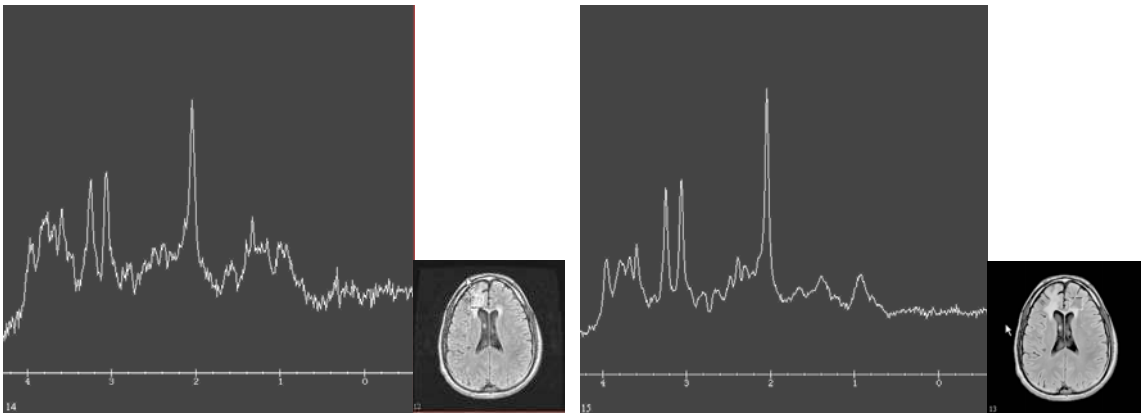


Figura II.11: Espectros sobre lesión (izquierda) y tejido sano (derecha) con el mismo tamaño de voxel y cantidad de adquisiciones. Se aprecia la caída de SNR sobre la lesión por la disminución de la densidad del tejido.

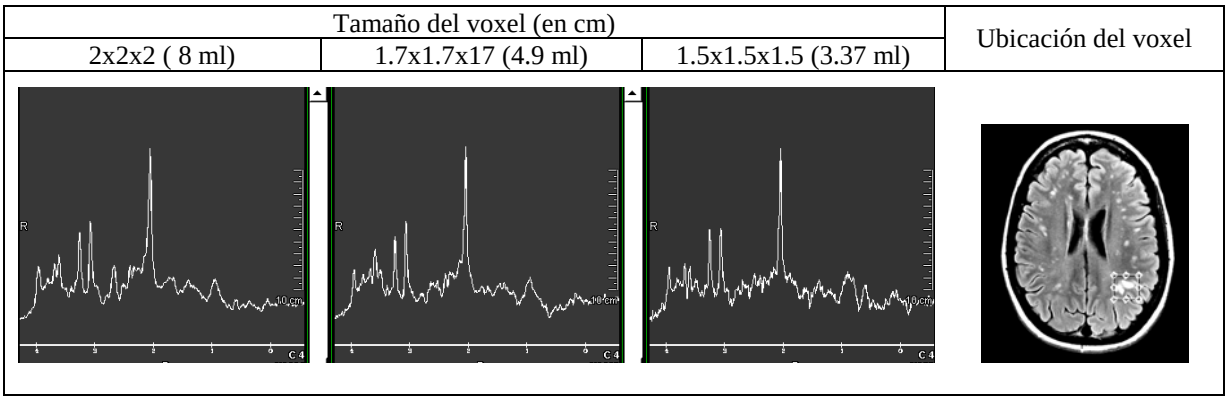


Figura II.12 Espectros sobre una lesión con distintos tamaños de voxel (en cm) e igual número de adquisiciones (128) donde se aprecia la caída de SNR y cambios en el espectro.

A esto se le contrapone que muchas veces la ubicación del voxel no permite aumentar el tamaño por:

- Cercanía a regiones que no dan señal por falta de tejido, que a su vez inhomogeneizan el campo dentro del voxel desmejorando el espectro o
- Se adquiere señal de tejido no patológico que va a ocultar la concentración del patológico (volumen parcial). por lo que se debe achicar el voxel para ajustarlo al tamaño de la lesión.

La siguiente tabla compara los tiempos de adquisición (proporcionales a la cantidad de adquisiciones) necesarios para tener relaciones de SNR similares con tamaños de voxel diferentes (TR 1500 ms).

Tamaño de voxel	Señal	Adquisiciones	Tiempo
1 x 1 x 1 cm3 (1 mL)	**1/8 = 0.125**	**4096**	**1 h 42 m 24 5**
2 x 2 x 2 cm3 (8 mL)	**1**	**64**	**1 m 36 5**

El valor de 4096 adquisiciones se obtiene teniendo en cuenta que la SNR es proporcional al volumen del voxel y a la raíz cuadrada del número de adquisiciones.

De la tabla se ve que para adquirir igual cantidad de señal con un voxel 8 veces más chico se necesita de un tiempo impráctico para una espectroscopia clínica.

4- Tiempo de eco (TE)

El tiempo de eco es una variable importante al momento de realizar e interpretar un espectro. Todas las sustancias presentes en el voxel decaen con tiempos de relajación distintos y esto se refleja en el espectro. Como regla, con tiempos de eco (TE) cortos (30-60 ms) en el espectro se observan más sustancias aunque algunas no se logran definir bien por el

solapamiento entre los picos de todas las sustancias que resuenan. A tiempos de eco mas largos (130-270 ms) se ven menos sustancias pero mejor definidas ya que a tiempos de eco largo, muchas de las sustancias con T_2 cortos decaen totalmente y no presentan señal (Fig. II.13).

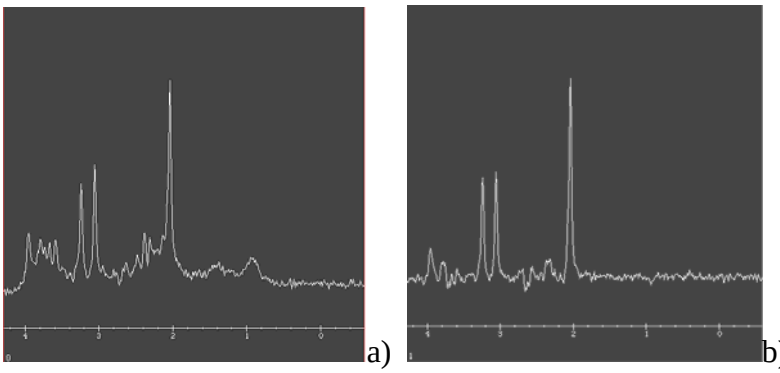


Figura II.13: Espectros de cerebro con distintos tiempos de adquisición. Utilizando un TE=30 ms (a), se ven más picos que con un TE= 130 ms (b)**.**

La elección del tiempo de eco también permite obtener a veces información extra de un espectro gracias al acoplamiento espín-espín entre núcleos. Así por ejemplo, el lactato (Lac) y la alanina (Ala), sustancias comunes en ciertos tumores y patologías cerebrales, pero no en tejido cerebral sano, aparecen como un pico doble (acoplamiento espín-espín) invertido a TE 135 ms, pero a 30 ms aparecen en fase con el resto de los picos. Junto con el Lac, a una misma frecuencia, co-existen las señales de lípidos (Lip) y macromoléculas (MM) que solapan con el Lac a 30 ms, pero a 135 ms la señal de los Lip y MM desaparecen por tener estas “sustancias” T_2 menores.

II.4 Procesamiento de la señal

La señal (FID) de los espines que están decayendo es una señal continua que se digitaliza. La adquisición de la señal se repite varias veces (número múltiplo de 2), y la señal se va acumulando (sumando) en la memoria de la CPU del sistema para aumentar la SNR.

El primer procesamiento posible de la FID consiste en:

- aplicar algún tipo de filtro para atenuar o eliminar la última parte de la FID. Esta suele ser sólo ruido ya que la señal de las sustancias ya decayó totalmente en esa parte de la FID. Estos filtros son o un filtro exponencial para disminuir el ruido final o un filtro de Lorentz-Gauss que anula el ruido final y resalta los valores medios de la FID donde se encuentra la señal de las sustancias.

- aumentar el número de puntos de la FID con datos de valor nulo. Este es un proceso complementario al anterior donde se buscaba eliminar ruido eliminando los puntos del final. Aquí se agregan datos de valor cero al final de la FID (no incorporan ruido), que mejoran la definición de las líneas del espectro.
- la aplicación de una transformada de Fourier (FFT)) que convierte la señal temporal (FID) en un espectro de las frecuencias presentes.
- Por último, se realiza una corrección de fase sobre la curva obtenida, para tener la "gráfica" del espectro con la altura de los picos, anchos de los picos, etc. El área de cada pico da una estimación de la concentración de la sustancia en el voxel (Fig. II.14)

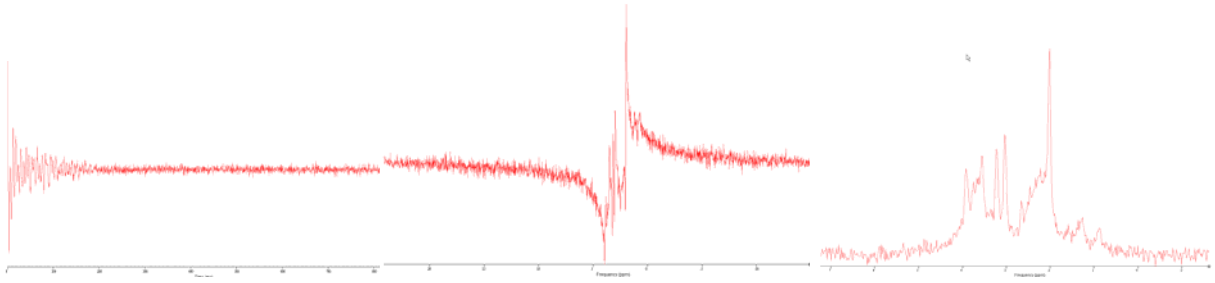


Figura II.14: FID izq.), FT cen.) y corrección de fase der.) de un espectro clínico.

II.5 Espectroscopia de alto campo

A diferencia de la espectroscopia clínica que adquiere espectros "in-vivo" de muestras de tejido "grandes" que se localizan espacialmente por secuencias diseñadas con ese fin, un resonador químico realiza espectros de muestras homogéneas más pequeñas, sin secuencias localizadoras. En estos equipos se puede trabajar con muestras líquidas, donde las sustancias están en solución en un solvente apropiado que se colocan en tubos especiales dentro del magneto. Todos los equipos de RMN permiten realizar espectros de soluciones líquidas.

Además, en algunos equipos es posible realizar espectros de muestras sólidas, son equipos que permiten agregar un cabezal especial en el cual ingresa una rotor donde se coloca un contenedor con la muestra sólida. Esta técnica de adquisición de espectros se conoce como HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning) y permite obtener espectros de RM de alta resolución de muestras sólidas gracias a la rotación de la muestra en un ángulo definido[16-17]. En este tipo de muestra, las interacciones como los acoplamientos dipolares y la anisotropía de desplazamiento químico produce un ensanchamiento espectral con una dependencia angular de ($3\cos^2\theta - 1$), donde θ es el ángulo entre el campo magnético estático y

el vector internuclear responsable de la interacción. Si se hace girar mecánicamente la muestra, a un ritmo más rápido que el ensanchamiento espectral procedentes de estas interacciones, y al ángulo "mágico" de 54,7° (que cumple el criterio de $[3\cos^2(54{,}7°) - 1 = 0]$, la contribución de estas interacciones al ensanchamiento de los picos se puede reducir significativamente (Fig. II.15).

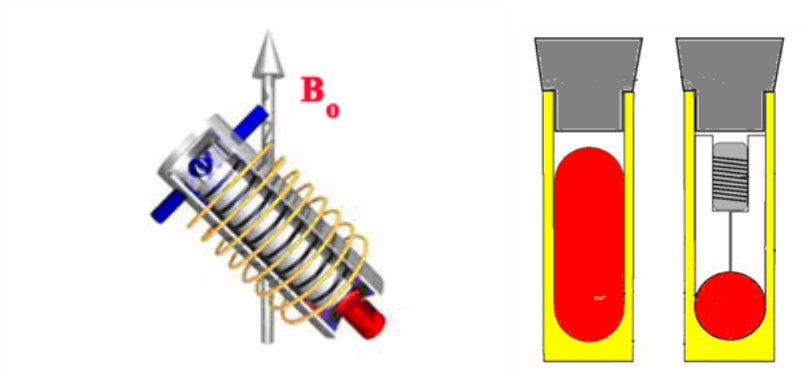


Figura II.15: Dibujos del cabezal de HR-MAS y contenedores donde se localiza la muestra solida (en rojo). En el caso de los tejidos se completa el volumen con D_20 (agua deuterada) y se sella el contenedor.

El uso de resonadores químicos de alto campo tiene dos ventajas bien marcadas cuando se los compara con los espectros clínicos,

1- Al ser los campos magnéticos más grandes, aumenta la resolución espectral, lo que permite resolver mejor los distintos picos que se originan por los acoplamientos químicos entre núcleos de un mismo metabolito y permite separar los picos de distintos metabolitos que resuenan a frecuencias parecidas y se solapan a campos más bajos.

2- El conjunto de secuencias de espectroscopía desarrolladas para los equipos de alto campo es mucho más grande que las de los resonadores clínicos. En especial, secuencias de espectros homonucleares y heteronucleares 2D permiten resolver metabolitos que en espectros 1D se solapan con otras sustancias.

La única desventaja de los espectros "in-vitro" es que durante la preparación del tejido y la medición, la muestra se va deteriorando y las concentraciones de los metabolitos se van modificando[18-19].

La secuencia mas sencilla posible en un resonador químico es aquella donde se rota la M_o de la muestra sobre el plano transversal y enseguida comienza la adquisición. En estas adquisiciones también es importante la supresión de la HDO/H_2O. Para suprimir la señal de

agua, que debido a su alta intensidad puede enmascarar las resonancias de los otros componentes, se puede utilizar la técnica de presaturación. Esta consiste en la irradiación de la señal HDO/H_2O con un débil campo de radiofrecuencia B_1 (50 Hz) durante unos segundos para que se sature ($M_z = M_{xy} = 0$) y atenúe la señal antes de la adquisición del espectro de ^1H (Fig. II.16).

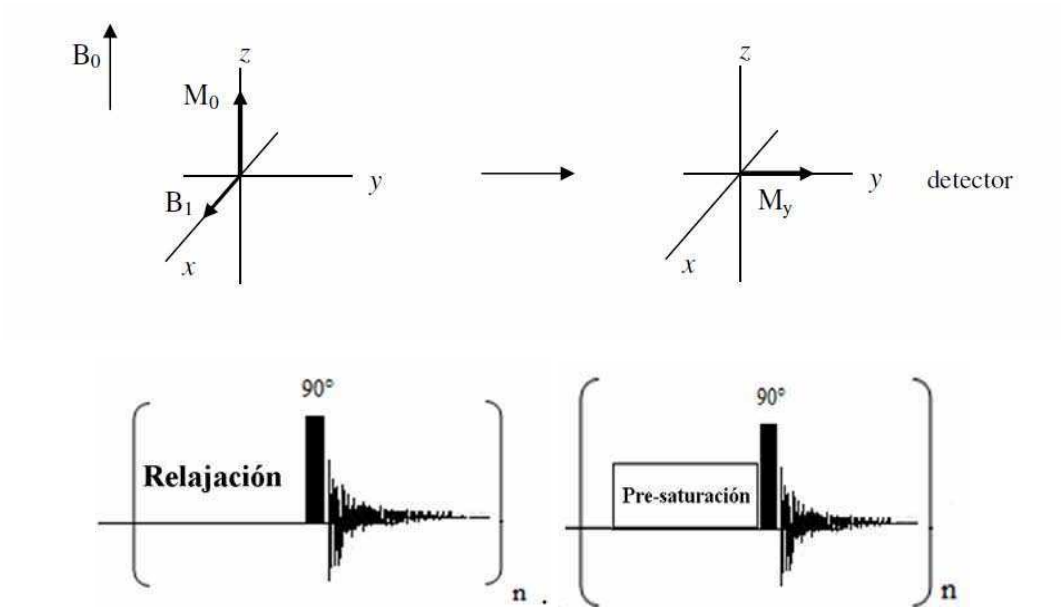
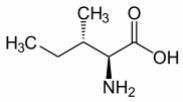
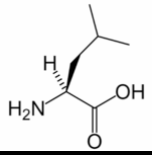
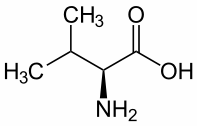
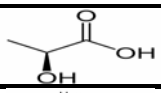
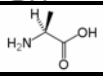
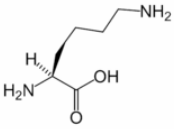
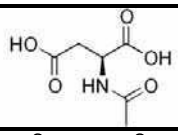
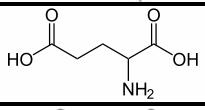
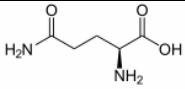
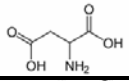
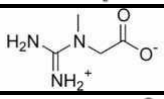
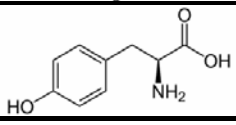
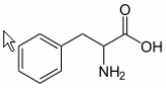


Figura II.16: Arriba: generación de magnetización transversal mediante un pulso de RF de 90°. Abajo secuencia básica de RMN donde la secuencia de rotación de M_o al plano xy seguida de la adquisición se repite n veces. Previo a realizar cada pulso sobre M_o se hace una saturación del H_2O/HOD para cancelarla ($M_{HDO} = 0$).

En un estudio de alto campo, cualquiera sea la secuencia de adquisición, dos parámetros son importantes, la homogeneidad del campo en la muestra y la cantidad de adquisiciones que se suman. Las bobinas de "shimming" de estos resonadores son más complejas que las de un resonador clínico, permitiendo generar gradientes de campo no lineales hasta de 6° orden o más para una mejor homogeneización. Al igual que con la ERM clínica, una mejor homogeneidad de campo permite tener espectros con mejor resolución de los picos de las sustancias y más adquisiciones mejoran la SNR de la señal.

II.6 Metabolitos en ERM de tejido cerebral tumoral

La Tabla II.1 detalla las sustancias más importantes (con sus desplazamientos químicos en ppm[20]) que se pueden detectar por espectroscopia ^1H de alto campo en la región alifática (0-4.7 ppm aprox.) en tumores cerebrales

Metabolito	ppm	Estructura
Lípidos (Lip)	0.89	(-C**H**$_3$)
	1.31	-C**H**$_2$-...-C**H**$_2$-CH$_2$-CH$_3$
	1.59-1.60	(-C**H**$_2$-CH$_2$-COOH)
	2.02	-C**H**$_2$-CH=
	2.24	(-C**H**$_2$-COOH)
	2.78	=CH-C**H**$_2$-CH=
	5.30-5.32	=C**H**-CH$_2$-C**H**=
Isoleucina	0.94 (t) 1.02(d) 1.29,1.48 1.97 3.69	
Leucina	0.95(d) 0.97(d) 1.7 1.72 3.74	
Valina	0.99(d) 1.04(d) 2.25 3.61	
Lactato (Lac)	1.33(d) 4.11	
Alanina (Ala)	1.48(d) 3.78	
Lisina	3.02(t) 1.71 1.48 1.91 3.79	
N-acetilaspartato (NAA)	2.005 4.3823 2.6759 2.4866	
Glutamato (Glu)	2.36(t) 2.06, 2.14 3.77	
Glutamina (Gln)	2.44(td) 2.14 3.78	
Aspartato (Asp)	2.68, 2.82 3.9	
Creatina (Cr)	3.04(s) 3.92(s)	
Tirosina	3.06, 3.20 3.93 6.89 7.23	
Fenilalanina	3.11, 3.28 3.99 7.34 7.43 7.37	

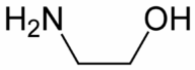
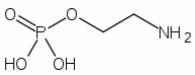
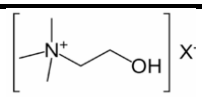
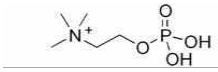
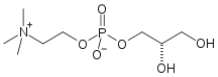
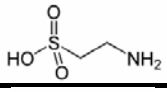
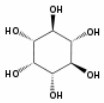
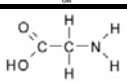
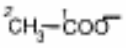
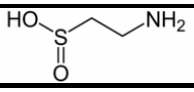
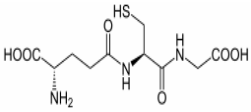
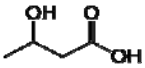
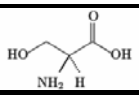
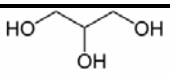
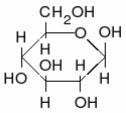
Metabolito	ppm	Estructura
Etanolamina	3.15(t) 3.82(t)	
Fosfato de etanolamina	3.23 4	
Colina (Cho)	3.2 3.53 4.08	
Fosfocolina (PCho)	3.22 3.61 4.22	
Glicerofosfocolina (GPCho)	3.22 3.68 4.33	
Taurina (Tau)	3.26(t) 3.42(t)	
Mio-Inositol (Mio)	3.53(dd) 4.06(t) 3.63(t) 3.29(t)	
Silo-Inositol (S-Ino)	3.35 (s)	
Glicina (Gly)	3.56	
Acetato (Ace)	1.92	
Hipo-Taurina (H-Tau)	2.65(t) 3.35(t)	
Glutatión (GSH)	4.57 2.96 3.8 2.16 2.55 3.77 8.57 8.36	
OH-butirato	1.18 4.14	
Serina	3.96 3.84	
Glicerol (en lipidos)	4.10, 4.30 5.26	
Glicerol	3.56, 3.65 3.81	
β–Glucosa (Gluc)	4.67 (d) 3.26 3.49 3.40 3.47	

Tabla II.1 Listado de los metabolitos y ubicación de las distintas resonancias posibles de encontrar en un espectro de alto campo de tejido cerebral. Modificado de ref. 20.

En lo que sigue se describen someramente las sustancias más importantes que son posibles de detectar en un espectro de ^{1}H de tejido cerebral (Fig. II.17) y en que proceso metabólico se destaca esa sustancia. Este resumen permite entender porque la ERM fue rápidamente aceptada como técnica para estudiar procesos metabólicos normales y patológicos de cerebro.

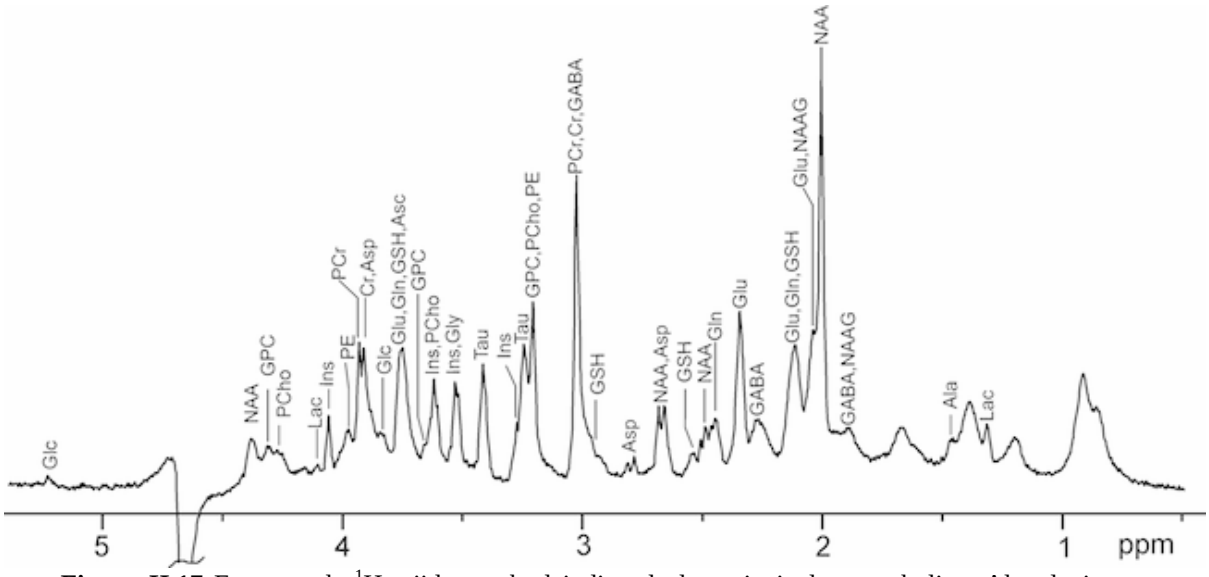


Figura II.17 Espectro de ^{1}H tejido cerebral indicando los principales metabolitos Ala=alanina, Asp=aspartato, Cho=Colina, PCho=fosfocolina, GPC=glycerofosfocolina, Cr=creatina, PCr=fosfocreatina, GABA=gamma-aminobutyrato, Gln=glutamina, Glu=glutamato, GSH=glutathion, Gly=glicina, Glc=glucosa, Ins=myo-inositol, NAA=N-acetilaspartato, Tau=taurina, Asc=ascorbato, NAAG=N-acetilaspartilglutamato, PE=fosfoetanolamina, Lac=lactato.

Lípidos (Lip): Originan principalmente dos resonancias a 0,89 y 1,31 ppm relativamente anchas que son debidas a los grupos metilo ($-CH_3$) y metileno ($-CH_2-$) de la cadena de ácidos grasos. Además, entre 2-2,5 y 5-6 ppm hay otras señales de menor intensidad que se mezclan con las de macromoléculas (MM) (Fig. II.18).

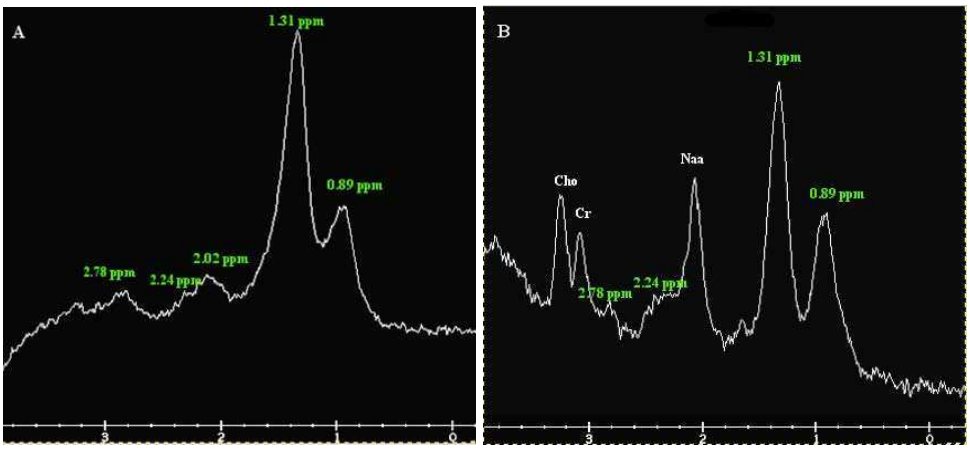


Figura II.18: Espectros clínicos de tumores cerebrales con presencia de distintos picos de lípidos representados por su frecuencia de resonancia principal (Tabla II.1) A): Espectro de región necrótica con solo presencia de lípidos B) Espectros con lípidos y metabolitos de tejido tumoral cerebral.

Con las secuencias de espectroscopia clínica se intenta eliminar la señal de los lípidos que se origina en el exterior del voxel, ya que en ciertas patologías como isquemias y tumores la presencia de lípidos es un buen marcador del proceso de apoptosis y/o necrosis.

Macromoléculas (MM): Con tiempos de eco (TE) cortos una fracción significativa de la señal observada debe ser atribuida a resonancias de las macromoléculas (principalmente proteínas, lipoproteínas, glicolípidos, etc.). Con equipos de alto campo se puede observar un mínimo de 10 resonancias de macromoléculas a 0,93 ppm (M1), 1,24 ppm (M2), 1,43 ppm (M3), 1,72 ppm (M4), 2,05 ppm (M5), 2,29 ppm (M6), 3,00 ppm (M7), 3,20 ppm (M8), 3,8-4,0 ppm (M9) y 4,3 ppm (M10). (Fig. II.19). En equipos clínicos las componentes de MM disminuyen por la disminución de la resolución espectral. La asignación de las proteínas y lípidos específicos que generan estas señales resulta prácticamente imposible de caracterizar. El T_2 de las MM es significativamente más corto que el de los metabolitos de bajo peso molecular debido a su mayor tamaño, que está asociado a tiempos de correlación τ_C más largos (Capítulo I). Esto permite eliminar eficazmente la señal de las MM con TE largos, logrando una simplificación del espectro.

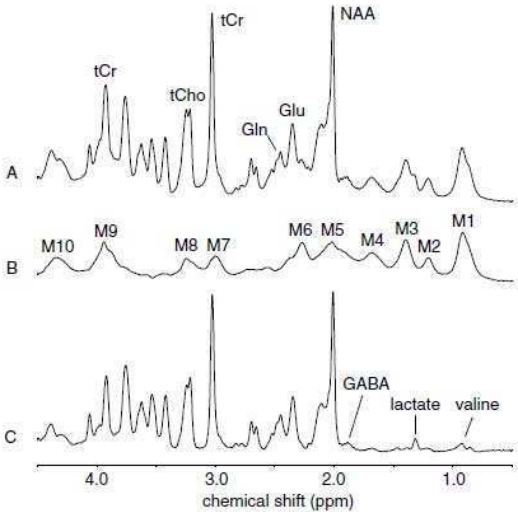


Figura. II.19: Componentes macromoleculares (MM) de un espectro de un cerebro de rata a 9,4 T (B) obtenidos por medio de edición de secuencias que permite cancelar la señal de los metabolitos de T_1 "largos". La diferencia entre un espectro convencional (A) y el espectro de macromoléculas (B) permite estimar la presencia de metabolitos ocultos por la presencia de MM (C).

Un espectro promedio de solo las MM puede ser utilizado como "prior-knowledge" (Capitulo IV) en programas de cuantificación de espectros para aumentar la precisión y la fiabilidad de la cuantificación. Se han observado alteraciones en los compuestos macromoleculares de los espectros en isquemias y tumores[21].

Lactato (Lac): Presenta dos señales a 1,32 y 4,10 ppm. La señal a 1,32 ppm es un doblete y ajustando el tiempo de eco es posible modificar apreciablemente la forma del pico. Sin embargo, en los tumores y accidentes cerebro-vasculares, el pico Lac se solapa con las resonancias de los Lip y MM que lo enmascaran. Esta sustancia permite conocer si una región está teniendo un metabolismo aeróbico o anaeróbico, ya que la ausencia de oxígeno en las células lleva a un aumento instantáneo de lactato. En condiciones normales esta resonancia está en el límite de detección de la técnica (<< 1 mM). Situaciones de hipoxia originan rápidamente aumento de Lac que se pueden mantener durante días. Una isquemia puede dar lugar a un incremento de Lac que se puede mantener de manera crónica, en tumores también es común ver un aumento en este metabolito. También se lo puede observar en regiones necróticas o quísticas.

Grupo N-acetilo: corresponde al N-acetilaspartato (NAA) y se observa a 2,02 ppm; es un pico único originado en el metilo del grupo acetilo de la molécula. Este pico es independiente del TE, manteniendo su altura con distintos valores de TE. En condiciones normales y en personas adultas es el pico de mayor altura y se lo considera un marcador neuronal ya que se cree que este compuesto está presente de manera específica en las neuronas. Es esto justamente lo que lleva al interés clínico de su variación.

En general, se observa disminución del pico del NAA en espectros de patologías que presentan una pérdida o daño de neuronas o axones (esclerosis, tumores, etc). También, es posible ver recuperación de este pico ante la evolución de ciertas patologías que se asocian a una recuperación neuronal y axonal con el paso del tiempo debido a la re-síntesis de esta sustancia en la neurona.

N-acetil-aspartil glutamato (NAAG): es un dipéptido de N-acetilaspartato y glutamato, con una distribución no uniforme dentro del cerebro 0,6-3,0 mM Se cree que participa en la neurotransmisión excitatoria, además de ser una fuente de glutamato. Sin embargo, su papel exacto no está claro. La resonancia principal del NAAG es como en el caso anterior el metilo del grupo acetilo que en este caso se observa en 2,04 ppm, muy cerca de la resonancia más intensa del metilo del NAA en 2,02 ppm. Por ello es necesaria una excelente homogeneidad del campo magnético para detectar de forma inequívoca el NAAG por separado de NAA. En los casos en que esta separación no se puede lograr, la suma de NAA y NAAG proporciona una estimación fiable de la concentración de NAA.

Alanina (Ala): es un aminoácido no esencial que está presente en el cerebro de los mamíferos a una concentración menor de 0,5 mM. Aparece como un doblete a 1,47 ppm y un cuarteto a 3,78 ppm. En los espectros de ^{1}H RMN de bajo campo se solapa con las señales de Lip y MM. Es un claro marcador de los meningiomas.

Acido γ-aminobutírico (GABA): es un neurotransmisor inhibidor que tiene una concentración cerebral de alrededor de 1 mM. Presenta dos tripletes a 3,01 ppm y 2,28 ppm y un quinteto centrado en 1,89 ppm al lado del Ace (Acetato). Las tres resonancias de GABA se superponen con otras resonancias más intensas por lo que no es visible en los espectros clínicos.

Aspartato (Asp): Es un aminoácido no esencial que actúa como un neurotransmisor excitatorio. No cruza la barrera hematocefálica, sino que se sintetiza a partir de la glucosa (Gluc) y posiblemente otras precursores. Tiene múltiples picos a 3,89 ppm y un par de dobletes a 2,65 ppm y 2,80 ppm.

Creatina y fosfocreatina (Cr o TCr o PCr/Cr): Esta sustancia tiene dos picos que aparecen a 3,02 y 3,9 ppm. Estos compuestos juegan un rol fundamental en el metabolismo energético del cerebro. Por el proceso metabólico que se genera entre Cr y PCr la suma de sus concentraciones se mantiene constante en condiciones normales. Es por eso que muchos trabajos la toman como sustancia de referencia para el cálculo de variaciones del resto de los picos de los espectros.

Colina (Cho): La resonancia que aparece a 3,20 ppm denominado pico de colina (Cho) en un espectro clínico está compuesta principalmente, en cerebro y músculo, por tres metabolitos diferentes *colina libre (Cho), fosfocolina (PCho)* y *glicerofosfocolina (GPCho)*. La concentración de estos compuestos es baja, pero dado que a este pico contribuyen los tres grupos metilo unidos al nitrógeno, estas moléculas dan un pico de gran intensidad. Estas sustancias no se pueden separar en 3,20 ppm en un espectro clínico debido a la pequeña diferencia de desplazamiento químico en relación con el ancho de la línea espectroscópica. Los compuestos de colina se asocian con el proceso metabólico de síntesis y degradación de fosfolípidos, por lo cual reflejan la síntesis y degradación de membranas celulares. En general, en tumores es un marcador relevante porque este pico/s es mayor que en tejido normal.

***Myo*-Inositol (Mio) y *scyllo*-Inositol (S-Ino):** Mio es un azúcar cíclico con seis protones detectables que dan lugar a cuatro grupos de resonancias. Un doble doblete centrado en 3,52 ppm, un triplete a 3,61 ppm, un pequeño triplete de los protones a 3,27 ppm que típicamente es "tapado" por la Cho en un espectro clínico y un triplete a 4,02 ppm que en espectros clínicos es atenuado por la cancelación del pico del agua. Es un compuesto que en los niños es más abundante y decrece con la edad hasta alcanzar los valores que se encuentran en los adultos. La función exacta del Mio en el cerebro no se conoce, a pesar que desempeña una importante función en la regulación osmótica en el riñón. Se ha propuesto como un marcador glial aunque esta característica ha sido cuestionada por la detección de Mio en diferentes tipos de células neuronales[22]. Se conoce que está elevado en tumores gliales de bajo grado[23-24-25]. Otro compuesto relacionado, el S-Ino es un isómero del Mio que da un único pico a 3,35 ppm.

Glutamina (Gln) y Glutamato (Glu): originan una serie de señales en las regiones 2,2-2,4 ppm y 3,6-3,8 ppm. Debido a las interacciones que se dan entre los núcleos a intensidades bajas de campo, las dos sustancias son difíciles de separar. Su nivel de acoplamiento es también muy variable con los tiempos de eco (TE) utilizados. Esto hace que, aunque su concentración en cerebro sea mayor que la del NAA, su resolución no sea buena. A campos mayores (7 T) se puede determinar la contribución de cada ^{1}H magnéticamente equivalente.

El Glu es un aminoácido no esencial con múltiples funciones en el cerebro. En primer lugar, el Glu es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro de los mamíferos. En segundo lugar, es el precursor para el principal neurotransmisor inhibidor, GABA. Además de estas funciones, el Glu es también un componente importante en la síntesis de otros metabolitos pequeños (por ejemplo, Glutation (GSH)), así como de grandes péptidos y proteínas. Glu está presente en una concentración media de 6-12,5 mM con diferencias significativas entre la materia gris y blanca. El Glu está presente en todos los tipos de células cerebrales, pero con una concentración mayor en las neuronas glutamaérgicas y menor en las neuronas GABAérgicas y astroglía.

La Gln también es un aminoácido, y está ubicada principalmente en los astrocitos a una concentración de 2,4 mM. El Glu se sintetiza en las neuronas a partir de la Gln que se sintetiza en el astroglía. Además de su papel en el ciclo de Glu-Gln[26], la función principal de Gln es la desintoxicación de amoníaco. Gln aumenta notablemente durante hiperamonemia y en esas condiciones la concentración en el cerebro de Gln es un buen indicador de la

encefalopatía hepática del hígado

Glucosa (Gluc): es una sustancia esencial para el cerebro ya que funciona como una fuente de energía y un precursor de un gran número de compuestos. La concentración de Gluc en el cerebro en reposo es de alrededor de 1,0 mM, pero se puede aumentar a más de 5,0 mM por infusión intravenosa de Gluc. Presenta dos resonancias identificables in vivo a 3,43 ppm y 3,80 ppm. La Gluc es en principio medible en el cerebro, aunque el gran solapamiento espectral en esa región limita la fiabilidad de la detección.

Glutatión (GSH): es un tripéptido compuesto de glicina, cisteína y ácido glutámico. Está presente en el cerebro en concentraciones de 1,3 mM. Se localiza principalmente en los astrositos. GSH es un antioxidante, esencial para el mantenimiento de glóbulos rojos normales y mantener la hemoglobina en estado ferroso. Los cuatro protones metileno del Glu dan lugar a dos multipletes por separado en 2,15 ppm y 2,55 ppm. Los 3 de la cisteina generan los multipletes a 2,93 ppm, 2,98 ppm y 4,56 ppm. Todas las resonancias de GSH se superponen con las señales más intensas de otros metabolitos como Glu, Gln, Cr y NAA. Por eso, la detección in vivo de GSH es muy difícil en espectros clínicos.

Glicina (Gly): es un neurotransmisor inhibitorio y posiblemente un antioxidante, que se distribuye en todo el sistema nervioso central. La Gly tiene un único pico a 3,56 ppm muy cerca de la frecuencia de resonancia del pico principal del Mio, lo que los hace indistinguibles a campos bajos. Sin embargo, la sustancia decae mas lentamente que el Mio, por lo cual, una manera de diferenciarlo del Mio es utilizar tiempos de eco más largos.

Taurina (Tau): A campos magnéticos altos la Tau muestra dos tripletes en 3,25 y 3,42 ppm. A campos magnéticos bajos, la Tau se superpone con los picos de la Cho, de tal manera que la detección inequívoca requiere el uso de métodos de edición. Este aminoácido aparece en muy baja concentración en un cerebro adulto normal (aprox. 2 mM, en los niños es de 6 mM) y se cree que está implicado en la osmoregulación, además es antioxidante y regulador de calcio.

Hypo-Taurine (H-Tau): es un producto generado por la enzima dioxigenasa cisteamina a partir de taurina. Puede funcionar como un antioxidante y un agente de protección en condiciones fisiológicas. También actúa como un neurotransmisor endógeno a través de la acción en el receptor glicina. Muestra dos tripletes a 2,65 y 3,35 ppm.

Además de estas sustancias, que son fácilmente detectables en un espectro de alto campo, y

pueden ser también medidas en espectros clínicos, se encuentran otras que por su baja concentración y solapamiento con resonancias de sustancias con mayor concentración no se detectan en espectros clínicos. Si embargo sí son posibles de medir en espectros de alto campo, si el volumen del tejido es grande[27]. Estas sustancias son:

Glicerol, glucógeno, histamina, histidina, β-hidroxibutirato, fenilalanina, piruvato, serina succinato, triptofano, tirosina, valina, etanolamina y fosfato de etanolamina.

Existen otras sustancias en el cerebro que por la limitada sensibilidad de la técnica no pueden ser detectadas debido su baja concentración (0,5-1 mM). Estas sustancias son por ejemplo neurotransmisores como acetilcolina, norepinefrina, serotonina, dopamina, etc. También es muy difícil caracterizar otros compuestos que pueden estar en concentraciones más elevadas como los fosfolípidos, la mielina, proteínas, RNA y DNA ya que su movilidad está limitada y tienen T_2 muy cortos. Sólo en aquellas situaciones muy particulares cuando alguna de estas sustancias aumenta su concentración por algún motivo es cuando son detectables.

Referencias

[1] F. Bloch, W.W. Hansen y M. Packard, **The Nuclear Induction Experiment** *Phys. Rev*. 70, 474 (1946)

[2] E.M. Purcell, H.C. Torrey, y R.V. Pound, **Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid** *Phys. Rev*. 69, 37 (1946)

[3] Pettegrew JW, Withers G, Panchalingam K, Post JF. **Considerations for brain pH assessment by 31P NMR.** *Magn Reson Imaging* 6, 135–142 (1988)

[4] Deelchand DK, Ugurbil K, Henry PG. **Investigating brain metabolism at high fields using localized 13C NMR spectroscopy without 1H decoupling**. *Magn Reson Med* 55, 279–286 (2006).

[5] Kamm YJ, Heerschap A, van den Bergh EJ,Wagener DJ. **19F-magnetic resonance spectroscopy in patients with liver metastases of colorectal cancer treated with 5-fluorouracil**. *Anticancer Drugs* 15, 229–233 (2004).

[6] Proctor WG, Yu FC. **The dependence of a nuclear magnetic resonance frequency upon chemical compound**. Phys Rev 77, 717 (1950).

[7] R Mekle, V Mlynárik, G Gambarota, M Hergt, G Krueger, Rolf Gruetter **MR spectroscopy of the human brain with enhanced signal intensity at ultrashort echo times on a clinical platform at 3T and 7T** *Magnetic Resonance in Medicine* Jun;61(6):1279-85 (2009)

[8] Ramsey NF, Purcell EM. **Interactions between nuclear spin in molecules**. *Phys Rev* 85, 143–144 (1952)

[9] Kevin M. Koch, Douglas L. Rothman, Robin A. de Graaf , **Optimization of static magnetic field homogeneity in the human and animal brain in vivo** *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 54 69–96 (2009)

[10] Gruetter R. **Automatic, localized in vivo adjustment of all first- and second-order shim coils** *Magn Reson Med*. Jun ;29(6):804-11 (1993).

[11] Haase A, Frahm J, Hanicke W, Matthaei D. **1H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging**. *Phys. Med. Biol*. 30(4):341-344 (1985;

[12] Frahm J, Bruhn H, Hanicke W, Merboldt KD, Mursch K, Markakis E. **Localized proton NMR spectroscopy of brain tumors using short-echo time STEAM sequences**. *J Comput Assist Tomogr* 15, 915–922 (1991).

[13] Bottomley PA. **Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo**. *Ann N Y Acad Sci* 508, 333–348 (1987)

[14] Brown TR, Kincaid BM, Ugurbil K. NMR chemical shift imaging in three dimensions. *ProcNatl Acad Sci USA* **79**, 3523–3526 (1982).

[15] Maudsley AA, Hilal SK, PermanWH, Simon HE. Spatially **resolved high resolution spectroscopyby 'four dimensional' NMR**. *J Magn Reson* **51**, 147–152 (1983).

[16] Andrew ER, Bradbury A, Eades RG. **Removal of dipolar broadening of nuclear magneticresonance spectra of solids by specimen rotation**. Nature; 183: 1802-1803 (1959)

[17] Lowe IJ**. Free induction decays of rotating solids**. *Phys. Rev. Lett.*; 2: 285-287 (1959)

[18] Daniel Valverde-Saubí, Ana Paula Candiota, Maria Antònia Molins, Miguel Feliz, Óscar Godino, Myriam Dávila, Juan José Acebes and Carles Arús **Short-term temperature effect on the HRMAS spectra of human brain tumor biopsies and their pattern recognition analysis** *MAGMA* 23,(4), 203-215 (2010)

[19] Alan J Wright, Greg A Fellows, John R Griffiths, M Wilson B Bell, Franklyn A Howe **Ex vivo HRMAS of adult brain tumours: metabolite quantification and assignment of tumour biomarkers.** *Molecular Cancer*, 9:66 (2010)

[20] Valerie Righi **Biochemistry in Healthy and Neoplastic Human Tissues: Metabolic Alteration Revealed by HR-MAS Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy** DOTTORATO DI RICERCA Uniiversiittà dii Bollogna 2008

[21] Weis J, Ring P, Olofsson T, Ortiz-Nieto F, Wikström J. **Short echo time MR spectroscopy of brain tumors: grading of cerebral gliomas by correlation analysis of normalized spectral amplitudes**. *J Magn Reson Imaging*. Jan;31(1):39-45 (2010)

[22] Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D. **Multinuclear NMR studies on the energymetabolism of glial and neuronal cells**. *Dev Neurosci* **15**, 289–298 (1993).

[23] *cds.ismrm.org/ismrm-2003/0755.pdf*

[24] Castillo M, Smith JK, Kwock L. **Correlation of myo-inositol levels and grading of cerebral astrocytomas**. *Am J Neuroradiol*; 21:1645-9 (2000)

[25] Maxwell RJ, Martínez-Pérez I, Cerdán S, Cabanas ME, Arus C, Moreno A, et al. **Pattern recognition analysis of 1H NMR spectra from perchloric acid extracts of human brain tumour biopsies**. *Magn Reson Med* ;39:869-77 (1998)

[26] Rothman DL, Sibson NR, Hyder F, Shen J, Behar KL, Shulman RG.**In vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of the relationship between the glutamate-glutamine neurotransmitter cycle and functional neuroenergetics**.. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Jul 29;354(1387):1165-77 (1999)

[27] M. Martınez-Bisbal, L. Martı´-Bonmatı, J. Piquer, A Revert, P. Ferrer, J. Llacer, M Piotto, O. Assemat, B Celda **^{1}H and ^{13}C 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 (2004)

Capítulo III

Tumores gliales del sistema nervioso central

III.1 Introducción a los tumores gliales

III.1.1 Clasificaciones histológicas

En la clasificación histológica, el paradigma diagnóstico depende fuertemente del análisis de los elementos morfológicos de la microscopía óptica para asignar a los tumores tanto un linaje específico como un grado histológico de agresividad. El primer antecedente histórico, la clasificación de Bailey y Cushing[1] , se basaba en la analogía entre el proceso embrionario y el neoplásico.

Recién a fines de la década del ´40, se elaboró la clasificación de la Clínica Mayo[2]. Esta era consistente con los intentos de la época de elaborar clasificaciones pronósticas basadas en la morfología (el ejemplo más famoso era la clasificación de Dukes para los tumores colónicos). La clasificación de la Clínica Mayo dividía a los tumores astrocíticos en 4 categorías: astrocitoma I a IV. Lo interesante fue la orientación esencialmente pronóstica que tenía, dejando prácticamente de lado las consideraciones histogenéticas. Su debilidad mayor era la dificultad en la reproducibilidad, dado que tenía en cuenta 11 criterios morfológicos lo que constituía un sistema complejo.

A posterior, en la década del 50, Reingertz[3] propuso un sistema basado en 3 categorías: astrocitoma, astrocitoma anaplásico y glioblastoma, nuevamente con predominio de las consideraciones pronósticas.

Recién en los ´70, se produce un cambio conceptual importante a partir de la decisión de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de reunir expertos en las distintas áreas de la oncología y elaborar clasificaciones basadas en la morfología[4], que funcionaran como “diccionarios” para homologar internacionalmente las nomenclaturas. Asimismo, la OMS introdujo una clasificación que ponderaba exclusivamente los “grados de agresividad”, en forma absolutamente independiente de la histogénesis. Dada la “institucionalización” brindada por la OMS, esta clasificación internacional y sus versiones sucesivas[5-6], fueron sumamente populares y brindaron, por primera vez, una base sólida para la comparación de terapéuticas y resultados en categorías oncológicas homogéneas (o, al menos, lo más homogéneas posibles), permitiendo la posibilidad de realizar ensayos clínicos terapéuticos con comparación de grupos.

En el año 1988, el grupo del hospital Saint Anne de la Dra. Daumas Duport junto con la Clínica Mayo, publicaron un sistema de gradación histológica basado en sólo 4 criterios histológicos: pleomorfismo nuclear, mitosis, proliferación vascular y necrosis[7]. Este sistema demostró ser altamente predictivo, sencillo y reproducible y fue incorporado en la clasificación de la OMS de 1990. Este sistema funciona aceptablemente en cuanto a homogeneizar las entidades en forma relativamente reproducible, pero adolece de algunas debilidades. Entre ellas, la naturaleza "textual" descriptiva de sus definiciones, la variabilidad inter-observador, la incapacidad de dar cuenta de la heterogeneidad tumoral y las limitaciones del muestro quirúrgico.

Un aporte adicional, y de alguna manera complementario, ha sido la graduación de los oligodendrogliomas propuesto por Daumas Duport. Esencialmente corresponde a dos categorías: oligodendroglioma grado A y Grado B, siendo la diferencia entre ambos, la captación de contraste iodado o paramagnético en el Grado B. Esta captación se correlaciona con la proliferación microvascular, la cuál puede o no estar presente en la muestra quirúrgica.

III.1.2 Clasificación general

La mayoría de los tumores cerebrales primarios son de origen neuroepitelial. Estos representan el 30% al 40% de todos los tumores intracraneales e incluyen a los gliomas, que constituyen el subgrupo más numeroso. Los gliomas son tumores típicos de la edad media, con una incidencia máxima entre las edades de 40 y 65 años y alrededor de la mitad de todos los gliomas en adultos son glioblastomas (GB).

Tipo tumor	Grado	**% de tumores cerebrales**
Tumores Neuroepiteliales		**34.3**
Glioblastoma	IV	17.1
Astrocitoma Anaplasico	III	2.1
Astrocitoma pilocitico	I	1.7
Oligodendroglioma	II	1.4
Ependimoma	II/III	1.4
Glioma mixto	II/III	1.0
Oligodendroglioma anaplasico	III	0.7
Astrocitoma difuso	II	0.5

Tabla III.1: Porcentajes estimados y grado de agresividad de los distintos tumores gliales en el cerebro

Los gliomas se clasifican por el tipo de células neoplásicas predominante en las muestras de tejido analizadas por patología. Los subtipos establecido por la Organización Mundial de la Salud[8] (OMS) son: astrocitoma (AO) (incluyendo glioblastoma), oligodendroglioma (O),

ependimoma, oligodendroglial mixto y tumor astrocítico difuso. También hay tumores con componentes gliales y neuronales (Tabla III.1).

Existe también un sistema de graduación de los tumores en función del grado de agresividad (tasa de crecimiento) del mismo, que muchas veces coincide con el tipo de tumor glial

- Grado I (bajo grado): el tumor crece lentamente, tiene células con un aspecto muy parecido al de las células normales en los que se referencia y muy raramente se disemina hacia los tejidos cercanos. Es posible extirpar todo el tumor mediante cirugía.

- Grado II: el tumor crece lentamente, pero se puede diseminar hasta el tejido cercano. Algunos tumores se pueden convertir en tumores más agresivos.

- Grado III: el tumor crece rápidamente, es probable que se disemine hasta el tejido cercano y sus células tienen un aspecto muy distinto del de las células normales en las que se referencia.

- Grado IV (alto grado): el tumor crece y se disemina muy rápidamente y el aspecto de las células no es como el de las células normales. El tumor puede tener áreas de necrosis (células muertas).

III.1.3 Tumores gliales – Clasificación de la OMS

El **astrocitoma difuso** (grado II de la OMS), conocido también como astrocitoma difuso de bajo grado, está caracterizado por el crecimiento lento y la infiltración de estructuras cerebrales vecinas. Histológicamente, los astrocitomas difusos están compuestos por astrocitos fibrilares bien diferenciados o neoplásicos gemistocíticos. Por lo general, este tipo de tumor afecta a los adultos jóvenes y tiende a la progresión maligna, a astrocitoma anaplásico y, finalmente, a glioblastoma. Los astrocitomas difusos representan 35% de los tumores cerebrales astrocíticos. Se localizan en cualquier región del sistema nervioso central (SNC) pero más comúnmente se desarrollan en el cerebro. Estos tipos de tumores afectan a los pacientes con mutaciones heredadas de la línea germinal TP53 (punto III.2 de este capítulo) ya que en más de 60% de los casos se han observado mutaciones de TP53 (conocidas también como p53). El tiempo de supervivencia medio después de la intervención quirúrgica es entre 6 y 8 años, con considerable variación individual.

El **astrocitoma anaplásico** (grado III), conocido también como astrocitoma maligno y astrocitoma de alto grado, surge a raíz de un astrocitoma difuso o se manifiesta de novo sin indicación de un precursor menos maligno. Desde el punto de vista histológico, este tumor

tiene más celularidad, clara atipia nuclear y marcada actividad mitótica cuando se lo compara con un astrocitoma difuso. Los astrocitomas anaplásicos tienden intrínsicamente a progresar a glioblastoma. La edad promedio al momento de la biopsia es aproximadamente 41 años. Este tumor afecta principalmente los hemisferios cerebrales. Tiene una alta frecuencia de mutaciones de TP53, la cual es similar a la del astrocitoma difuso. Las anomalías cromosómicas no son específicas. Muchas de las alteraciones genéticas observadas en los astrocitomas anaplásicos afectan a genes que regulan la progresión del ciclo celular. El tiempo promedio de progresión es de 2 años. Los factores predictivos positivos comprenden la juventud, el buen estado de actividad del paciente y la resección tumoral macroscópica total.

El **glioblastoma** (GB) (grado IV), conocido también como glioblastoma multiforme, se puede generar a partir de un astrocitoma difuso o de un astrocitoma anaplásico (GB secundarios), pero más frecuentemente se presenta “de novo” sin manifestación de un precursor menos maligno (GB primarios). Histológicamente este tumor es un glioma celular anaplásico compuesto por células tumorales astrocíticas, escasamente diferenciadas, generalmente pleomórficas, con marcada atipia nuclear y actividad mitótica. El GB es el tumor cerebral más frecuente y representa casi de 12% a 15% de todos los tumores cerebrales y de 50% a 60% de todos los tumores astrocíticos. El pico de incidencia ocurre entre las edades de 45 y 70 años. El glioblastoma afecta principalmente a los hemisferios cerebrales. Las dos variantes histológicas incluyen GB de células gigantes y gliosarcoma. El GB se ha relacionado con más anomalías genéticas específicas que cualquier otra neoplasia astrocítica, pero ninguna es exclusiva. Esto tumores se encuentran entre las neoplasias humanas más agresivamente malignas, con una duración total media de la enfermedad inferior a 1 año en pacientes con GB primario.

El **oligodendroglioma** (O) (grado II) es un tumor bien diferenciado, compuesto predominantemente por células que por su morfología se asemejan a la oligodendroglia, la cual crece de manera difusa en la corteza y la sustancia blanca. Este tumor representa aproximadamente 50% de los tumores oligodendrogliales y entre 5% y 18% de los gliomas. La mayoría de los oligodendrogliomas se manifiestan en adultos, con una mayor incidencia entre la quinta y la sexta décadas de vida. En comparación con los pacientes con astrocitoma, los pacientes con oligodendroglioma responden mejor a la radioterapia y la quimioterapia.

El **oligodendroglioma anaplásico** (grado III) es un tumor oligodendroglial con características histológicas focales o difusas de malignidad y un pronóstico menos favorable

que el oligodendroglioma de grado II. Casi 50% de los tumores oligodendrogliales son oligodendrogliomas anaplásicos. Estos tipos de tumores se manifiestan principalmente en los adultos y por lo general, primariamente como un tumor en el lóbulo frontal y secundariamente en el lóbulo temporal.

Gliomas mixtos

El **oligoastrocitoma** (OA) (grado II) está compuesto por dos tipos de células neoplásicas distintas que se asemejan morfológicamente a las células tumorales del oligodendroglioma y del astrocitoma difuso. Los cálculos de la incidencia varían muchísimo. Se ha observado que la edad promedio de los pacientes oscila entre 35 y 45 años. Este tumor demuestra predilección por los hemisferios cerebrales; los lóbulos frontales son los afectados con mayor frecuencia, seguidos por los lóbulos temporales. Estos tipos de tumores no contienen alteraciones genéticas específicas ni anomalías cromosómicas; sin embargo, casi 30% de los oligoastrocitomas tienen aberraciones genéticas que generalmente se encuentran en los tumores astrocíticos.

El **oligoastrocitoma anaplásico** (grado III). Estos tipos de tumores representaron 4% de los tumores en una amplia serie de gliomas anaplásicos supratentoriales en el adulto. La edad promedio de los pacientes es 45 años. Los oligoastrocitomas anaplásicos son tumores predominantemente hemisféricos y los lóbulos frontales son comprometidos con mayor frecuencia que los lóbulos temporales. Estos tumores comparten muchas alteraciones genéticas que también se asocian con la progresión de astrocitomas y oligodendrogliomas. El pronóstico de los pacientes con oligoastrocitomas anaplásicos es relativamente precario, si bien es mucho mejor que para los pacientes con glioblastoma.

III.1.4 Caracteristicas de los tumores gliales

Los gliomas generalmente crecen por infiltración difusa en la sustancia blanca (WM) del cerebro y suelen estar rodeado por extensas regiones de edema en WM.

La capacidad de las células de los gliomas de moverse en el entramado celular del cerebro es uno de los factores que mejor representa la agresividad de los tumores gliales. En consecuencia, es muy difícil remover estos tumores por cualquier tipo de tratamiento local, incluyendo la cirugía, que es el mejor tratamiento hasta el momento para esta afección.

No es posible hasta ahora poder realizar una prevención o detección precoz de los gliomas, ni existen marcadores específicos en sangre o líquido cefalorraquídeo disponibles que los pronostiquen. Por lo tanto, la detección de los gliomas se realiza actualmente por estudios de

imagen cerebrales tomográficos. En este sentido la resonancia magnética (RMI) es muy superior a la tomografía computarizada (CT), por tener una mayor resolución, alto contraste de los tejidos blandos, una mejor representación de la extensión de los tumores y la capacidad de realizar imágenes en planos oblicuos.

Una característica de los gliomas difusos es que es uno de los cánceres más devastadores, ya que a menudo muestran un comportamiento localmente muy agresivo que no se puede curar con los tratamientos actuales. Por otra parte, los gliomas de bajo grado (grado II) tienen una tendencia a la progresión maligna para convertirse a gliomas anaplásicos (grado III) y, finalmente a glioblastomas secundarios (grado IV).

Desde el punto de vista del tratamiento, una distinción precisa entre los distintos gliomas es importante debido a su pronóstico e implicaciones terapéuticas. Hasta ahora, la histopatología es el "gold estándar" para la tipificación y clasificación de los gliomas. **Sin embargo, la clasificación histológica de los gliomas no es trivial y está muy asociada al patólogo que clasifica las piezas de tejido tumoral**.

Varios estudios han mostrado la variación que puede existir en el diagnóstico patológico de los gliomas. En una evaluación con un grupo de 500 pacientes con tumores cerebrales[9], se presentó un grado de desacuerdo en el 42,8% de los casos, de los cuales se consideró grave en el 8,8% por sus implicancias clínicas.

En un estudio prospectivo sobre 244 casos revisados por cuatro patólogos[10], Coons et al. demostraron que la concordancia diagnóstica puede ser mejorada por la revisión de los casos. Los cuatro revisores estuvieron de acuerdo en sólo el 52% de casos en la revisión inicial, pero en el 69% de los casos después de la cuarta revisión. Los autores concluyeron que la mayor parte de la mejora se relaciona con el perfeccionamiento de los criterios de distinción entre los astrocitomas difusos de los oligodendrogliomas, oligoastrocitomas y astrocitomas pilocíticos. Este estudio también mostró que se clasificó como oligodendrogliomas al 25% de los gliomas, aunque inicialmente sólo había sido diagnóstico de oligodendroglioma el 5%. El presente informe ilustra el aumento del porcentaje de gliomas difusos diagnosticados como oligodendroglial desde fines de 1990, una vez que quedó claro que la deleción 1p/19q está asociada con una mayor sensibilidad al tratamiento[11-12].

III.2 Marcadores genéticos de tumores gliales

III.2.1 Introducción

Es reconocido que el comportamiento y el tratamiento clínico de los tumores gliales con histopatologias específicas pueden diferir sustancialmente. Por lo tanto, se necesitan marcadores más precisos y objetivos en la clasificación de gliomas para realizar un pronóstico más confiable y tomar decisiones de la terapéutica a adoptar.

Siguiendo el comportamiento común del cáncer, los gliomas se desarrollan como resultado de alteraciones genéticas que se acumulan con la progresión del tumor. Afortunadamente, el conocimiento de las alteraciones genéticas en los distintos tipos y grados de malignidad de los gliomas se ha incrementado marcadamente en los últimos 20 años.

Varias de las alteraciones genéticas detectadas en los gliomas tienen implicaciones diagnósticas y/o pronósticas, ya que están histológicamente asociadas con tipos definidos de tumores o grados de malignidad. Sin embargo, la mayor parte de los cambios en los mecanismos moleculares no justifican la designación como biomarcadores de gliomas, porque un biomarcador debe ofrecer una información de diagnóstico, pronóstico o predicción superior a la que se llegó por la clasificación histológica. Un biomarcador de ***diagnóstico*** debe ser útil en la clasificación de los tumores con características histológicas ambiguas o permitir una subdivisión de utilidad clínica en tumores de un determinado tipo establecido histologicamente. Un biomarcador de ***pronóstico*** útil debe correlacionarse con la supervivencia, más allá de la información estadística que se obtiene por los parámetros de pronóstico ya establecidos, tales como la edad del paciente, estado de resultados clínicos, la extensión de la resección y grado de agresividad del tumor. Un biomarcador ***predictivo***, por último, debe proporcionar información valiosa sobre la respuesta a una terapia, lo que ayudará a estratificar a los pacientes en grupos con distintas terapéuticas para permitir el tratamiento óptimo ("personalizada"). En este sentido, hasta la fecha el número de biomarcadores moleculares en neurooncología se limita a unos pocos, a saber:

- Metilación del promotor MGMT: *Predictivo* de la respuesta de los glioblastomas a la quimioterapia alquilante. Se lo asociada con una mayor supervivencia en pacientes con glioblastoma concurrentes tratados con radioterapia combinada con temozolomida (quimioterapia). Es pronóstico en pacientes con glioma anaplásico tratados con radioterapia y/o quimioterapia alquilante

- Deleción 1p/19q: asociado con un mejor *pronóstico* en oligodendrogliomas que recibieron radio y/o quimioterapia. No predictivos de respuesta a un tipo particular de terapia.

- Mutación IDH1/IDH2: marcador *diagnóstico* para gliomas difusos grado II y III, así como glioblastomas secundarios y se asocia con un mejor pronóstico en estos tumores. Poco frecuente en los glioblastomas primarios; pero cuando se presenta, se asocia con mayor sobrevida. No es *predictivo* de respuesta a algún tipo de terapia en particular.

III.2.2 Alteraciones genéticas y marcadores genéticos tumorales en gliomas

- Deleción de cromosomas 1p/19q como marcador pronóstico en tumores oligodendrogliales.

Una **deleción**, en genética, es un tipo especial de anomalía estructural cromosómica que consiste en la pérdida de un fragmento de ADN de un cromosoma. Cualquier número de nucleótidos se pueden eliminar, desde una sola base a una pieza completa del cromosoma. Las deleciones pueden ser causadas por errores en el cruce cromosómico durante la meiosis (Fig. III.1).

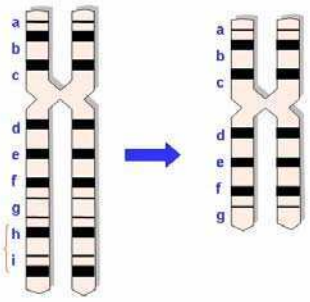


Figura III.1: Perdida de material genético de un cromosoma por la deleción de un segmento (h,i) de un cromosoma.

En 1998, fue reportado por primera vez que la pérdida del 1p (y combinado 1p/19q) predice una mejor respuesta a la quimioterapia y una mayor supervivencia en pacientes con oligodendrogliomas anaplásicos[13]. Desde entonces, muchos estudios posteriores se han llevado a cabo que corroboran que la deleción 1p/19q es un poderoso marcador pronóstico en pacientes con gliomas[14-15]. Es importante destacar que estos estudios también indican que el pronóstico es independiente del tipo de terapia, sea radioterapia, quimioterapia o la combinación radio/quimioterapia.

- Hipermetilación de MGMT como un marcador de pronóstico o predicción en los gliomas malignos

La **metilación** es la adición de un grupo metilo (-CH_3) a una molécula (Fig. III.2). En genética, la metilación es el principal mecanismo epigenético (los mecanismos de regulación genética que no implican cambios en la secuencias de ADN). Aquí la metilación consiste en la transferencia de grupos metilos a algunas de las bases citosinas (C) del ADN situadas previa y contiguamente a una guanina (G). Puesto que la metilación es fundamental en la regulación del silenciamiento de los genes, puede provocar alteraciones en la transcripción genética sin necesidad de que se produzca una alteración en la secuencia del ADN, siendo uno de los mecanismos responsables de la plasticidad fenotípica.

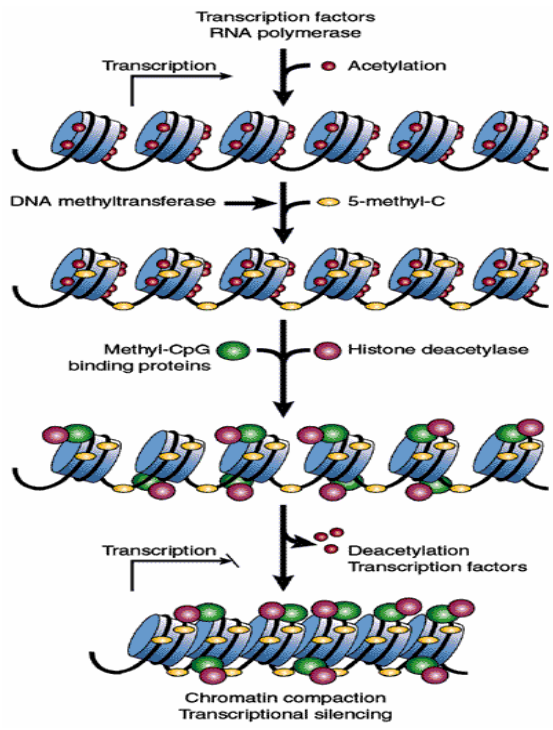


Figura III.2: Regiones transcripcionalmente activos tienden a no estar hipermetiladas. Si una región de ADN o un gen va a ser metilado, enzimas de remodelación de la cromatina comienzan el proceso de "cancelación" génico. El resultado de la metilación del ADN es finalmente la contracción de la cromatina. Esta región del ADN será mantenida entonces en un estado inactivo.

Imagen de http://www.med.ufl.edu/biochem/keithr/research.html

La síntesis de la proteína MGMT (O6-metilguanina-ADN metiltransferasa) en la región cromosómica 10q26 es frecuentemente anulada por hipermetilación en los gliomas difusos y esto ha sido señalado como un mecanismo epigenético de reducción de los niveles de expresión de MGMT. El poder predictivo del promotor MGMT se puede explicar por el hecho de que este gen codifica una proteína que "repara" el ADN dañado por agentes alquilantes quimioterapéuticos, tales como la temozolomida. Inducida por la quimioterapia, la alquilación del ADN desencadena citotoxicidad y apoptosis (muerte) celular, mientras que una alta concentración de MGMT en las células tumorales contrarresta los efectos citotóxicos pudiendo causar el fracaso del tratamiento. La metilación del promotor de MGMT, sin

embargo, impide la transcripción del gen, resultando en una falta de la proteína. Células de glioblastoma con la hipermetilación del promotor MGMT responden entonces mejor a la quimioterapia, ya que carecen de la capacidad para reparar el daño del ADN inducida por la terapia.

Es importante destacar que existe una asociación entre la metilación del promotor MGMT y la respuesta de los gliomas malignos a la quimioterapia alquilante con compuestos como nitrosourea[16], temozolomida[17], o una combinación de ambos[18] y al tratamiento de radioterapia[19] como a la combinación de quimio y radioterapia[20].

- Mutación IDH1 como marcador molecular en gliomas difusos

Las mutaciones en el gen que codifica la NADPH-dependiente isocitrato deshidrogenasa (IDH1), una enzima citosólica que participa en el ciclo del ácido cítrico, fueron originalmente identificadas en 2008[21].

Ya el documento original de Parsons et al. reconoció que la mutación IDH1 se asociaba a una prolongación de la supervivencia global en pacientes con glioblastomas. Posteriormente los estudios que se realizaron con gliomas difusos reafirmaron la asociación entre la mutación IDH1 y una mayor sobrevida [22-23].

Muchos trabajos conducen a la idea que estas mutaciones parecen representar un evento muy temprano de mutación que afecta a un grupo de células precursoras gliales comunes, y que, de hecho, forma parte de un requisito previo para la deleción 1p/19q y el desarrollo del tumor oligodendroglial. La presencia de mutaciones IDH1 en los gliomas parece estar estrechamente asociados con la metilación del promotor MGMT e inversamente correlacionada con la pérdida del cromosoma 10q y la amplificación del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR)[24].

Uno de los temas emergentes es que el estado de mutación del IDH en los gliomas es de gran importancia pronóstica, y existen propuestas para incluir el estado de mutación del IDH en la próxima versión de la clasificación de la OMS de gliomas. El/Los mecanismo/s de acción de la mutación IDH no se entienden totalmente, pero su comprensión puede proporcionar un mecanismo para vincular los diversos procesos pro-neoplásicos tales como el daño oxidativo y la desregulación epigenética.

Existen también otros marcadores moleculares, que si bien no tienen las caracteristicas para ser considerados biomarcadores, permiten ampliar la clasificación de los gliomas.

- - Rol de la amplificación y aberraciones de EGFR en gliomas

El **receptor del factor de crecimiento epidérmico** (**EGFR**) en 7p12 es el gen más frecuentemente amplificado y sobreexpresado en glioblastomas, que afecta a aproximadamente el 50% de estos tumores[25].

El EGFR es un receptor celular que se encuentra en la superficie de la células y es miembro de la familia de los factores de crecimiento epidérmico. La sobreexpresión de EGFR genera una cascada de transducción de señales, que conduce a la síntesis de ADN y a la proliferación celular (Fig. III.3). Estas proteínas modulan fenotipos tales como la migración, adhesión y proliferación celular.

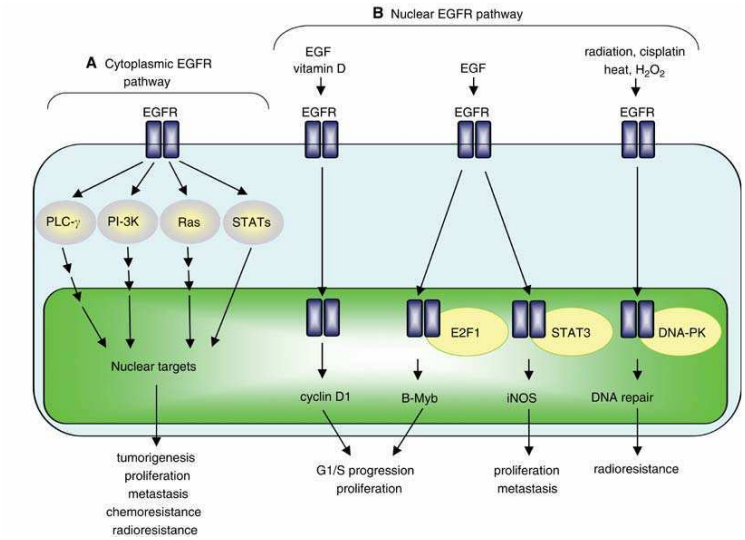


Figura III.3 Representación de los distintos procesos metabólicos y efectos cancerigenos que son iniciados por la sobreexpresión de EGFR. Imagen de British Journal of Cancer (2006) 94, pag. 184–188.

Así, la identificación de la amplificación EGFR es indicativa del grado de malignidad y ayuda por tanto al diagnóstico brindando cierta información sobre el pronóstico[26]. De hecho, la detección de la amplificación de EGFR en gliomas anaplásicos o de bajo grado sugiere fuertemente que estos tumores son más malignos que lo indicado por su histopatología con un impacto desfavorable en el pronóstico[27]. En glioblastomas primarios la asociación con el pronóstico es menos obvia, aunque también se relaciona la amplificación/aberración EGFR como factor de mal pronóstico[28-29].

- - Implicancias de la deleción del cromosoma 10q

La pérdida de heterocigosidad (LOH) en el cromosoma 10 es la lesión genética más frecuente en glioblastomas, presentándose aproximadamente en un 80% de los casos. Se ha observado la pérdida del cromosoma 10 completo en muchos de los GB, aunque también se observa la

pérdida de 10q pero no de 10p. En el cromosoma 10 se han identificado varios genes supresores de tumores (GST): *PTEN*, *DMBT1* (supresor de tumores cerebrales malignos), *FGFR2* (receptor del factor del crecimiento fibroblástico) y un gen reparador de ADN (*MGMT*) que sintetiza la proteína O6-metilguanina- DNAmetiltransferasa. Estos GST intervienen en el control del ciclo celular y reparación de ADN. En glioblastomas una copia de *PTEN*, *DMBT1*, *FGFR2* y/o *MGMT* se pierde normalmente por LOH 10q y la otra copia del gen está sujeta a mutaciones o a procesos epigenéticos que lo inactivan.

- - Implicancias de la alteración del gen CDKN2A del cromosoma 9q

La proteína p16 es codificada por el gen MTS1, también llamado CDKN2A, localizado en el cromosoma 9p y es una proteína supresora de tumores. La pérdida de función de p16, a través de varios mecanismos posibles como son deleción homocigótica, mutación, o hipermetilación de su promotor, inhibe a su vez la función de la conocida red antitumoral p53 en su vía de estrés oncogénico (Fig. III.4).

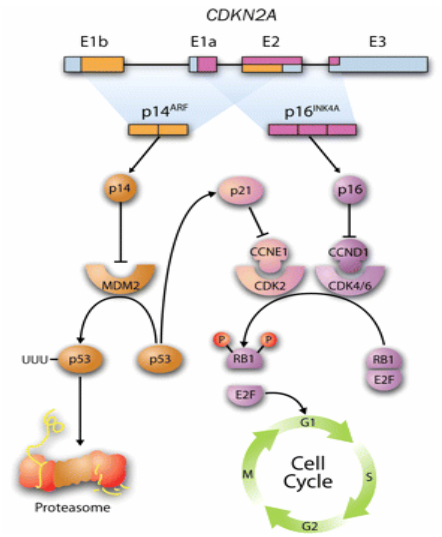


Figura III.4 Cadena de procesos metabólicos generados por el gen CDKN2A. La ausencia de p16, provoca la cancelación del proceso de "muerte celular" con la consecuente progresión del ciclo celular sin inhibiciones Imagen de *Mayo Clinic Proceedings July 2008 vol. 83 no. 7 825-846.*

El **gen p53** o **tp53**, también llamado el "guardián del genoma", se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p). El gen p53 es un gen supresor tumoral que desempeña un papel importante en la apoptosis y el control del ciclo celular. Un p53 defectuoso permite que las células anormales proliferen (alrededor de un 50 % de todos los tumores humanos contienen mutaciones en p53) y por tanto, la célula mantiene un programa de crecimiento celular descontrolado, promoviéndose la iniciación o progresión tumoral.

Referencias

[1] Bailey P, Cushing H. **A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis With a Correlated Study of Prognosis**. Philadelphia: JB Lippincott Co; 1926:175.

[2] Kernohan JW, Mabon RF, Svien HJ, Adson AW.: **A simplified classificationof gliomas**. *Proc Staff Meet Mayo Clin.* 1949;24:71–75.

[3] Ringertz J.: **Grading of gliomas**. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1950;27:51–64.

[4] Zulch KJ. **Histological Typing of Tumors of the Central Nervous System**. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1979.

[5] Kleihues P, Burger PC, Scheithauer **BW Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization. International histological classification of tumours**. Springer, Heidelberg (eds) (1993)

[6] Kleihues P, Cavenee WK **World Health Organization. Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system**. IARC Press, Lyon (eds) (2000)

[7] Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. **Grading of astrocytomas: a simple and reproducible method**. *Cancer.* 1988;62:2152–2165.

[8] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, CaveneeWK (eds**) WHO classification of tumours of the central nervous system**, 3rd edn. IARC Press, Lyon) (2007)

[9] Bruner JM, Inouye L, Fuller GN, Langford LA **Diagnostic discrepancies and their clinical impact in a neuropathology referral practice**. *Cancer* 79:796–803 (1997)

[10] Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK *Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas*. *Cancer* 79:1381–1391 (1997)

[11] Burger PC **What is an oligodendroglioma?** Brain Pathol 12:257–259 (2002)

[12] Kouwenhoven MC, Kros JM, French PJ et al **1p/19q loss within oligodendroglioma is predictive for response to first line temozolomide but not to salvage treatment**. *Eur J Cancer* 42:2499–2503 (2006)

[13] Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN **Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas**. *J Natl Cancer Inst* 90:1473–1479 (1998)

[14] Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, Kimmel D, Yates A, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB **Alterations** of **chromosome arms 1p** and **19q** as **predictors** of **survival** in **oligodendrogliomas**, **astrocytomas**, and **mixed oligoastrocytomas**.*J Clin Oncol.* 2000 Feb;18(3):636-45.

[15] Scheie D, Meling TR, Cvancarova M, Skullerud K, Mørk S, Lote K, Eide TJ, Helseth E, Beiske K. **Prognostic variables in oligodendroglial tumors: a single-institution study of 95 cases.***Neuro Oncol.* 2011 Nov;13(11):1225-33

[16] Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG **Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents**. *N Engl J Med* 343:1350–1354 (2000)

[17] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R **MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma**. *N Engl J Med* 352:997–1003 (2005)

[18] Herrlinger U, Rieger J, Koch D, Loeser S, Blaschke B, Kortmann RD, Steinbach JP, Hundsberger T, Wick W, Meyermann R, Tan TC, Sommer C, Bamberg M, Reifenberger G, Weller M **Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma**. *J Clin Oncol* 24:4412–4417 (2006)

[19] Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, Bekele BN, Aldape KD **MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma**. *Neuro Oncol.*2010 Feb;12(2):116-21.

[20] Minniti G, Salvati M, Arcella A, Buttarelli F, D'Elia A, Lanzetta G, Esposito V, Scarpino S, Maurizi Enrici R, Giangaspero F **Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in elderly patients with glioblastoma treated with radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide**.. *J Neurooncol.* 2011 Apr;102(2):311-6.

[21] Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW **An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme**. *Science* 321:1807–1812 (2008)

[22] Dubbink HJ, Taal W, van Marion R, Kros JM, van Heuvel I, Bromberg JE, Zonnenberg BA, Zonnenberg CB, Postma TJ, Gijtenbeek JM, Boogerd W, Groenendijk FH, Smitt PA, Dinjens WN, van den Bent MJ **IDH1 mutations in low-grade astrocytomas predict survival but not response to temozolomide.** *Neurology* 73:1792–1795 (2009)

[23] Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koeppen S, Ketter R, Meyermann R, Rapp M, Meisner C, Kortmann RD, Pietsch T, Wiestler OD, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, von Deimling A, Weller M **NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide**. *J Clin Oncol* 27:5874–5880 (2009)

[24] van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJ, Wesseling P, Frenay M, Tijssen CC, Lacombe D, Idbaih A, van Marion R, Kros JM, Dinjens WN, Gorlia T, Sanson M **IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group**. *Clin Cancer Res* 16:1597–1604 (2010)

[25] A Heimberger, D Suki David Yang W Shi and K Aldape **The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients** *J Transl Med*. 2005; 3: 38.

[26] Jeuken J, Sijben A, Alenda C, Rijntjes J, Dekkers M, Boots- Sprenger S, McLendon R, Wesseling P, **Robust detection of EGFR copy number changes and EGFR variant III: technical aspects and relevance for glioma diagnostics**. *Brain Pathol* 19:661–671 (2009)

[27] Jeuken JW, Sprenger SH, Boerman RH, von Deimling A, Teepen HL, van Overbeeke JJ, Wesseling P **Subtyping of oligo-astrocytic tumours by comparative genomic hybridization**. *J Pathol* 194:81–87 (2001)

[28] Dehais C, Laigle-Donadey F, Marie Y, Kujas M, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Pedretti M, Polivka M, Xuan KH, Thillet J, Delattre JY, Sanson M **Prognostic stratification of patients with anaplastic gliomas according to genetic profile**. *Cancer* 107:1891–1897 (2006)

[29] Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H, Hirano H, Kuratsu J, Oka K, Ishimaru Y, Ushio Y **Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme.** *Cancer Res* 63:6962–6970 (2003)

Capítulo IV

Cuantificación de espectros de resonancia magnética y análisis de concentraciones.

IV.1 Modelaje de Señales

IV.1.1 Introducción

La cuantificación de espectros clínicos y de alto campo es un modo de establecer comportamientos y tendencias de las patologías estudiadas. Las señales de ERM clínica en tumores se caracterizan por tener una baja SNR y superposición de picos. En estas circunstancias los algoritmos simples de procesamiento de señales como la integración numérica no son adecuados, por lo que se recurre a métodos más complejos. Estos métodos de cuantificación de espectros pueden ser llevados a cabo directamente en el dominio temporal (FID)[1] o alternativamente en el dominio de frecuencias luego de realizar una transformada discreta de Fourier (DFT)[2]. Aunque la elección de realizar el análisis en el dominio del tiempo o en el de frecuencias es teóricamente equivalente, el procesamiento de señales en el dominio temporal ofrece la ventaja de ajustar los picos espectrales disponiendo de un modelo matemático, mientras que en el espacio de las frecuencias a veces no existe expresión analítica exacta de tal función transformada[3]. Esto implica que las funciones del modelo matemático usado tienen una forma más simple en el dominio temporal y por ende su cálculo es más eficiente.

A su vez, los modelos temporales se categorizan en “métodos interactivos” y “métodos Black Box”. La principal diferencia se centra en la flexibilidad de incorporar conocimientos previos acerca de los picos/metabolitos del espectro con los métodos interactivos, mejorando así la exactitud de los parámetros estimados. Por esto, en general se utilizan programas interactivos en el procesamiento de ERM.

IV.1.2 Método de Estimados de Máxima Verosimilitud

El punto de partida del método de máxima verosimilitud es proponer una función distribución de probabilidad que describa los puntos medidos (datos) y que simbolizaremos como $y=[y_0,....,y_{N-1}]$.

Más precisamente, se asume que:

- Para cada dato, se conoce la función distribución de probabilidad relacionada con su ruido (o incerteza).

- Existe una función modelo (relación entre datos) que describe exactamente los datos en ausencia de ruido.

Conceptualmente, el método propone que la medición de cada dato que se midió corresponde al valor obtenido dado que existe una distribución de probabilidad a la que el fenómeno "obedece". Por ende, una serie de mediciones del mismo fenómeno será representada (en caso que sean eventos independientes) por la productoria de la distribución que representa una medición individual. Como hipótesis, esta distribución individual posee parámetros característicos que se mantienen constantes en el transcurso de la serie de mediciones. *El método de máxima verosimilitud*[4] *postula que los valores de estos parámetros son aquellos que hacen máxima la probabilidad de obtener esa serie de mediciones con los datos obtenidos*.

Se define entonces a tal productoria como "función de verosimilitud" y se escribe como $P(y|\alpha)$ donde y es el conjunto de datos tomados de los eventos y α el conjunto de parámetros de la distribución de probabilidad. Por esto, los parámetros α serán aquellos que maximicen la función de verosimilitud. Estos parámetros son estimados a partir de mediciones (muestreo de variables aleatorias) y por ello son consideradas variables aleatorias en sí. Los parámetros obtenidos al maximizar $P(y|\alpha)$ son llamados estimados de máxima verosimilitud (ML).

En el caso de tener ruido blanco Gaussiano con desvío estandar σ, para la parte Real e Imaginaria se tendrá:

$$P(y|\alpha)=\prod_{n=0}^{N-1}P(\mathrm{Re}(e_n)).P(\mathrm{Im}(e_n))=\frac{1}{(2\pi\sigma^2)^N}\prod_{n=0}^{N-1}e^{-(\mathrm{Re}(e_n))^2/2o^2}.e^{-(\mathrm{Im}(e_n))^2/2o^2}$$

$$\frac{1}{(2\pi\sigma^2)^N}\prod_{n=0}^{N-1}e^{-(\mathrm{Re}(y_n-\hat{y}_n))^2/2o^2}.e^{-(\mathrm{Im}(y_n-\hat{y}_n))^2/2o^2} \qquad \text{IV.1}$$

donde Re() e Im() denotan la parte real e imaginaria respectivamente de una cantidad compleja. Se utilizó también

$$y_n=\hat{y}_n+e_n$$

Con y_n el n-esimo dato medido de $\hat{y}_n$, el valor obtenido por las funciones de ajuste en el punto n y e_n el ruido blanco Gaussiano.

Maximizar P(y|α) es equivalente a maximizar el Log de la función de verosimilitud P(y|α)

$$L = \ln\left(\mathrm{P}(\mathrm{y} \mid \alpha)\right) = -N \ln(2\pi\sigma^2) - \frac{1}{2\sigma^2}\sum_{n=0}^{N-1}\left|y_n - \hat{y}_n\right|^2 \qquad \text{IV.2}$$

donde $|\ |$ representa el módulo de la cantidad compleja. La ecuación IV.2 muestra claramente que en el caso de ruido blanco Gaussiano, obtener el estimado de ML es lo mismo que minimizar la diferencia de cuadrados entre los datos (y_n) y la función modelo ($\hat{y}_n$) o equivalentemente, resolver un problema no lineal de cuadrados mínimos (NLLS). En notación vectorial la funcional para ser minimizada se escribe de la siguiente forma:

$$\left\|y - \bar{y}\right\|^2 \qquad \text{IV.3}$$

denotando la norma euclediana del vector

$$\bar{y} = \left[\bar{y}_0, \ldots\ldots\ldots, \bar{y}_{N-1}\right]^T$$

que representa los valores obtenidos de las funciones modelo de ajuste y donde el supraíndice T indica transpuesto.

IV.1.3 Funcional de proyección variable

Es posible obtener los estimados ML minimizando la llamada ***Funcional de proyección variable***[4].

Las funciones modelos utilizadas en el procesamiento de señales de ERM para ajustar N puntos de datos medidos y_n puede ser escrito como superposición de K funciones que forman una base

$$\bar{y}_n = \sum_{k=1}^{K} c_k \gamma_k(\alpha_k, n) \qquad n = 0, \ldots\ldots, N-1 \qquad \text{IV.4}$$

donde c_k es la amplitud compleja $a^k.e^{j\theta(k)}$ y $\gamma_k(\alpha_k,n)$ son funciones independientes de un vector α_k de parámetro no lineal. Usando notación matricial la ec. IV.4 se convierte en

$$\bar{y} = \Gamma c$$

con $c = [c_1, \ldots\ldots, c_k]^T$, y

$$\Gamma = \begin{bmatrix} \gamma_1(\alpha_1, 0) & \cdots & \gamma_k(\alpha_k, 0) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \gamma_1(\alpha_1, N-1) & \cdots & \gamma_k(\alpha_k, N-1) \end{bmatrix} \qquad \text{IV.5}$$

una matriz de rango N x K. Supongamos que los parámetros no lineales α_k con k=1,....,K son conocidos, entonces la matriz Γ puede ser calculada y un estimado para el parámetro lineal c es obtenido como solución de un problema lineal de cuadrados mínimos (LS):

$$\hat{c} = \Gamma^{+} y$$

con $\mathbf{\Gamma^{+}=(\Gamma^{H}\,\Gamma)^{-1}\,\Gamma^{H}}$ la pseudo inversa de $\mathbf{\Gamma}$ (el supraíndice H indica el complejo conjugado). La función IV.2 entonces se convierte en

$$\left\| y - \Gamma\,\Gamma^{+} y \right\|^{2} = \left\| P_{\Gamma}^{\perp} y \right\|^{2} \qquad \text{IV.6}$$

La ec. IV.6 define la funcional de proyección variable y $\mathbf{P_r^{\perp}}$ es la proyección ortogonal sobre la columna del espacio $\mathbf{\Gamma}$. Los parámetros lineales han sido eliminados por la función en ec. IV.6. Como resultado, se obtiene un problema de minimización de una cantidad reducida de variables.

Los estimados α_k son obtenidos como los parámetros que minimizan la ec. IV.6 resolviendo un problema de NLLS. Usando α_k se calcula la matriz Γ_Δ y los estimados de **c** son obtenidos como solución de LS de

$$\Gamma_\Delta\, c \approx y \quad \rightarrow \quad \hat{c} = \Gamma_\Delta^{+}\, y. \qquad \text{IV.7}$$

IV.2 jMRUI (java Magnetic Resonance User Interface)

IV.2.1 Introducción

jMRUI es un software dedicado principalmente al procesamiento y cuantificación en el dominio del tiempo de espectros “in-vivo” e “in vitro” por resonancia magnética[5-6]. Las dos técnicas de cuantificación mas poderosas de jMRUI son Amares[7] y Quest[8-9]. También es posible simular espectros teóricos de distintos metabolitos con RMN-SCOPE (Fig. IV.1) a través del formalismo de operador de matrices (matriz de densidad) si se conocen las constantes de acoplamiento y las frecuencias de resonancia de los núcleos de la molécula. La funcionalidad de RMN-SCOPE[10] permite especificar la secuencia especifica de excitación que se desea modelar (PRESS, STEAM, zpgr) con la amplitud y fase de los pulsos de RF y TE.

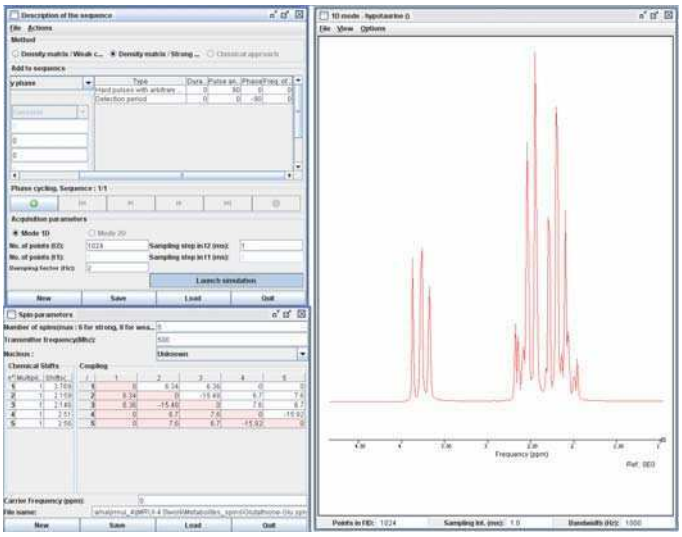


Figura IV.1: Espectro del glutation (GSH) generado por RMN Scope de un único pulso de RF de 90º. En la ventana superior derecha se especifica el pulso (PRESS, STEAM, hard), cantidad de puntos de la FID y decaimiento. En la ventana inferior izquierda se detallan los núcleos y la matriz de acoplamientos.

Además jMRUI permite crear espectros como la suma de picos individuales gaussianos/lorentzianos con la aplicación "Simulation" (Fig IV.2). Los parámetros para generar un espectro son la cantidad de puntos, amplitud, frecuencia de resonancia, fase y que porcentaje de gaussiana o lorentziana tendrá el pico. Los espectros generados con RMN SCOPE y Simulation pueden ser usados como espectros base en Quest (Ver IV.2.3).

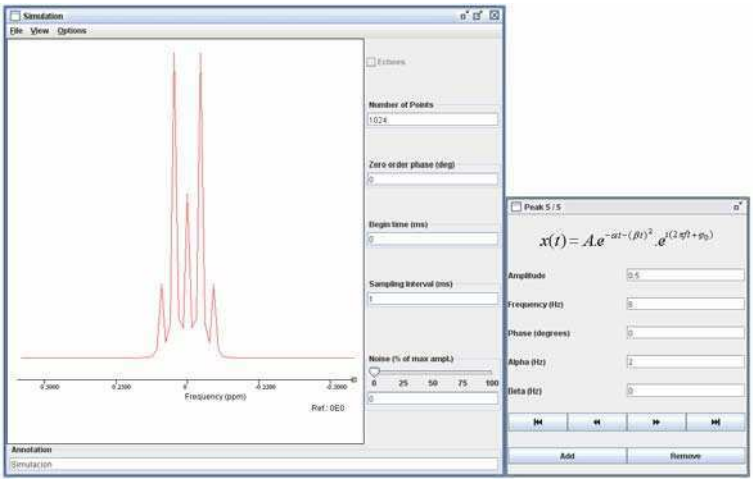


Figura IV.2: Espectro simétrico ficticio creado con Simulation a partir de 5 picos lorentzianos puros de distintas amplitudes. La ventana de la derecha muestra los parámetros para generar los distintos picos.

IV.2.2 AMARES

El primer método interactivo ampliamente disponible y utilizado en ERM para cuantificación de parámetros fue VARPRO. El método minimiza la funcional de proyección variable (ec IV.6). Posteriormente, se desarrolló un método mejorado llamado AMARES (*A*dvanced *M*ethod for *A*ccurate, *R*obust and *E*fficient *S*pectral fitting). AMARES minimiza la ecuación IV.3, usando un sofisticado algoritmo NLLS que permite la inclusión de conocimiento previo ("prior knowledge") sobre los parámetros α_k posibles de la señal y permite elegir la función a utilizar en el modelo (lorentziana o gaussiana), que le otorga una mayor precisión y flexibilidad.

AMARES utiliza, como funciones modelo para el ajuste de los N puntos de datos medidos, la sumatoria de sinusoides con decaimiento exponencial en el dominio del tiempo. Por esto, la expresión IV.4 muestra la forma

$$\bar{y}_n = \sum_{k=1}^{K} a_k e^{i\theta_k} \; e^{(-b_k^2(1-g+g\,t_n)\,t_n)} \; e^{i2\pi\, f_k\, t_n} \qquad \text{IV.8}$$

donde i es la unidad imaginaria (-1)½, a_k es la amplitud de la señal en el dominio del tiempo de la k-ésima función (o modo), θ_k su fase (denominada de orden 0), b^2_k su coeficiente de decaimiento (expresarlo a la segunda potencia asegura que sea positiva, aunque por simplicidad se lo designa como d_k), f_k su frecuencia ($w_k=2\pi f_k$), con $t_n = n\,\Delta t+t_0$, siendo Δt el intervalo de muestreo y t_0 es el tiempo efectivo entre el origen temporal de la señal y la adquisición del primer dato tomado en cuenta en el análisis (a la cantidad $i2\pi f_k t_0$ es llamada fase orden 1).

En la función modelo se puede seleccionar entre picos Gaussianos puros (g=1) o Lorentzianos puros (g=0) para la transformada discreta de Fourier (DFT) de la señal.

En este modelo la matriz IV.5 toma la siguiente forma

$$\Gamma = \begin{bmatrix} e^{(-b_1^2+i2\pi\, f_1)\,t_0} & \cdots & e^{(-b_k^2+i2\pi\, f_k)\,t_0} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ e^{(-b_1^2+i2\pi\, f_1)\,t_{N-1}} & \cdots & e^{(-b_K^2+i2\pi\, f_K)\,t_{N-1}} \end{bmatrix} \qquad \text{IV.9}$$

que al aplicar las relaciones y restricciones entre parámetros incluidas como conocimiento previo (sección IV.2.1.1) y luego de realizar la minimización por NLLS de la ec. IV.6 permite obtener los parámetros no lineales b^2_k, f_k, t_0. Luego mediante la ec. IV.7 se estiman

los parámetros lineales a_k y θ_k., completando el conjunto de parámetros que reproducen la señal original en el dominio del tiempo.

IV.2.2.1 Incorporación de Conocimiento Previo

A los funcionales $\bar{y}_n$ se le pueden incorporar relaciones y/o restricciones entre parámetros a estimar así como intervalos de valores posibles, lo que simplifica la estimación. Esta imposición de conocimiento previo aumenta la exactitud en la estimación del parámetro. El "conocimiento previo" son restricciones expresadas como igualdades lineales que son sustituidas en la funcional original, resultando en un problema de NLLS con restricciones (debido a que las relaciones entre los parámetros ya fueron incluidas). Las opciones de estas restricciones se enumeran en la Tabla IV.1.

Nombre de la restricción	Estimated	Fixed	Fixed shift	Fixed ratio	Variable shift
Descripción	Sin conocimiento previo de relaciones con parámetros de otros picos (a estimar automáticamente)	Sin relaciones con otro parámetro. Valor fijo (constante) conocido por el usurario.	Parámetro a estimar con corrimiento sistemático respecto del mismo parámetro de otro pico.	Parámetro a estimar pero con coeficiente de proporción conocido respecto del mismo parámetro de otro pico.	Parámetro a estimar con corrimiento variable (intervalo) respecto del mismo parámetro de otro pico.
Expresión matemática	X	$\alpha_l = cte$, con l=1,.....,K	$\alpha_l = \alpha_m + b$, con l≠m y l,m=1,.....,K.	$\alpha_l = a\,\alpha_m$ con l≠m y l,m=1,.....,K.	Mín $\alpha_l = \alpha_m + b$ Máx $\alpha_l = \alpha_m + c$ con l≠m y l,m=1,.....,K y b<c
Parámetros:					
Frecuencia	?	$f_{pico\,X} = cte1$	$f_{pico\,X} = f_{pico\,Y} + b1$	$f_{pico\,X} = a1\, f_{pico\,Y}$	$f_{pico\,X} = [\, f_{pico\,Y} + b1 , f_{pico\,Y} + c1]$
Fase	?	$\theta_{pico\,X} = cte2$	$\theta_{pico\,X} = \theta_{pico\,Y} + b2$	$\theta_{pico\,X} = a2\, \theta_{pico\,Y}$	$\theta_{pico\,X} = [\theta_{pico\,Y} + b2 , \theta_{pico\,Y} + c2]$
Decaimiento	?	$d_{pico\,X} = cte3$	$d_{pico\,X} = d_{pico\,Y} + b3$	$d_{pico\,X} = a3\, d_{pico\,Y}$	$d_{pico\,X} = [d_{pico\,Y} + b3 , d_{pico\,Y} + c3]$
Amplitud	?	$c_{pico\,X} = cte4$	$c_{pico\,X} = c_{pico\,Y} + b4$	$c_{pico\,X} = a4\, c_{pico\,Y}$	$c_{pico\,X} = [c_{pico\,Y} + b4 , c_{pico\,Y} + c4]$

NOTA: Aplicación a parámetros estimados (cada parámetro posee su propia expresión de restricción)

Tabla IV.1 Enumeración de restricciones incluidas como conocimiento previo en el método interactivo de estimación AMARES. En "descripción" se especifican las opciones de restricción y en parámetros los 4 parámetros que definen una función Lorentziana o Gaussina.

Por otro lado, por medio de optimizaciones locales, es posible obtener buenos valores de "inicio" al comenzar el proceso de minimización para las frecuencias y constantes de decaimiento (en el dominio de las frecuencias representan los anchos de los picos). Este procedimiento utilizado por el método AMARES, llamado "peak picking", resulta en una disminución de tiempos de cálculo. "Peak picking" permite al usuario indicar manualmente en el espectro la posición de un pico y el punto donde alcanza su media altura (FWHM relacionado con $1/T_2^*$, el decaimiento). El máximo del pico y el ancho donde alcanza su mitad de altura proveen los valores de partida para la frecuencia y FWHM en el cálculo de minimización (Fig. IV.3).

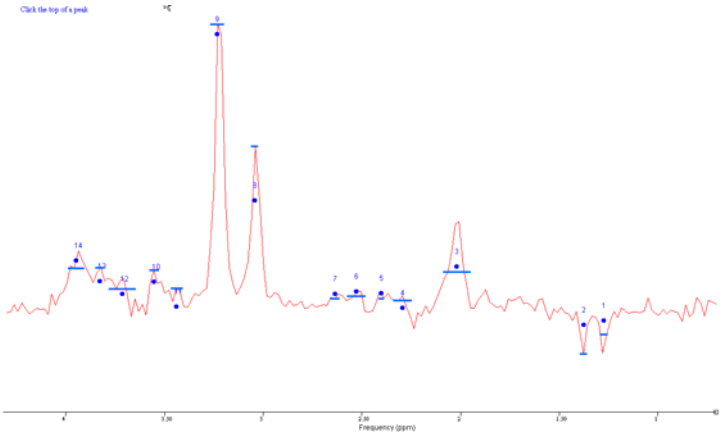


Figura IV.3: Espectro clínico de 136 ms donde se puede ver la ubicación y el FWHM de los picos mas relevantes realizado manualmente con "peak picking" previo a la cuantificación.

Este último paso en combinación con el conocimiento previo impuesto, establece una considerable interacción con el usuario. De allí el nombre de *"métodos interactivos"*.

IV.2.3 Quest

Un estudio de ERM contaminado por una señal de fondo indefinida, puede ser modelado por

$$x = \hat{x}_{\mathrm{Met}}(p) + b(\theta) + e \qquad \text{IV.10}$$

donde $\boldsymbol{x_{Met}}$ es la parte del metabolito cuyo modelo de función se conoce, $\boldsymbol{b(\theta)}$ la señal de fondo (background) cuyo modelo de función es a menudo conocido parcialmente, y $\boldsymbol{e}$ el ruido de distribución gaussiana.

Quest, si bien utiliza el mismo principio que Amares, se diferencia en que utiliza la aproximación

$$\hat{x}_n = \exp(i\phi_0) \sum_{m=1}^{M} a_m \hat{x}_n^m \exp[(\Delta\alpha_m + i\Delta\omega_m)t_n + i\Delta\phi_m] \qquad \text{IV.11}$$

para la ec. IV.4.

Donde los x_n es el conjunto de los puntos medidos y M=0,1…….M-1 son los metabolitos modelos que se quieren cuantificar por medio de los valores a_m. Entonces el vector a ser modelizado ahora es

$$[(a_m, \Delta\alpha_m, \Delta\omega_m, \Delta\phi_m), m = 1, 2, \ldots, M; \phi_0, t_0]^{\mathrm{T}} \qquad \text{IV.12}$$

O sea, con Quest se utiliza en conjunto de "FID`s" individuales", que representan las sustancias que se intentan modelizar y cuantificar (Fig IV.4), en vez de un conjunto de "FID`s" gaussianas o lorentzianas puras.

En el caso de los metabolitos conocidos, estos se pueden ingresar en el cálculo de minimización de la ecuación IV.3, pero en el caso de la señal de background (***b(θ)***) el método de análisis permite dos tipos distintos de modelizados:

1- Substracción: Se elimina los primeros puntos de la FID (truncación), que son los puntos que representan los metabolitos con los T_2 mas cortos que dan origen a la señal de base. Luego, de la comparación de las señales truncada y la sin truncar se obtiene la línea de base que se estima con SVD (Single Value Decomposition)[11] para obtener ***b(θ)*** en función de Gaussianas y/o Lorentzianas (parámetros θ). De la resta de **x** y ***b(θ)*** en la ecuación IV.10 se obtienen los x_{Met}.

2- Como alternativa, se puede ingresar la línea de base ***b(θ)*** estimada por SVD dentro del análisis de Quest como un metabolito más y volver a hacer la minimización de IV.3 , donde ahora la señal de línea de base aparece como un metabolito más en el resultado.

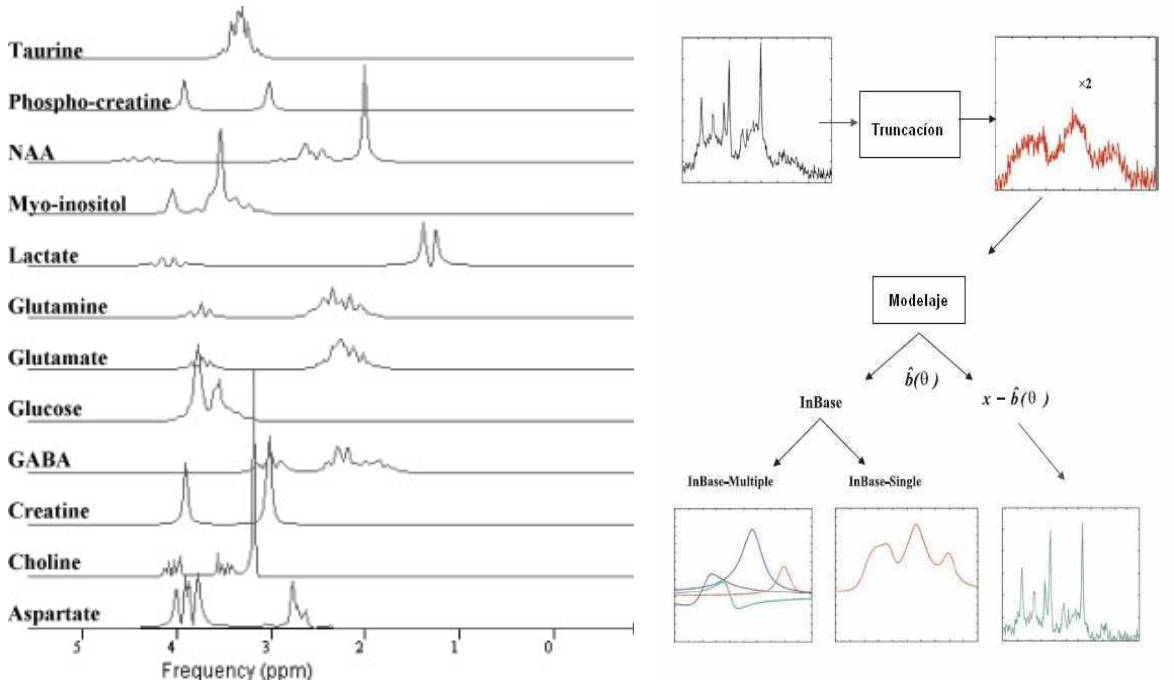


Figura IV.4: Conjunto de metabolitos utilizados para cuantificar un espectro y las diferentes opciones para estimar la línea de base ("background") generado por MM (macromoléculas). De ref [8] y [9].

Los resultados de las amplitudes "FID`s" que se obtienen con Quest y Amares son la fracción de las áreas de cada uno de las metabolitos o "picos" gaussianas/lorentzianas utilizadas en la base (Fig. IV.5). jMRUI estima también el error que tiene asociado cada "pico" o metabolito por el método de Cramer Rao, que indica el mínimo valor de error posible de la estimación y que depende fuertemente del grado de solapamiento entre picos y del ruido de la señal (Ver IV.3).

Numerical Results

Name	dFreq.(ppm)	dLinew.(Hz)	Amplitude	sd. Amp.	Phase(deg)
1 Acetate (Ace)	0.002	-0.74	3.152E3	364.18	0.0
2 Alanine (Ala)	0.002	0.23	3.25	0.0604	0.0
3 Aspartato	0.018	-1.06	33.70	9.45	0.0
4 Choline (Cho)	0.001	0.75	0.7302	0.0169	0.0
5 Creatine (Cr)	0.001	0.29	0.2751	3.748E-3	0.0
6 desconocido	-0.001	3.18	1.363E4	4.332E3	0.0
7 Desconocido2	0.001	0.38	0.3782	0.0141	0.0
8 Etanol	-0.001	0.22	2.258E4	812.80	0.0
9 Gamma-Amin...	-0.001	3.18	0.1528	8.609E-3	0.0
10 Glucose (Glc)	0.008	-2.11	4.843E3	476.06	0.0
11 Glutamato_ca	0.001	-0.36	2.181E4	353.43	0.0
12 Glutamina_ca	0.001	0.04	3.935E4	311.94	0.0
13 Glutathione_1	0.003	-0.45	1.45	0.0960	0.0
14 Glutathione_2	0.001	0.85	3.04	0.2393	0.0
15 Glycerocolina	0.000	0.72	0.7749	0.0235	0.0
16 Glycine (Gly)	0.000	-0.18	2.13	0.0102	0.0
17 Hypotaurine	0.001	0.38	3.385E4	757.44	0.0
18 Lacato1	0.001	-0.12	1.823E5	571.56	0.0
19 Lactato2	0.001	-0.28	1.045E5	1.620E3	0.0
20 Lipido_0.9_1	-0.002	3.18	31.90	1.50	0.0
21 Lipido_0.9_2	-0.003	-3.18	33.61	1.49	0.0
22 Lipido_1.2	-0.020	3.18	3.357E4	5.332E3	0.0
23 lipido_1.4	0.020	-3.18	1.048E5	6.475E3	0.0
24 Lipido_2.02	-0.013	-3.18	26.01	0.6123	0.0
25 Lipido_3	0.006	3.18	6.767E8	6.343E7	0.0

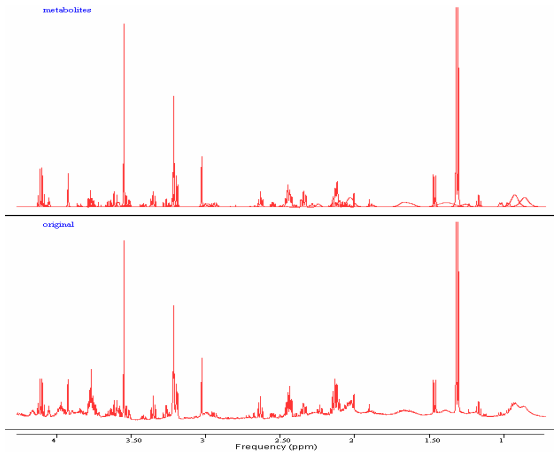


Figura IV.5: Detalle del resultado de un procesamiento por Quest de un espectro de alto campo donde se ve el conjunto de metabolitos utilizados, los corrimientos en frecuencia (en ppm) y decaimiento (en Hz), la fracción de amplitud, el coeficiente de Cramer Rao y el cambio de fase de cada metabolito estimado respecto del metabolito usado en la base.

IV.3 Valoración de la calidad de la estimación. Coeficientes de Cramer-Rao

IV.3.1 Introducción

Luego que una función modelo ajusta los parámetros de una señal de ERM, es importante conocer la desviación estándar posible de los mismos.

Para ello se utiliza la teoría de Cramer Rao (CR)[12]. Como hipótesis fundamental se asume que la función modelo es capaz de ajustar perfectamente los datos (señal o espectro) en ausencia de ruido. En presencia de ruido el ajuste es imperfecto, causando errores estadísticos en la estimación de sus parámetros. Por esto, cuando una medición se repite varias veces sus parámetros estimados mostrarían un abanico de valores. La teoría de CR provee el mínimo valor alcanzable de ese abanico, o desvío estándar para ese modelo determinado. Ese valor mínimo es llamado límite de CR o CRB (Cramer Rao Bound).

Es importante notar que el CRB teórico es independiente del procedimiento de ajuste utilizado para una función modelo determinada. Una consecuencia de esto es que ajustar datos tanto en el dominio del tiempo como en el de frecuencias da por resultado el mismo CRB para la función modelo en el dominio del tiempo y su correspondiente DFT en el de frecuencias. Esto puede entenderse como una transformación de los datos originados en el tiempo al dominio de las frecuencias, y puede considerarse como una parte de integración del procedimiento de ajuste.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es que los verdaderos valores de los parámetros del modelo, necesarios para el cálculo del CRB, sólo están disponibles en las simulaciones y no

en experimentos reales. Idealmente, el CRB se calcula a partir de los valores de los parámetros reales, entre ellos el de la desviación estándar del ruido. Como los verdaderos valores no están disponibles, es necesario recurrir a los valores estimados, que sufren del ruido experimental y del sesgo del estimador. Como consecuencia de ello, los CRB obtenidos de experimentos son en sí mismos resultado de una estimación. Dado que distintos ajustes producirán estimaciones de parámetros diferentes, se deduce que el CRB obtenido de estas estimaciones van a diferir.

IV.3.2 Ejemplo de cálculo de parámetros estimados de CRB en Amares

Para arribar a la expresión de CRB se debe presentar la matriz de información de Fisher[13]. Esta se define como:

$$\mathbf{F} = E\left[\left(\frac{\partial L}{\partial \mathbf{p}}\right)^T \left(\frac{\partial L}{\partial \mathbf{p}}\right)\right] \qquad \text{IV.13}$$

donde se entiende con E al valor esperado, L la función Log de verosimilitud dada por la ecuación IV.2 y $\mathbf{p}=[p_1,.....,p_{Np}]^T$, representa los N_p parámetros reales del modelo.

La matriz F puede ser expresada como la parte real y compleja de un producto de matrices, llegando a la forma:

$$\mathbf{F} = \frac{1}{\sigma^2}\Re(\mathbf{P}^T\mathbf{D}^H\mathbf{D}\,\mathbf{P}) \qquad \text{IV.14}$$

siendo $\mathbf{D}_{nl} = \frac{\partial \hat{y}_n}{\partial p_l}$ para n=0,1,.....,N-1 y l=1,2,.....,N_p. El supraíndice H denota conjugación hermítica, $\Re$ comprende la parte real y σ es la desviación estandar del ruido. La matriz D requiere del cálculo de las derivadas de las funciones y_n (funciones modelo de ajuste para el n-ésimo dato) con respecto del parámetro p_l. **P** es la matriz de conocimiento previo y es expresada como $\mathbf{P}_{lm} = \frac{\partial p_l}{\partial p_m}$ con m=1,2,.....,i siendo i el número de parámetros estimados sin restricciones. Las restricciones entre los parámetros se encuentran enumeradas en la Tabla IV.1 para AMARES y definen los componentes de la matriz ***P***. En caso que i =N_p, P es la matriz identidad (estimados sin conocimientos previos). Por esto, el tamaño de la matriz ***F*** es igual al número de parámetros estimados sin restricciones. La incorporación de conocimiento previo reduce el número de restricciones sobre los parámetros y consecuentemente el tamaño de la matriz de información ***F***.

Finalmente, el CRB de la desviación estándar del parámetro estimado p_l está dado por la desigualdad fundamental de Cramer Rao[14]:

$$\sigma_{p_l} \geq CRB_{p_l} = \sqrt{(\mathbf{F}^{-1})_{ll}} \qquad \text{IV.15}$$

con σ_{pl} el desvío estándar del valor del l-ésimo parámetro estimado y CRB_{pl} la raíz cuadrada del valor diagonal en la posición l de la matriz inversa de ***F***.

IV.3.3 Expresiones de CRB

Los siguientes dos ejemplos muestran la idea de CRB en el caso de espectros modelados por picos Lorentzianos aislados o que se superponen, donde se muestra como el error en el cálculo de las áreas depende del ancho (superposición) de los picos

IV.3.3.1 CRB para un pico aislado

Para un pico Lorentziano caracterizado por sus cuatro parámetros ***p***=(a,d,θ,w)^T (amplitud, decaimiento (o T_2), fase, desplazamiento) la matriz F^{-1} resulta[13]:

$$\mathbf{F}^{-1} = -\Delta t\,\sigma^2 \begin{array}{c} \begin{array}{cccc} \text{a} & \text{d} & \theta & \text{w} \end{array} \\ \begin{pmatrix} 4d & 4d^2/a & 0 & 0 \\ 4d^2/a & 8d^3/a^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 4d/a^2 & 4d^2/a^2 \\ 0 & 0 & 4d^2/a^2 & 8d^3/a^2 \end{pmatrix} \end{array} \qquad \text{IV.16}$$

lo que implica por IV.15, que:

$$\text{CRBa}^{\text{aislado}} = 2\sqrt{(-d)\Delta t}\,\sigma \qquad \text{IV.17}$$

$$\text{CRBd}^{\text{aislado}} = 2\sqrt{(-d)\Delta t}\,\sigma\,\frac{\sqrt{2}(-d)}{\text{a}} \qquad \text{IV.18}$$

$$\text{CRB}\theta^{\text{aislado}} = 2\sqrt{(-d)\Delta t}\,\sigma\,\frac{1}{a} \qquad \text{IV.19}$$

$$\text{CRBw}^{\text{aislado}} = 2\sqrt{(-d)\Delta t}\,\sigma\,\frac{\sqrt{2}(-d)}{\text{a}} \qquad \text{IV.20}$$

debido a que en la presente tesis utilizaremos básicamente el estimado de la amplitud **a**, debemos recurrir a su correspondiente CRBa (ec. IV.17).

Es importante notar que CRBa no depende del valor de su amplitud **a** y para intervalos de muestro constante Δt (cantidad de datos en el dominio del tiempo) es función de su constante de decaimiento **d** y del desvío estándar del ruido.

IV.3.3.2 CRB para picos con superposición.

Debido a que cada pico posee cuatro parámetros característicos en la función modelo en el dominio del tiempo (***p***=(a,d,θ,w)), una señal con K picos implica obtener una matriz de Fischer de tamaño 4K x 4K. Uno puede subdividir esta matriz en KxK bloques de tamaño 4x4 cada uno. Si la superposición de picos es despreciable solo los bloques ubicados en la diagonal principal poseen valores significativos. Cada bloque corresponde en particular al k-ésimo pico dado por sus parámetros. En condiciones en las que no hay superposición, la inversión de F puede realizarse para cada bloque k sobre la diagonal en forma separada.

Si los picos se superponen, supongamos el pico k con el k+1, los bloques fuera de la diagonal que conectan los bloques diagonales k y k+1 comienzan a tomar valores mas significativos.

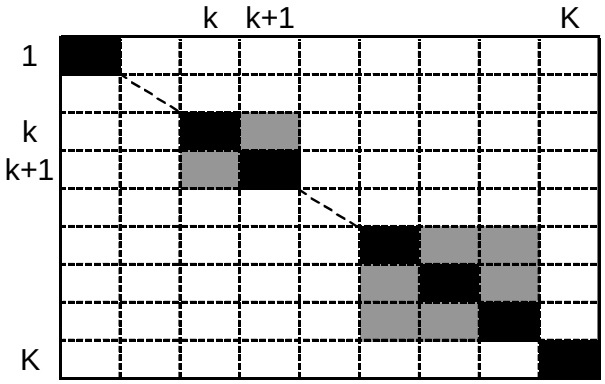


Figura IV.6: Ejemplo de una matriz F de información de Fisher particionada para una señal que contiene K picos. Cada cuadrado representa un bloque de 4x4. Los blancos son ceros o valores despreciables, los negros corresponden a los parámetros del pico aislado y los grises muestran valores significativos generados por superposición de los picos involucrados.

A mayor cantidad de picos superpuestos, mayor la cantidad de bloques no despreciables fuera de la diagonal que conectan los picos en cuestión. Como consecuencia de esto, la expresión analítica para la inversa de F toma una forma cada más compleja. (Fig. IV.6).

A continuación, se presenta la expresión para la superposición de dos picos bajo ciertas condiciones.

Sean a_1,d_1,θ_1,w_1 los parámetros pertenecientes al pico 1 y $a_2,d_2,\theta_2,w_2=w_1+\Delta w$ los correspondientes al pico 2 y asumiremos que $\theta_1=\theta_2$ para obtener una expresión mas simple de CRBs.

Definiremos el factor de superposición R, el factor de asimetría η y el de correlación C_w y $C_{a(1)}$ como:

$$R = \frac{d_1 + d_2}{\Delta w} \qquad \eta = \frac{d_1 - d_2}{d_1 + d_2} \qquad C_w = \frac{1 + R^2}{1 + R^2\eta^2} \geq 1$$

$$C_{a(1)} = \sqrt{\frac{(1+R^2)\left[(1+R^2)^2 + 4d_1'd_2'(1+d_2'^2 - 3d_1'^2 + 6d_1'd_2')\right]}{(1+R^2\eta^2)^3}}$$

respectivamente y $d_i' = d_i/\Delta w$ es el ancho relativo a la distancia entre picos.

La correlación $C_{a(2)}$ correspondiente a la amplitud del pico 2, se obtiene de intercambiar los subíndices 1 con 2 en $C_{a(1)}$.

Los correspondientes CRBs para picos superpuestos toman la siguiente forma[12]

$$CRBa_{1,2}^{\ superp} = C_{a(1,2)}\ CRBa^{\ aislado} = C_{a(1,2)}\ 2\sqrt{(-d_{1,2})\Delta t}\,\sigma \qquad \text{IV.21}$$

$$CRBd_{1,2}^{\ superp} = C_w\ CRBd^{\ aislado} = C_w\ 2\sqrt{(-d)\Delta t}\,\sigma\,\frac{\sqrt{2}(-d)}{a} \qquad \text{IV.22}$$

$$CRB\theta_{1,2}^{\ superp} = C_{a(1,2)}\ CRB\theta^{\ aislado} = C_{a(1,2)}\ 2\sqrt{(-d)\Delta t}\,\sigma\,\frac{1}{a} \qquad \text{IV.23}$$

$$CRBw_{1,2}^{\ superp} = C_w\ CRBw^{\ aislado} = C_w\ 2\sqrt{(-d)\Delta t}\,\sigma\,\frac{\sqrt{2}(-d)}{a} \qquad \text{IV.24}$$

Como puede apreciarse, tanto las correlaciones $C_{a(1)}$, $C_{a(2)}$ como sus CRBs no dependen de sus amplitudes sino del factor de superposición R y su cercanía, dada por sus posiciones relativas en frecuencias.

IV.4 Procesamiento segmentado (“bins”) de espectros de alto campo

IV.4.1 ACD/NMR Processor

ACD/NMR Labs[15] es un software de procesamiento y análisis de espectros de alto campo muy completo e intuitivo de usar, que permite realizar todas las operaciones básicas de procesamiento de espectros, como abrir archivos de distintos formatos de espectrómetros de alto campo (no permite abrir espectros clínicos), corrección de fase, alineación de picos, filtros, asignación de picos, asignar constantes de acoplamiento, integración, normalización de señales, operaciones matemáticas, ajuste básico de curvas, etc. En particular, permite realizar una segmentación manual del espectro (bins) previo a calcular la integración. La integración la determina como la suma acumulada de todos los puntos en el segmento asignado. Esta integración representa la “concentración” del pico (sustancia). Esta segmentación se puede guardar para ser aplicada a otros espectros, que al estar alienados

representará el mismo pico (sustancia). Esto lo hace particularmente interesante, ya que a diferencia de una segmentación automática que segmenta el espectro en “bins” de longitudes iguales y que segmenta “cortando” picos o grupos de metabolitos de interés (lo que implica una complicación en el análisis posterior); la segmentación manual permite segmentar el espectro según criterios de metabolitos. Esta última segmentación manual simplifica ampliamente el análisis posterior, al comparar metabolitos y no picos (Fig. IV.7).

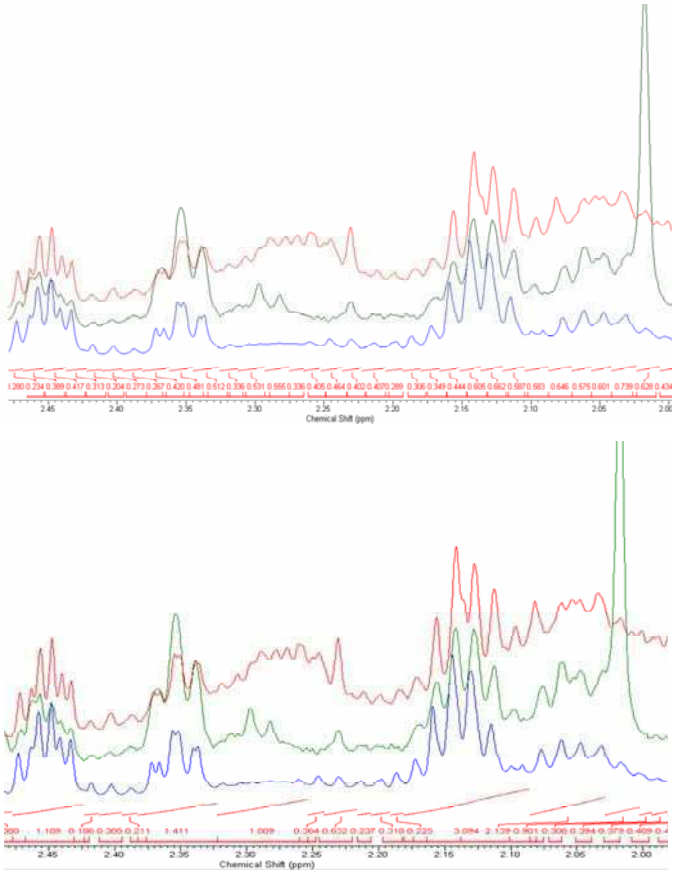


Figura IV.:7 Segmentación automática (izq.) y manual (der.) de un espectro de alto campo (1.9–2.5 ppm) en la región de Naa, Glu-Gln donde se puede ver como la segmentación manual permite definir mejor los metabolitos como conjunto y no como picos individuales

Los resultados de la integración se pueden exportar como archivo .txt para el análisis posterior de los datos.

IV.5 Análisis multivariados no supervisados y supervisados de datos metabólicos

IV.5.1 Método no supervisado - PCA

En estadística, el **análisis de componentes principales** (en inglés **PCA**) es una técnica utilizada para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos ya que se considera que mucha información esta fuertemente correlacionada[16-17]. Intuitivamente la técnica sirve para hallar las causas de la variabilidad de un conjunto de datos y ordenarlas por importancia. Se emplea básicamente como una herramienta en el análisis exploratorio de datos para resaltar grupos diferenciados dentro de una muestra de datos y para construir modelos predictivos por medio de un cálculo de descomposición en autovalores de la matriz de covarianza.

Supongamos que existen datos de n muestras para cada una de las cuales se han medido m variables (aleatorias). El PCA permite encontrar un número de factores $p < m$ que "explican" aproximadamente el valor de las m variables para cada muestra. El hecho de que existan estos p factores subyacentes puede interpretarse como una reducción de la dimensionalidad de los datos: donde antes necesitábamos m valores para caracterizar las muestras ahora nos bastan p valores. Cada uno de los p encontrados se llama **componente principal** (CP), de ahí el nombre del método.

PCA básicamente realiza una transformación lineal con el conjunto original de datos resaltando la mayor varianza entre ellos, La combinación lineal de estos datos genera un nuevos sistema de coordenadas en el cual primer eje (1er Componente Principal) es el que tiene máxima varianza, la segunda varianza más grande es el segundo eje, y así sucesivamente. Para construir esta transformación lineal debe construirse primero la matriz de covarianza o matriz de coeficientes de correlación. La transformación que lleva de las antiguas coordenadas a las coordenadas de la nueva base es precisamente la transformación lineal necesaria para reducir la dimensionalidad de datos.

Existen dos formas básicas de aplicar PCA:

1. Método basado en la matriz de correlación, cuando los datos no son dimensionalmente homogéneos o el orden de magnitud de las variables aleatorias medidas no es el mismo.

2. Método basado en la matriz de covarianzas, que se usa cuando los datos son dimensionalmente homogéneos y presentan valores medios similares.

Por el método de matriz de correlación se tiene una matriz Y de dimensión n que representa las muestras e X una matriz de ***nxm*** con los m valores aleatorios que caracterizan la n muestras.

Consideremos el valor de cada una de las *m* variables aleatorias F_j. Para cada uno de las *n* muestras el valor de estas variables forma la matriz:

$$(F_j^\beta)_{j=1,...,m}^{\beta=1,...,n}.$$

Obsérvese que cada conjunto

$$\mathcal{M}_j = \{F_j^\beta | \beta = 1, ..., n\}$$

puede considerarse una muestra aleatoria para la variable F_j. A partir de los $m \times n$ datos correspondientes a las *m* variables aleatorias, puede construirse la matriz de correlación muestral, que viene definida por:

$$\mathbf{R} = [r_{ij}] \in M_{m\times m} \qquad \text{donde} \qquad r_{ij} = \frac{\text{cov}(F_i, F_j)}{\sqrt{\text{var}(F_i)\text{var}(F_j)}}$$

Puesto que la matriz de correlaciones es simétrica entonces resulta diagonalizable y sus valores propios λ_i verifican:

$$\sum_{i=1}^{m} \lambda_i = 1$$

Debido a la propiedad anterior estos *m* valores propios reciben el nombre de pesos de cada uno de las *m* componentes principales. Los autovectores de las λ_i representan los nuevos ejes coordenados del sistema que resaltan la mayor diferencia de los *n* datos.

Una de las ventajas PCA para reducir la dimensionalidad de un grupo de datos, es que retiene en las primeras componentes aquellas características del conjunto de datos que contribuyen más a su varianza, y son estas componentes las que contienen el aspecto "más importante" de esa información.

Esta reducción de la dimensión va a permitir:

- Simplificar posteriores análisis, que se harána partir de un menor número de variables que el original.
- Una representación gráfica delos individuos en dimensión reducida (generalmente, 1 o 2).
- Examinar e interpretar las relaciones entre las variables observadas.

IV.5.2 Método supervisado - PLS-DA

Al examinar los datos, se puede tener un conocimiento "a priori" (matriz **Y**) acerca de cómo los objetos deben estar agrupados. En PCA los componentes principales del modelo resultante están orientados para dar cuenta de la variación máxima de los datos (matriz **X**). Los componentes principales no están desarrollados para discriminar mejor entre las clases definidas "a priori". En la Partial Least Square (PLS)[18-19-20] las componentes principales están orientadas de tal forma de tener en cuenta la variación máxima en los datos y, al mismo tiempo de maximizar la discriminación entre las clases "a priori".

Se ajusta entonces un modelo lineal multivariante como sigue

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X}\boldsymbol{B} + \mathbf{F} \quad \text{IV.25}$$

donde ***B*** es una matriz de coeficientes y ***F*** es una matriz de errores aleatorios. PLS es similar a PCA en el sentido de que produce nuevas variables (o puntajes) que son combinaciones lineales de las variables originales, como

$$T = XW \qquad \text{IV.26}$$

donde W es una matriz de las ponderaciones de la matriz de varaibles X, de de tal manera que T y X son ortogonales, y las columnas de la matriz T son llamadas "variables latentes" o "componentes latentes". PLS se basa en la siguiente descomposición:

$$X = TP + E \qquad \text{IV.27}$$

$$Y = TQ + F \qquad \text{IV.28}$$

donde **P** y **Q** son matrices de coeficientes (*loading*) y las matrices **E** y **F** son los errores. Las componentes latentes son usadas para predecir resultados en lugar de las variables originales. La matriz de coeficientes **Q** de la ecuación IV.27-28 se obtiene, como

$$\boldsymbol{Q'} = (\mathbf{T'T})–1\mathbf{T'Y} \qquad \text{IV.29}$$

Donde T´ es la transpuesta de T. Finalmente, la matriz ***B*** para el modelo está dada por

$$\boldsymbol{B'} = \mathbf{W}(\mathbf{T'T})–1\mathbf{T'Y} \quad \text{IV.30}$$

y la matriz respuesta ajustada podrá ser escrita con como:

$$\boldsymbol{Y'} = \mathbf{T}(\mathbf{T'T})–1\mathbf{T'Y} \quad \text{IV.31}$$

Para obtener los componentes principales, PLS maximiza la covarianza entre la variable de respuesta Y y una combinación lineal de las variables originales t = Xw, donde t es el vector score, X es la matriz de datos y w es el vector de pesos.

Que tan bien el modelo es capaz de representar los datos depende de la asociación entre el **X** y **Y**. Cuanto más fuerte es la relación entre el **X** y **Y**, mejor será el modelo capaz de representar los datos. PLS es un método paramétrico "supervisado". Se supone que tanto **X** y **Y** son datos con una distribución aproximadamente normal. PLS funciona mejor cuando los datos están simétricamente distribuidos y tienen una varianza de error aproximadamente constante. Distribuciones no normales de **X** y **Y** requieren una transformación de normalización previo al análisis PLS.

A efectos de clasificación, se aplica el Análisis Discriminante PLS (PLS-DA). En PLS-DA se utilizan variables discretas para describir las diferentes clases a las que las muestras se pueden asignar. Esto se hace mediante la creación de pares de variables, por ejemplo1 y 0, uno por cada clase, donde 1 significa que el objeto pertenece a la clase en cuestión, y 0 implica que no pertenece a esa clase (Fig. IV.8). Con un modelo PLS-DA también es posible predecir si un objeto pertenece a una clase específica al estimar la clase predicha por la variable.

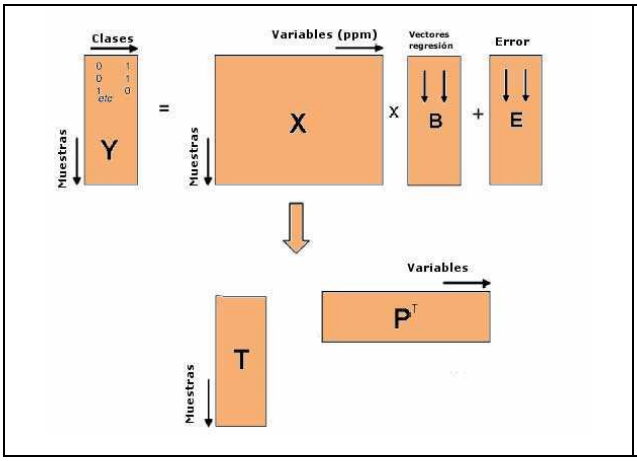


Figura IV.8: Esquema de la transformación PLS-DA que se aplica a un conjunto de datos donde se conoce la pertenencia o no de las muestras a una clase y que quiere conocer las variables que maximizan la diferencia de clases.

La capacidad de PCA y PLS-DA para modelar los datos se mide con el grado de "ajuste métrico". La bondad de ajuste métrico se denota por "R^2". R^2 es una medida de la capacidad del modelo de reproducir los datos del conjunto con la que se genero el modelo. R^2 varía de 0 a 1. Un valor de $R^2 = 0$ indica que el modelo no se ajusta a los datos en absoluto. Un valor de $R^2 = 1$ indica que el modelo se ajusta a los datos perfectamente. *R^2 aumenta con el número de componentes principales*. Si se utilizan un número suficiente de componentes principales entonces la bondad del ajuste se aproximará a la unidad. Sin embargo, el aumento del número de componentes principales para lograr la unidad es contraproducente ya que puede ser difícil de interpretar debido a la gran cantidad de variables. La capacidad predictiva del modelo se representa por "Q^2". Q^2 varía de 0 a 1. Q^2 es la fracción de la variación total de los datos que se puede explicar por las componentes principales. El valor de $Q^2 = 1$ indica que el modelo es

capaz de predecir los datos de la perfección. Un valor de $Q^2 = 0$ indica que el modelo es incapaz de predecir los datos. *Q^2 difiere de R^2 en que Q^2 no se acerca a la unidad cuando el número de componentes principales aumenta. El número óptimo de componentes principales pueden ser definidos por el cálculo de Q^2*. Q^2 aumenta con el número de componentes hasta un máximo, más allá del cual la capacidad predictiva del modelo no se incrementa. El número de componentes principales necesarios se calcula a partir del momento en que se maximiza la Q^2.

El número de componentes principales necesarios para representar los datos varía y depende de la complejidad inherente de los datos. Datos complejos, es decir, datos con una gran variación, por lo general requieren un mayor número de componentes principales para que los representen en comparación con los datos relativamente simples.

Una herramienta adicional de análisis utilizado en PLS, que no se encuentra en PCA, es el "variable importance projection" (VIP). El VIP es útil en la identificación de aquellas variables que son más influyentes en la generación del modelo. Las variables con valores más altos VIP son más influyentes en la clasificación generada que las variables con valores bajos.

Es recomendable realizar un análisis de PCA previo al análisis PLS. El resultado de PCA ayuda en la identificación de variables atípicas y muestras "outliers" que pueden ser removidas antes del modelado PLS. Los gráficos de las distribuciones de datos en función de las componentes principales es un modo muy eficaz de analizar los resultados (Fig. IV.9).

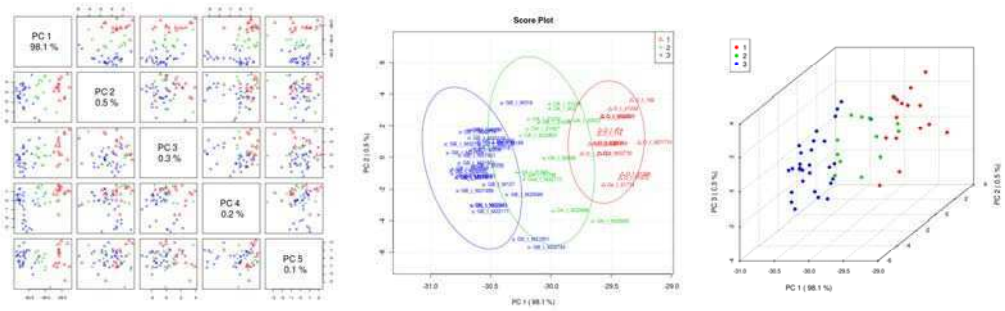


Figura IV.9: Posibles representaciones graficas de un análisis PCA o PLS-DA de un conjunto de datos con 3 clases de tumores cerebrales diferenciados (O, OA, GB). Distribución 2D por pares de CP (Izq.), distribución 2D de dos CPs con curva de intervalo de confianza (centro) y distribución de datos 3D de tres CP (CP, Componentes principales).

IV.6 Procesamiento estadístico metabólico - MetaboAnalyst

MetaboAnalyst[21-22] es una herramienta de procesamiento de datos metabolómicos, que opera bajo una aplicación remota en la web, armada en base a distintos paquetes de análisis

estadísticos. La aplicación acepta una variedad de entrada de datos (RMN, concentración de metabolitos o espectros segmentados, espectroscopia de masa, etc.) en una amplia variedad de formatos. Ofrece una serie de opciones para el procesamiento de datos metabolómicos como normalización de datos, análisis estadístico multivariado, gráficos, identificación de metabolitos y mapeo de la vía metabólica. En particular, MetaboAnalyst permite aplicar técnicas estadísticas tales como, t-test, PCA, PLS-DA, agrupación jerárquica y una serie de métodos estadísticos de aprendizaje automático. También cuenta con una biblioteca que permite identificar sustancias por sus picos en un espectro para facilitar la identificación de compuestos. MetaboAnalyst es un programa de uso muy intuitivo que realiza el análisis de los datos paso a paso, con una variedad de menús y enlaces de información. Al finalizar, el servidor genera un informe detallado describiendo cada método utilizado con los gráficos generados y las tablas de los datos procesados.

IV.6.1 Descripción del programa y métodos

La Interfaz web de MetaboAnalyst se ha desarrollado utilizando Java Server Faces (JSF) El cálculo estadístico y las operaciones de visualización se realiza mediante funciones que pertenecen a los paquetes de R y Bioconductor.

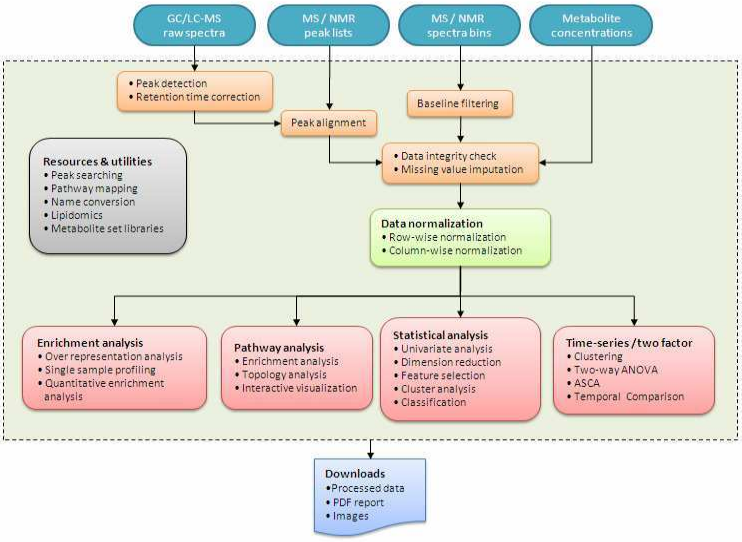


Figura IV.10: Diagrama de flujo del MetaboAnalyst. Los marcos naranjas refieren a pre-procesamiento de la señal, la verde a normalización de los datos de las muestras y rojos los distintos métodos estadísticos e identificación de sustancias o mecanismos metabólicos posibles (de [21]).

El diagrama de flujo que ilustra la Figura IV.10 muestra funcionamiento de MetaboAnalyst. MetaboAnalyst no es un herramienta de análisis del estilo "un clic", sino que se trata de un análisis “on line” que principalmente permite a los usuarios llevar a cabo análisis discriminante (es decir, control frente a no-control, el tipo más común de análisis de

metabolómica) para la clasificación e identificación de las "características más importantes de cada grupo”. Un análisis de datos típico con MetaboAnalyst consiste en seis pasos: (i) carga de datos, (ii) verificación de datos y filtros, (iii) la normalización, (iv) análisis estadístico, (v) identificación de sustancias (vi) resumen y descarga de tablas y gráficos. Este proceso es “guiado” por una interfaz muy intuitiva. Descripciones mas detalladas, archivos de ayuda o consejos útiles se muestran tanto en las páginas web del programa y globos “pop-up”.

Referencias

[1] Leentje Vanhamme, Sabine Van Huffel, and Paul Van Hecke **Time-Domain Spectroscopic Quantitation** *Signal Processing for Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy* Cap 16 Marcel Dekker, Inc 2002

[2].Provencher SW **Automatic quantitation of localized in vivo 1H spectra with LCModel.**. *NMR Biomed.* Jun;14(IV):260-IV (2001)

[3] Poullet JB, Sima DM, Van Huffel S. **ERM signal quantitation: a review of time- and frequency-domain methods.***J Magn Reson.* Dec 2008;195(2):134-44..

[4] Leentje Vanhamme **Advance time-domain methods for nuclear magnetic resonance spectroscopy dara analysis** *PhD Thesis* Leuven University 1999

[5] http://www.mrui.uab.es/mrui

[6] D Stefan, F Di Cesare, A Andrasescu, E Popa, A Lazariev, E Vescovo, O Strba4, S Williams, Z Starcuk, M Cabanas, D van Ormondt and D Graveron-Demilly **Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals: the jMRUI software package** *Measurement Science and Technology* Volume 20 Number 10

[7] Leentje Vanhammea, Aad van den Boogaartb and Sabine Van Huffela **Improved Method for Accurate and Efficient Quantification of ERM Data with Use of Prior Knowledge** *Journal of Magnetic Resonance*, November, Pages 35-43 (1997)

[8] Ratiney, Y. Coenradie, S. Cavassila, D. van Ormondt, D. Graveron-Demilly, **Time-Domain Quantitation of ^{1}H Short Echo-Time Signals: Background Accomodation**, MAGMA 16, 284-296, (2004)

[9] Ratiney H, Sdika M, Coenradie Y, Cavassila S, van Ormondt D, Graveron-Demilly D.**Time-domain semi-parametric estimation based on a metabolite basis set**.*NMR Biomed.* 2005 Feb;18(1):1-13.

[10] D. Graveron-Demilly, A. Diop, A. Briguet, and B. Fenet, **Product-operator algebra for strongly coupled spin systems,** *Journal of Magnetic Resonance*, vol. A101, pp. 233–239, (1993)

[11] W. W. F. Pijnappel, A. van den Boogaart, R. de Beer, and D. van Ormondt, **SVD-based quantification of magnetic resonance signals**, *J. Magn. Reson.* **97,** 122–134 (1992)

[12] Sophie Cavassila and Danielle Graveron-Demilly Dirk van Ormondt **Cramer–Rao Bound Analysis of Spectroscopic Signal Processing Methods** *Signal Processing for Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy Cap 21* Marcel Dekker, Inc 2002

[13] http://en.wikipedia.org/wiki/Fisher_information

[14] S. Cavassila S. Deval, C. Huegen, D. van Ormondt, D. Graveron-Demilly' **Cramér–Rao bounds: an evaluation tool for quantitation** *MR Biomed.*;June 14:278–283 (2001)

[15] http://www.acdlabs.com

[16] http://www.snl.salk.edu/~shlens/pca.pdf

[17] http://es.wikipedia.org/wiki/Análisis_de_componentes_principales

[18] Geladi P, Kowalski BR. **Partial least squares regression: A tutorial**. *Anal Chim Acta*; 185: 1-17 (1986).

[19] http://en.wikipedia.org/wiki/Partial_least_squares_regression

[20] Svante Wold Michael Sjostroma, Lennart Eriksson **PLS-regression: a basic tool of chemometrics** Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 58 2001. 109–130

[21] Jianguo Xia, Nick Psychogios, Nelson Young, and David S. Wishart. **MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation** *Nucleic Acids Research* July 1, 37 W652-60 (2009)

[22] Jianguo Xia David S Wishart **Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst** *Nature Protocols* 6, 743–760 (2011)

Capítulo V

Estimación del número de adquisiciones necesarias para una cuantificación precisa de un espectro clínico de hidrógeno a partir de espectros sin cancelación de agua

V.1 Introducción

Toda espectroscopia clínica implica la homogenización del campo magnético dentro del voxel para tener la mejor calidad del espectro posible.

La utilidad de la MRS de ^{1}H monovoxel en las lesiones de aspecto tumoral es reconocida y es utilizada en la mayoría de los centros de resonancia clínica como un estudio de rutina[1-2-3]. Esta se realiza pre y post cirugía por la información metabólica adicional que brinda del tumor. Varios grupos trabajan con MRS de tumores tratando de encontrar patrones que permitan caracterizar tanto el tipo histológico como su grado de agresividad[4-5-6] previo a la cirugía, así como la detección de cualquier cambio que se produzca durante su evolución clínica[7].

Un problema inherente a la MRS de tumores cerebrales es que, a diferencia de otros estudios como las demencias o patologías cerebrales difusas, el tamaño, la localización de la lesión y la densidad de tejido es variable, y por lo tanto también lo será la ubicación, el tamaño del voxel y la cantidad de señal medida. El tamaño de las lesiones de aspecto tumoral es generalmente bien determinada por las imágenes convencionales y es importante para adquirir el espectro del tumor y no del tejido "normal" que lo rodea porque este “contamina” el espectro. Esa es la razón por la cual el tamaño del voxel depende del tamaño del tumor. También, dado que la región del cerebro donde aparecen los tumores es variable, la homogeneización del campo magnético en el voxel es variable[8], lo que hace que la calidad del espectro también varíe por su ubicación. Un factor que suma variabilidad al estudio en tumores es que a veces, post-cirugía, quedan residuos de sangre o pequeños restos de metal en el hueso que complican la homogenización. Además, existe la posibilidad de que en su evolución el tumor calcifique, un factor más que dificulta la homogeneización.

La forma habitual para compensar un tamaño reducido del voxel y/o una mala homogeneidad es aumentar el número de adquisiciones, lo que provoca un aumento en el tiempo del estudio. El tiempo es un factor limitante en la mayoría de los estudios de resonancia clínica por el cansancio que puede sentir el paciente al permanecer quieto, ya que, un estudio completo de

un tumor cerebral puede durar entre 1-1:30 hs, teniendo en cuenta las secuencias convencionales y funcionales.

El análisis más simple de los espectros clínicos es considerar el espectro como una curva, donde no se realiza una cuantificación y sólo se analiza la forma del espectro. Es sólo un análisis cualitativo y es el análisis más común que se realiza en la mayoría de los centros clínicos de MRI, pero es limitado, ya que la calidad de los espectros no siempre es constante, ni siquiera para el mismo paciente en un estudio longitudinal. Por otro lado, hay varios métodos de cuantificación de espectros clínicos con "softwares" dedicados, tanto proporcionados por los proveedores de los resonadores como programas comerciales o gratuitos[9-10]. El principal problema es que la calidad de los espectros a menudo es muy variable y no es posible afirmar sí, elegido un método de cuantificación, un espectro será cuantificable.

Con los espectros monovoxel, para realizar una corrección de fase y compensar distorsiones de las corrientes de Eddy[11] en el espectro[12], todos los resonadores realizan una adquisición inicial ***sin*** la cancelación del agua que convolucionan con el espectro ***con*** el agua cancelada.

El objetivo de este trabajo es establecer si es posible tener en cuenta ciertos valores de la adquisición sin cancelación del agua que permitan establecer el número necesario de adquisiciones para asegurar que el espectro sea cuantificable para una determinada técnica de cuantificación. El objetivo es optimizar el tiempo de estudio manteniendo la calidad del espectro. Aquí, por el número de adquisiciones se entiende el número de veces que se repite la secuencia para mejorar la SNR.

En este trabajo fueron analizados un grupo de tumores con un tamaño de voxel entre 2,644 cm^3 a 9 cm^3 (33% a 113% en relación con el voxel clásico de 8 cm^3) y examinados con tres técnicas. Uno de ellos es un análisis puramente clínico (cualitativo o visual), y dos métodos cuantitativos (Quest y AMARES), donde los metabolitos son cuantificados (Lip, MM, Naa, Glu, Gln, Cr, Cho y Mio/Gly) con jMRUI[13], un programa para el análisis de espectros clínicos.

V.2 Teoría

La ecuación básica de la SNR de la espectroscopía monovoxel

$$SNR \propto Voxel\sqrt{N} \qquad \text{V.1a}$$

Indica cuanto debe aumentar el número de adquisiciones (N) con el fin de mantener la

relación señal a ruido (SNR), si cambia el tamaño de voxel. Pero como lo que se busca es establecer el número mínimo de adquisiciones necesarias para conseguir un espectro cuantificable dado un método de cuantificación, de forma intuitiva se tiene que:

$$N_{\min} \propto (SNR)^{b1}(Voxel)^{b2} \qquad \text{V.1b}$$

donde b1 y b2 deben ser valores negativos, ya que expresa que para una mejor SNR y un mayor tamaño de voxel serán necesarias menos adquisiciones. Es posible que estas dos variables tengan una cierta dependencia, pero a fin de lograr la mayor generalidad se analizan de forma independiente. Una ecuación mejorada, considera el ancho a media altura del pico de agua (Fw=FWHM), como un modo de considerar la homogeneidad del campo magnético en el voxel

$$N_{\min} \propto (SNR)^{b1}(Voxel)^{b2}(Fw)^{b3} \qquad \text{V.2}$$

donde b3 debe ser positivo ya que una mejor homogeneización implica una mejor calidad de los picos y por lo tanto un menor número de adquisiciones. El SNR se define en general como el cociente entre el pico más alto (máximo) de la región de interés del espectro (0-4,5 ppm) y el ruido ("*Noise*", desviación estándar de los últimos puntos del espectro). Siendo tan grande la variabilidad de la calidad de los espectros de tumores, el pico más alto puede ser cualquiera de los más importantes (Lip, Lac, NAA, Cr, Cho o Mio). Aquí se considerará, para estandarizar el métodos de análisis, a la Cr como el pico de referencia (Max_{Cr}) por lo que ec V.2 sería

$$N_{\min} \propto \left({Max_{Cr}}/{Noise} \right)^{b1}(Voxel)^{b2}(Fw)^{b3} \qquad \text{V.3}$$

Una ecuación más general es

$$N = (Max_{Cr})^{b4}(Noise)^{b5}(Voxel)^{b2}(Fw)^{b3}(P_{Cr})^{b6} \qquad \text{V.4}$$

donde P_{Cr} es el porcentaje de la sección donde claramente se define el pico de Cr del espectro, en relación con Max_{Cr} (Fig V.1). Se supone que b4 y b6 deberían ser negativos y b5 positivo. Es importante recordar que estas variables definidas pueden no ser independientes. Ese podría ser el caso de la Max_{Cr} con Voxel y Fw con P_{Cr}.

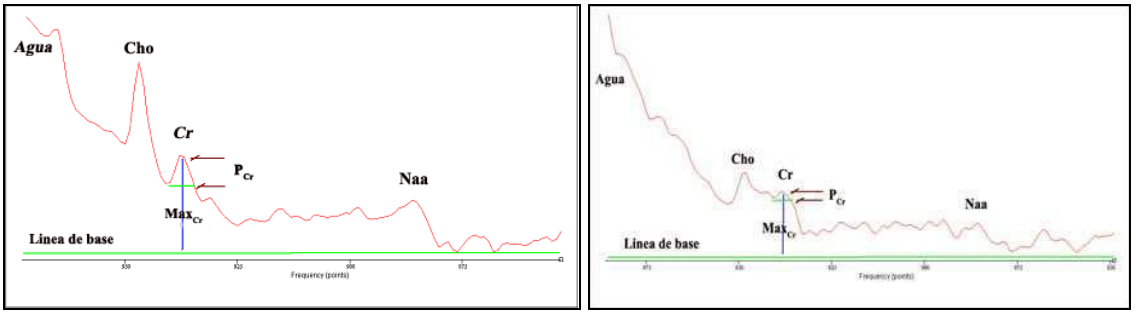


Figura V.1: Descripción gráfica de los parámetros Max_{Cr} y P_{Cr} en dos espectros sin cancelación de agua con diferentes SNR.

V.3 Métodos

V.3.1 Adquisición de los espectros

Fueron analizados 36 espectros adquiridos de 33 pacientes con tumores cerebrales. Cada espectro fue adquirido en un resonador 1,5 Teslas GE CVi. La cirugía y la anatomía patológica se realizaron en la misma institución que el estudio de imágenes. Todos los espectros se hicieron a petición médica con el fin de considerar el tipo de tumor (agresividad) o la evolución de los mismos. En este análisis no se especifica si el estudio fue antes de la cirugía o un estudio de control y si el paciente estaba medicado y/o bajo tratamiento (corticoides, radioterapia o quimioterapia). Tampoco se tiene en cuenta el tipo de tumor.

Todos los espectros se realizaron con el voxel localizado sobre el del tumor, tratando de maximizar el tamaño de voxel sin tomar tejido de aspecto normal, evitando también las regiones que evidenciaban la presencia de calcio o de la sangre y de regiones cercanas al aire y/o hueso. Los espectros se hicieron después de la inyección de gadolinio tratando de localizar el voxel en la región que captaba contraste, si hubiera una. Algunos espectros se localizaron después de una espectroscopia multivoxel para establecer la región más agresiva del tumor. Todos los espectros se realizaron con la secuencia PRESS, TR = 2000 seg. y TE = 30 mseg. La homogeneización del campo magnético del voxel y la cancelación del agua se realizaron de forma automática por el resonador.

El número de adquisiciones fue determinado básicamente por la experiencia del operador del resonador, y se ajustó en función del tamaño y la ubicación del voxel. El número de adquisiciones varió entonces de 64 hasta 256, siendo en su mayoría de 128 y 192. Como el resonador guarda todas las adquisiciones en grupos de 8 que son sumadas, si el estudio se realizó con 128 adquisiciones, el archivo del espectro contendrá 16 (128/8) espectros independientes formado por 8 adquisiciones. Antes de la adquisición con la cancelación de agua, dos espectros independientes sin cancelación de agua son salvados (o sea, se realizaron 16 adquisiciones). La FID de cada adquisición consistió de 2.048 puntos y un ancho de banda

de 2500 Hertz. Los espectros se exportaron a una computadora para su análisis con software jMRUI 2,1[12].

V.3.2 Análisis de los espectros

- V.3.2.1 Adquisición sin cancelación de agua.

Los dos espectros fueron sumados y auto-convolucionados para corregir las fases y las corrientes de Eddy. Este espectro fue apodizado con un filtro gaussiano de 5 Hz y el ancho de línea (Fw) del pico de agua se calculó con AMARES. Por ultimo, este espectro se exportó como un archivo de texto.

En este archivo de texto se calcularon las siguientes variables

1. Ruido (*Noise*): La desviación estándar de los últimos 150 puntos del espectro
2. Altura del pico de Cr (Max_{Cr}): Este valor se calcula como el valor máximo del conjunto de puntos entre 929 y 946 del archivo de texto, en relación con el promedio de los últimos 300 puntos del espectro (línea de base). (Fig V.1)
3. Porcentaje del pico visible de Cr en relación con Max_{Cr} (P_{Cr}). Este es un parámetro que considera la separación máxima de Cr a la línea del espectro. (Fig V.1)
4. *SNR* fue considerado como Max_{Cr}/Noise

El volumen del voxel (*Voxel*) se obtuvo del encabezado (“header”) Dicom de los espectros.

- V.3.2.2 Adquisición con cancelación de agua

Los espectros adquiridos fueron sumados y agrupados de a 8, hasta completar el total de todas las adquisiciones. Por lo tanto, de un estudio de 128 adquisiciones, 15 espectros correspondientes a la suma de 16, 24, 32 .... y 128 adquisiciones parciales fueron analizados (Fig. V.2) Este conjunto de espectros se convolucionó con el espectro sin la cancelación del agua, luego fueron alineados respecto al pico del agua residual y apodizados con un filtro gaussiano de 5 Hertz. Por último los picos de agua residual se eliminaron por medio de un filtro de Descomposición Singular de Valores Hankel Lanczos (HLSVD). Previo a realizar la cuantificación se controló que la forma de cada espectro después de la eliminación del agua se mantuviera estable, ya que en ocasiones la cancelación de agua distorsiona notablemente algunos espectros.

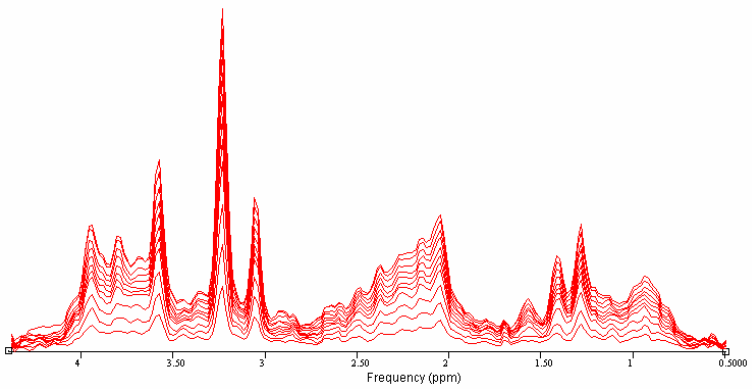


Figura V.2: Superposición de las sumas parciales de a 8 adquisiciones de un espectro con 96 adquisiciones.

V.3.3 Procesamiento

Cada grupo de espectros se analizaron a través de tres técnicas diferentes, una de carácter cualitativo (análisis "clínico", donde se analiza la calidad de la curva), y dos cuantitativos proporcionados por jMRUI, AMARES y Quest.

- V.3.3.1 Análisis clínico

El "perfil" de los espectros se analizó comparando entre sí las sumas parciales de cada espectro para determinar el número de adquisiciones a partir del cual la forma del espectro no mostró cambios significativos a la vista de un radiólogo. Todas las sumas parciales se normalizaron con el fin de mantener el tamaño relativo entre ellos. El objetivo del análisis fue la definición del número adquisiciones para relacionarlos con los parámetros definidos anteriormente. El análisis del espectro según el perfil de la curva es el método con el que se informan los espectros en la mayoría de los centros de imagen.

- V.3.3.2 AMARES

Se analizaron 25 picos por el método de AMARES cuando había lactato a 1,3-1,35 ppm, ó 23, cuando el doblete del lactato no aparecía en el espectro. Los picos de 1-3 ppm identifican a las MM y Lip (Lípidos y Macromoléculas), 24 y 25 Lac (Lactato), 5 Naa (N-acetilaspartato), 6-10 Glu (Glutamato) y Gln (Glutamina) (Glx1); 11 Naa, 14 Cr (Creatina), 15 Cho (Colina), 18 Mio/Gly (Mio-inositol/Glicina), 19-21 Glu Glu (Glx2), y 22 Cr. La ubicación de los picos se mantuvo fija y el ancho de los picos se modifico según la calidad del espectro (Fig. V.3)

Los parámetros de fase y estimación de la línea de base se fijaron en los siguientes valores:

Zero Order Phase: Estimate [-5, 5]; **Begin time (ms):** Estimate [-0.1, 0.1],
Weighting: off, **Truncated points**=20

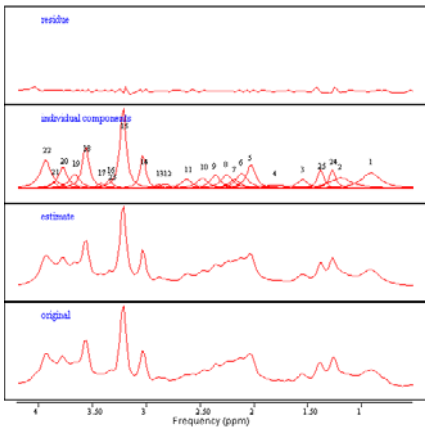


Figura V.3: Composición de un espectro de 30 ms en 25 picos lorentzianos realizado por AMARES. Cada nivel muestra el espectro original, el estimado, las componentes individuales y el residuo respectivamente.

- V.3.3.3 Quest

La base de metabolitos que se utilizó contaba con las siguientes sustancias: Lac, NAA, Glu, Gln, Cr, Cho, Gluc, Tau y Mio. Estos espectros individuales se modificaron a partir de una base utilizada por el programa Lcmodel[14]. El conjunto de picos que representan MM y Lip se crearon con "Simulation" (Capítulo IV, sección IV.2) de acuerdo a los valores derivados del artículo de Seeger et.al.[15], donde se limita la amplitud, ancho de línea y la ubicación relativa de los distintos picos de MM y Lip que aparecen en 0-4.5 ppm (Fig V.4). Los mejores parámetros de fase y línea de base que hicieron el proceso repetible y estable fueron:

Zero Order Phase: Estimate [-5, 5]; **Begin time (ms):** Estimate [-0.1, 0.1]; **Background Handling**=No

Weighting: [Beginning =0 End=20]; **Truncated points**=20

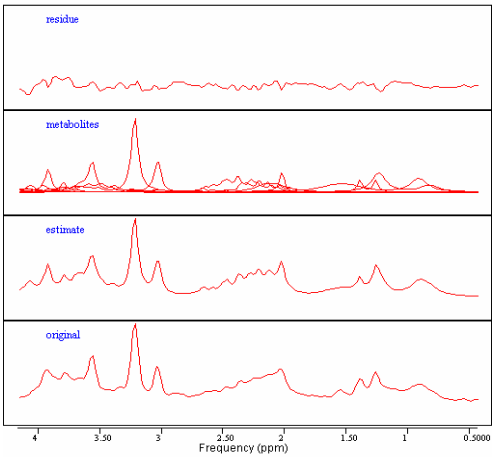


Figura V.4: Descomposición de un espectro de 30 ms en 11 espectros individuales de distintos metabolitos con Quest. Cada nivel muestra el espectro original, el estimado, las componentes individuales y el residuo respectivamente.

V.4 Métodos de Análisis

V.4.1 Estimación del cambio en la cuantificación por aumento del número de adquisiciones

A través de los valores obtenidos de los espectros se calcularon los cocientes: Cho/Cr, Cho/Naa, Cr/Naa, (Cr+Cho)/Naa, Mio/Cr, (Glu+Gln)/Cr, Lac/Cr, Lip/Cr, (Glu+Gln)/Naa, Lip/MM con Quest y Cho/Cr, Cho/Naa, Cr/Naa, (Cr+Cho)/Naa, Mio/Cr, Glut1/Cr Glut2/Cr, Lac/Cr, (Lip+Macro)/Cr, Glux1/Naa y Glux2/Naa con AMARES.

El estudio de la convergencia de estos cocientes se hizo a través de la relación

$$Cambio_relativo = \left(\frac{Valor_i - Valor_T}{Valor_T} \right) \qquad \text{V.5}$$

Con $Valor_i$ la amplitud del cociente en la i-esima suma de adquisiciones y $Valor_T$ el valor del cociente del espectro con la suma total de las adquisiciones. Se consideró que el espectro convergía a un valor estable en la adquisición i-ésima cuando la variación relativa del espectro i-ésimo respecto al del espectro completo (la suma total de las adquisiciones) fue inferior al 10% y se mantuvo dentro de este rango para un número de las adquisiciones más alto que el i-ésimo. No se consideró que existía convergencia si para i ≥ n-2, con “n” número total de las adquisiciones del espectro, no se llegaba al 10% de variación.

Loa cocientes finales analizados con Quest fueron Cho/Cr, Cho/Naa, Cr/Naa, (Cr+Cho)/Naa, Mio/Cr, Glu/Cr, Lip/Cr, Glu/Naa y Lip/MM. Todos los cocientes que tenían Gln y Lac no fueron considerados por la gran correlación y dependencia que tenían con Glu, MM y Lip respectivamente. Los cocientes finales analizados con AMARES fueron Cho/Cr, Cho/Naa, Cr/Naa, Cr+Cho/Naa, Mio/Cr, Glut1/Cr, Glut2/Cr, (Lip+M)/CrM Lip/Cho. Nuevamente Lac/Cr no fueron considerados por la gran correlación y dependencia que tenían con MM y Lip.

V.4.2 Análisis no lineal paramétrico

Se realizó un análisis no-lineal paramétrico con Matlab para obtener los bi (i = 1 .. 6) de las ecuaciones V.6 y V.7. Como $\boldsymbol{n}_{adquisiciones}$ se usaron los valores calculados en el item V.4.1 obtenidos para AMARES y Quest

$$n_{adquisiciones} = C_T \left(Max_{Cr}\right)^{b4} \left(Noise\right)^{b5} \left(Voxel\right)^{b2} \left(Fw\right)^{b3} \left(P_{Cr}\right)^{b6} \qquad \text{V.6}$$

$$n_{adquisiciones} = C_T (SNR)^{b1} (Voxel)^{b2} (Fw)^{b3} (P_{Cr})^{b6} \qquad \text{V.7}$$

Todos los parámetros aquí definidos fueron normalizados en relación con la media de cada grupo a fin de considerar la relevancia de cada bi en la parametrización. $\boldsymbol{n}_{adquisiciones}$ es el número de adquisiciones y C_T es una constante.

V.5 Resultados

La Tabla V.1 muestra los valores de los diferentes parámetros analizados de los 36 espectros (ordenados por tamaño de voxel).

	Datos							# Adquisiciones para la convergencia	
#	Noise	Fw	Voxel (ml)	Max_{Cr}	P_{Cr}	SNR	# Adquisiciones realizadas*	Quest*	AMARES*
1	1.17E+06	2.94	2644.8	9.77E+06	3.98E-01	8.36E+00	32	no	no
2	1.22E+06	7.34	2827.2	4.02E+07	2.34E-01	3.29E+01	16	no	13
3	1.09E+06	4.57	2863.68	2.74E+07	2.37E-01	2.51E+01	24	20	22
4	6.78E+05	4.52	3026	2.12E+07	3.01E-01	3.13E+01	12	no	9
5	1.01E+06	5.72	3026.646	2.61E+07	1.96E-01	2.60E+01	24	18	18
6	1.12E+06	3.82	3322.748	3.31E+07	9.25E-02	2.96E+01	16	14	14
7	1.28E+06	5.39	3392.64	3.99E+07	3.01E-01	3.13E+01	16	14	14
8	1.14E+06	4.59	3620.7	3.97E+07	1.43E-01	3.47E+01	16	13	15
9	1.14E+06	3.36	3627.24	1.50E+07	1.26E-01	1.32E+01	16	no	no
10	1.23E+06	3.46	3971.88	4.54E+07	3.97E-01	3.69E+01	24†	23 (no)	23 (no)
11	1.06E+06	3.23	4170.24	4.20E+07	1.66E-01	3.96E+01	24	no	21
12	1.17E+06	3.47	4212	3.07E+07	1.30E-01	2.63E+01	24	15	9
13	1.29E+06	4.75	4240.2	4.13E+07	1.58E-01	3.19E+01	24	17	12
14	1.01E+06	4.33	4262.4	3.61E+07	2.45E-01	3.56E+01	16	11	10
15	1.21E+06	5.08	4283.55	3.82E+07	1.58E-01	3.15E+01	24†	no	23 (no)
16	1.19E+06	3.21	4329	2.51E+07	4.44E-01	2.11E+01	24†	no	23 (no)
17	1.25E+06	2.80	4371.15	3.96E+07	1.49E-01	3.18E+01	16	12	14
18	1.27E+06	4.72	4371.15	5.39E+07	3.13E-01	4.24E+01	16	10	12
19	1.21E+06	1.91	4500	1.92E+07	3.10E-01	1.58E+01	12	no	10
20	1.11E+06	4.00	4536	5.88E+07	3.91E-01	5.29E+01	16	9	11
21	9.26E+05	4.61	5525	6.49E+07	2.45E-01	7.01E+01	16	7	12
22	6.24E+05	4.71	5529.6	2.34E+07	2.14E-01	3.75E+01	16	12	12
23	1.23E+06	4.78	5559.19	5.94E+07	2.47E-01	4.81E+01	16	13	13
24	1.15E+06	5.55	5559.19	5.97E+07	2.04E-01	5.20E+01	16	11	12
25	1.22E+06	4.81	5577.336	3.83E+07	2.12E-01	3.15E+01	8	no	no
26	1.05E+06	4.09	5616.9	3.00E+07	2.47E-01	2.86E+01	16	14	11
27	1.27E+06	5.76	5930.2	4.08E+07	4.03E-01	3.21E+01	16	14	no
28	1.31E+06	3.03	5960	7.63E+07	2.16E-01	5.83E+01	16	12	11
29	1.19E+06	7.06	6000	5.80E+07	3.00E-01	4.87E+01	16	14	15 (no)
30	1.36E+06	6.29	6771	7.12E+07	1.52E-01	5.23E+01	16	13	14
31	1.29E+06	5.43	6771	7.12E+07	1.97E-01	5.54E+01	16	13	12
32	5.55E+05	4.57	6800	2.71E+07	2.18E-01	4.88E+01	16	12	10
33	1.05E+06	3.01	6992	5.04E+07	4.41E-01	4.77E+01	16	11	9
34	6.62E+05	4.92	7811.1	5.13E+07	3.06E-01	7.75E+01	16	11	11
35	1.24E+06	2.25	7920.2	2.88E+07	2.90E-01	2.33E+01	12	11	10
36	5.90E+05	4.66	9066.6	4.43E+07	1.86E-01	7.51E+01	12	6	6

*se multiplica por ocho
† espectros con los picos de los espectros sin la cancelación de agua con diferentes amplitudes

Tabla V.1: Valores de los parámetros de los 36 espectros analizados, las adquisiciones realizadas y el número de adquisiciones, según ec. V.5, que fueron necesarias para conseguir la convergencia con AMARES y Quest. **no** significa que no hubo convergencia.

Los siguientes son los resultados más importantes que se obtienen del análisis de los datos:

V.5.1 Convergencia

1- en el 81% de los espectros se obtiene un resultado similar en la convergencia, o sea, se llega o no se llega a la convergencia con Quest y Amares, aunque el número de adquisiciones necesarias para lograr la convergencia fue variable. En el 50% de ellos la diferencia fue menor o igual a 8 adquisiciones y en un 70% menor o igual a 16 adquisiciones.

2- En los espectros que sólo convergen mediante un método (29 %), el número de adquisiciones necesarias para la convergencia fue el número máximo de las adquisiciones realizadas.

3- Quest mostró una menor capacidad de obtener la convergencia que AMARES, ya que 10 espectros analizados por Quest no lograron convergencia frente a 7 por AMARES (en 6 espectros los dos métodos coincidieron).

4- En el 90% de los espectros analizados, el perfil de los espectros (análisis clínico) se definió en tan sólo 72-96 adquisiciones, independientemente de si el espectro convergía o no, y de las otras variables analizadas (Fig. V.5).

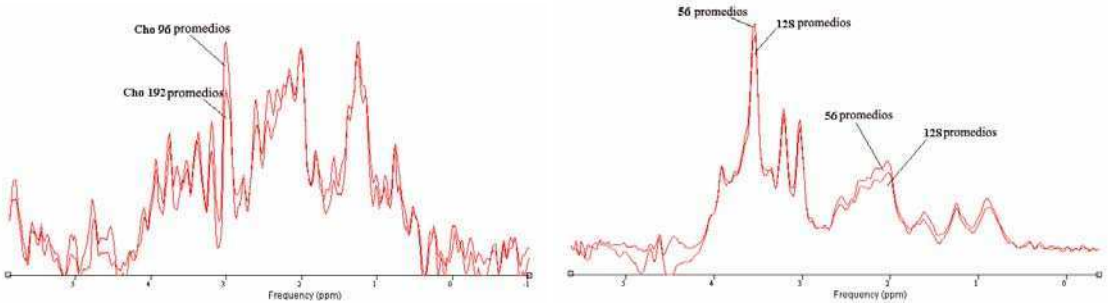


Figura V. 5: Comparación del perfil de los espectros normalizados según diferentes números de adquisiciones en dos espectros de diferente calidad. El menor valor muestra el espectro que no tiene una diferencia significativa con el espectro total que se indica con el número de adquisiciones más grande.

V.5.2 Estimación de las variables *bi*

5- De los datos de la Tabla V.1 se ve que *Voxel* muestra una pobre relación lineal con la SNR (Max_{Cr} /*Noise*) (Fig. V.6) a pesar de lo que la ec. V.1.a enuncia y muestra una mejor relación de *Voxel* y SNR con el # Adquisiciones para la convergencia (Figs. V.7) con Quest que con Amares (ec. V.1.b).

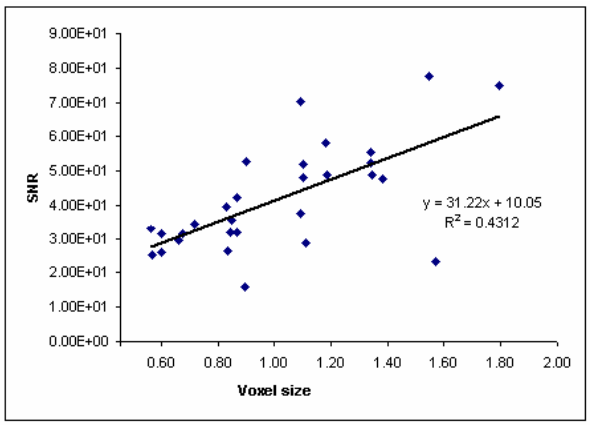
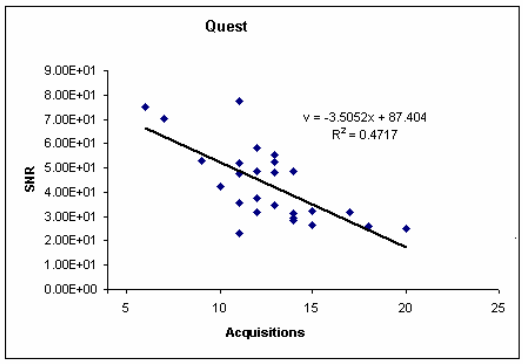
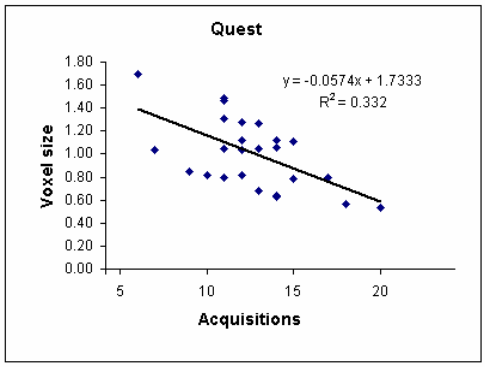
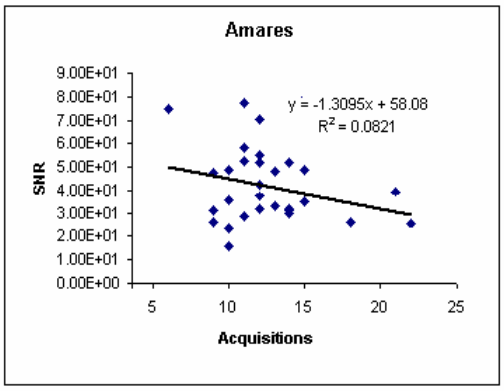
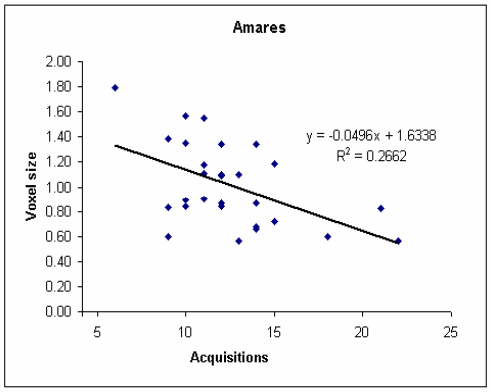


Figura V.6: Relación entre Voxel (normalizado en 4,9 ml) y SNR que revela la mala linealidad.









Figuras V.7: Relaciones entre Voxel y SNR con el número de adquisiciones necesarias para tener convergencia en la cuantificación. Las curvas muestran pobre linealidad, aunque es mejor con Quest que con AMARES.

Del cálculo no lineal (ec. V.6 y V.7) de los parámetros analizados del espectro sin cancelación del agua se obtuvo la siguiente Tabla V.2.

Variable	AMARES	Quest
	Ecuación 6	
Noise (b5)	0.3476	*0.6396*
Fw (b3)	0.2967	0.4126
Voxel (b2)	-0.1253	-0.0387
Max_{Cr} (b4)	-0.0607	*-0.5286*
P_{Cr} (b6)	-0.0888	-0.0603
	Ecuación 7	
Fw (b3)	0.3225	0.4158
Voxel (b2)	-0.1321	-0.048
P_{Cr} (b6)	-0.1074	-0.0541
SNR (b1)	-0.117	*-0.5466*

Tabla V.2: Resultados de los coeficientes bi para las dos técnicas de procesamiento de los espectros.

6- En la ecuación V.7 con Quest la estimación de SNR (*-0.5466)* es muy similar a los valores que se estiman de Noise (*0.6396)* y Max_{Cr} (*-0.5286)* en la ecuación V.6, lo que demuestra que con Quest estos dos últimos parámetros podrían ser utilizados como un índice de SNR.

7- Con Quest, las ecuaciones V.6 y V.7 muestran que los parámetros más relevantes en la estimación de las adquisiciones son Noise, Max_{Cr} (SNR) y Fw. El tamaño de voxel y P_{Cr} no son importantes con Quest.

8- AMARES no sigue el comportamiento mostrado por Quest. AMARES da menos relevancia a Max_{Cr} y P_{Cr}, y mayor a Fw, Voxel y Noise, sin mantener una relación definida entre el SNR y Max_{Cr}/Noise.

9- A partir de los parámetros *bi* de la Tabla V.2 obtenidos a partir de las ecuaciones V.6 y V.7 se calculó el número aproximado de las adquisiciones necesarias para obtener la convergencia de los espectros que no convergen de la Tabla V.1. Se observa con Quest que en muchos de los espectros la convergencia no se obtuvo debido a la falta de adquisiciones (Tabla V.3). Con AMARES no es posible definir las adquisiciones necesarias para obtener la convergencia, con cualquiera de las dos ecuaciones. (Tabla V.4).

Quest			
#	# adquisiciones*	# Ecuación 6*	# Ecuación 7*
1	32	24.09	25.31
2	16	***17.62***	***17.50***
4	12	***21.13***	***20.69***
9	16	***15.26***	***15.43***
10	24†	11.63	11.79
11	24	11.28	11.06
15	24†	15.62	15.12
16	24†	14.97	15.46
19	12	***14.38***	***14.57***
25	8	***14.84***	***14.56***

*multiplicado por 8
† espectros que tenían los dos espectros sin la cancelación del agua de diferentes amplitudes

Tabla V.3 Estimación del número de adquisiciones necesarias para conseguir la convergencia con Quest en aquellos espectros que no lo consiguieron usando los *bi* de la Tabla V.2. Los números en negrita indican los casos donde faltaron adquisiciones para conseguir la convergencia.

AMARES			
#	# adquisiciones*	# Ecuación 6*	# Ecuación 7*
1	32	12.33	12.69
9	16	13.18	13.62
10	24†	11.40	10.65
15	24†	13.83	13.43
16	24†	11.20	10.85
25	8	***12.83***	***12.34***
29	16	12.83	12.09

*multiplicado por 8
† espectros que tenían los dos espectros sin la cancelación del agua de diferentes amplitudes

Tabla V.4 Estimación del número de adquisiciones necesarias para conseguir la convergencia con AMARES en aquellos espectros que no lo consiguieron usando los *bi* de la Tabla V.2. Los números en negrita indican los casos donde faltaron adquisiciones para conseguir la convergencia.

10 - Los espectros en el que los dos picos sin cancelación de agua mostraron una amplitud claramente diferentes (marcados con †) no convergen ni con Quest ni con AMARES.

V.6 Discusión

El interés de estudiar los tumores cerebrales con MRI, por medio de imágenes convencionales y funcionales (difusión, perfusión y espectroscopia) se basa en poder caracterizarlos y analizar su evolución y/o respuesta al tratamiento. Clínicamente, el análisis de los espectros se realiza viéndolos como una curva que define un patrón o perfil. Sin embargo, para realizar un análisis y una comparación más detallada es necesario algún tipo de cuantificación de los metabolitos más importantes.

Por otro lado, el estudio de los tumores cerebrales es tal vez la aplicación más difícil, pero también la más usada de la MRS clínica. Es la más difícil debido a la variabilidad de los parámetros a ajustar al realizar su adquisición, tales como la ubicación del tumor en el cerebro (proximidad al hueso, el aire), su tamaño (volumen parcial del espectro), la cantidad de adquisiciones, la densidad de tejido post-cirugia y por los componentes de algunos de los tumores que pueden afectar a la calidad (calcio, sangre, los quistes, material ferromagnético después de la cirugía, etc.). Hay otros factores a considerar en un estudio clínico, que también influyen en la calidad del espectro. Estas dependen del proceso de homogeneización del campo magnético dentro del voxel y de la cancelación de agua.

Otra limitación importante en el estudio de los tumores con MRS es el tiempo de estudio; dos espectros monovoxel con un TR = 2 s, de 96 y 192 adquisiciones y una multivoxel de TR = 1s con matriz de 16x16 o 18x18 dura entre 15 a 20 minutos, que hace, solo el estudio de MRS, casi tan largo como el de imágenes.

La cuantificación se hace aún más importante si se quieren comparar los espectros para estudiar la evolución del tumor en un paciente, ya que las condiciones de adquisición no son siempre las mismas y no siempre permiten la misma calidad de los espectros, incluso para el mismo paciente en diferentes estudios.

El objetivo es entonces asegurarse que va a ser adquirido, en el menor tiempo posible, un buen espectro, de modo que pueda ser analizado de acuerdo a un método de cuantificación. En este trabajo se demostró que es posible obtener información sobre la calidad del espectro que va a ser adquirido (cancelando el agua) a partir de datos obtenidos del espectro sin cancelación del agua.

En el proceso de definir si los espectros son cuantificables o no, aquí se plantea un método sencillo pero laborioso para estimar valores (*bi*), que aplicados a parámetros mensurables de un espectro de solo 16 adquisiciones (sin cancelar el agua) permitiría estimar si la cuantificación es posible dado un método de análisis. El método consistió en la cuantificar las sumas parciales de las adquisiciones totales realizadas y observar la variación de los resultados en función del número de adquisiciones.

Cuando se utiliza con Quest (con una base de los 11 metabolitos más importantes), las variables de mayor relevancia para realizar la estimación son el ancho del espectro (Fw), el ruido de la señal (Noise) y la altura del pico de la Cr (Max_{Cr}). Ni P_{Cr} ni el tamaño de Voxel fueron relevantes. Cuando se aplica este modelo a los espectros que no convergen, éste

muestra que la falta de adquisiciones es la causa de que no se logra la convergencia (Tabla V.3). Esto demuestra que las suposiciones hechas en las ecuaciones V.6 y V.7 usando principios básicos de procesamientos señales funciona con Quest con estos 11 metabolitos. Que Voxel no sea una variable importante en Quest, podría deberse a que en los tumores cerebrales la densidad de tejido (y por la tanto la señal) puede estar disminuida por efecto del la cirugía, el tratamiento o el tumor mismo (necrosis, edema, etc), así, aun si el tamaño del voxel es "grande", la señal puede ser poca por no haber tejido dentro. Sin embargo, Max_{Cr} sí refleja mejor la cantidad de señal medida.

AMARES no le asigna la misma importancia a estos parámetros. Eso sucede aunque AMARES coincidió con Quest en el 81% de los espectros analizados (convergencia o no convergencia) y en el 70% de ellos el número de adquisiciones no difieren en más de ± 16 adquisiciones. AMARES da más importancia a Fw, Voxel y Noise.

Esta diferencia probablemente podría tener su origen en la diferencia entre ambos métodos de análisis. Al ser AMARES una técnica en la que se ajusta (en el espacio temporal) el espectro con lorentzianas y gaussianas manteniendo ciertas relaciones entre ellas y limitando algunos de los parámetros de estas curvas, es fácil entonces ajustar un espectro agregando varias curvas de este tipo. Esto se refleja en el hecho de que con AMARES se logro mayor cantidad de convergencias y en 13 casos con menos adquisiciones que con Quest, mientras que con Quest 8 espectros requirieron menos adquisiciones. A diferencia de AMARES, Quest tiene más restricciones ya que los metabolitos están representados en todo el espectro, no como la "suma" de componentes individuales.

Esto significa que el ajuste se hace más restrictivo con Quest, por lo que más adquisiciones son necesarias para la convergencia, pero también se obtiene más precisión. En el proceso de ajuste con Quest, las proporciones entre los picos de un solo metabolito debe mantenerse en todo el espectro, y eso impone una restricción más severa que con AMARES. Este es el caso del "pool" Glux que se encuentra en las regiones [3-3,4] ppm y [2-2,5] ppm; la Cr con sus dos picos y la gran superposición entre Mio, Gly, Gluc y Tau. En este trabajo, la base AMARES utilizada no impone ninguna relación entre los picos de Glux, ni entre los dos picos de Cr y Mio. Solo se ajustaron por curvas lorentzianas puras.

El caso de los Lip y MM requiere un análisis especial, porque en el caso de AMARES, los componentes de estos dos grupos en la región de 1.9 ppm hasta 2.3 ppm (superposición con Naa y Glux) no se utilizó en la base. Aunque se hizo un intento, no se logró la convergencia

con AMARES utilizando los valores definidos de las áreas y anchos de los picos dados por ref (15) como “prior knowledge”.

Los resultados obtenidos con Quest permitieron establecer si el espectro es cuantificable o no en función del número de adquisiciones realizadas (Tabla V.3). Esto permite inferir que al momento de realizar un espectro monovoxel, el resonador podría sugerir el número de adquisiciones que garantizan la cuantificación (convergencia) del espectro, lo que permitiría optimizar la relación calidad/tiempo del estudio. En este trabajo, la mayoría de los espectros analizados se cuantificaron en un rango de 80-192 adquisiciones, el cual ofrece la oportunidad de mejorar el tiempo de adquisición en un estudio de cuatro espectros en alrededor 2 a 5 minutos (casi una secuencia de imágenes más) en algunos estudios. Con esta estimación también se aseguraría que muchos de los espectros sin cuantificar (el 20 % en el caso de este trabajo) podrían ser cuantificados si se agregan mas adquisiciones.

Por el contrario, con AMARES, en los pocos casos donde no hubo convergencia, solo en un caso las ec. V.6 y V.7 mostraron que no se logró la convergencia por la falta de adquisiciones (Tabla V.4) lo que de algún modo muestra una contradicción con el análisis teórico. Quizás una mejor definición de las relaciones entre los picos de un mismo metabolito permitiría obtener mejores resultados con AMARES.

Como corolario de este capítulo es posible afirmar que en aquellos espectros en los que la amplitud de los picos de agua no fue “estable”, la cuantificación del espectro no fue posible, sin importar el número de adquisiciones utilizadas. En esos casos, aun con todos los parámetros aquí utilizados con valores satisfactorios, pero con la amplitud de los dos picos de agua claramente diferentes, la convergencia no se logró por ningún método. Las razones de este comportamiento podrían ser atribuirse a problemas del propio resonador, como la intensidad de los pulsos de radio frecuencia, la lectura de los datos o quizás el movimiento del paciente. Por último, si la cuantificación no es el objetivo, se observó que el perfil de un espectro se define dentro de un rango de 72-96 adquisiciones, independientemente del resto de los otros parámetros.

V.7 Conclusiones

De las dificultades inherentes al estudio de los tumores cerebrales por medio de la MRS que son la adquisición y el procesamiento, en este capítulo se ha tratado de relacionar la calidad de la adquisición, los tiempos de adquisición y el procesamiento del espectro. Con Quest, de algunos de los parámetros que se pueden obtener fácilmente a partir del espectro sin cancelación del agua, se observó que es posible relacionarlos para asegurar una buena cuantificación del espectro. Estas variables son el ancho del pico del agua (Fw), el ruido del espectro (Noise) y la amplitud del pico de una sustancia "estándar" como la Cr (Max_{Cr}) (o SNR). Aunque AMARES permite cuantificar los espectros con una serie de adquisiciones parecidas a Quest, AMARES no permite asegurar que esas variables se relacionen con el número de adquisiciones, ni predecir el número de adquisiciones necesarias para la cuantificación. Es por esta razón que Quest, parece ser un método mas preciso para la cuantificación, ya que es más predecible. Es posible que para obtener resultados similares con AMARES se requiera una base más compleja que la utilizada aquí. Además, un espectro que va a ser analizado "clínicamente" por un patrón de una curva que relaciona amplitudes relativas de los distintos picos, requeriría solo entre 72-96 adquisiciones.

Al poder Quest establecer el número de adquisiciones necesarias para obtener un espectro cuantificable, permitiría entonces optimizar el tiempo de adquisición y así reducir el tiempo total del estudio.

Referencias

[1] Majos C, Alonso J, Aguilera C, Serrallonga M, Perez-Martin J, Acebes JJ, et al. **Proton magnetic resonance spectroscopy ((1)H MRS) of human brain tumors: assessment of differences between tumor types and its applicability in brain tumor categorization**. *Eur Radiol*;13(3):582 –91 (2003).

[2] Howe FA, Opstad KS. **1H MR spectroscopy of brain tumors and masses**. *NMR Biomed*;16(3):123– 31 (2003)

[3] Moller-Hartmann W, Herminghaus S, Krings T, Marquardt G, Lanfermann H, Pilatus U, et al. **Clinical application of proton magnetic resonance spectroscopy in the diagnosis of intracranial mass lesions**. *Neuroradiology*;44(5):371– 81 (2002)

[4] Devos A, Lukas L, Suykens JA, Vanhamme L, Tate AR, Howe FA, et al. **Classification of brain tumours using short echo time 1H MR spectra.** *J Magn Reson*;170(1):164– 75 (2004).

[5] Devos A, Simonetti AW, van der Graaf M, Lukas L, Suykens JA, Vanhamme L, et al. **The use of multivariate MR imaging intensities versus metabolic data from MR spectroscopic imaging for brain tumour classification**. *J Magn Reson*;173(2):218– 28 (2005)

[6] Tate AR, Majo´ s C, Moreno A, Howe FA, Griffiths JR, Arus C. **Automated classification of short echo time in in vivo 1H brain tumor spectra: a multicenter study**. *Magn Reson Med*;49(1):29 –36 (2003).

[7] Kuznetsov YE, Caramanos Z, Antel SB, Preul MC, Leblanc R, Villemure J-G, et al. **Proton magnetic resonance spectroscopy imaging can predict length of survival in patients with supratentorial gliomas**. *Neurosurgery*;53(3):565– 77 (2003)

[8] Truong T-K, Clymer BD, Chakeres DW, Schmalbrock P. **Three dimensional numerical simulations of susceptibility-induced magnetic field inhomogeneities in the human head**. *Magn Reson Imaging*;20:759– 70 (2002).

[9] Kanowski M, Kaufmann J, Braun J, Bernarding J, Tempelmann C. **Quantitation of simulated short echo time 1H human brain spectra by LCModel and Amares**. Magn Reson Med;51(5):904– 12 (2004)

[10] Ratiney, H, Coenradie, Y, Cavassila S, van Ormondt D, Graveron-Demilly, D. **Time–domain quantitation of 1H short echo-time signals: background accommodation**. *MAGMA*; 16(6):284–96 (2004).

[11] http://en.wikipedia.org/wiki/Eddy_current

[12] Riddle WR, Gibbs SJ, Willcott MR. **Removing effects of eddy currents in proton MR spectroscopy**. *Med Phys*;19:501– 9 (1992).

[13] http://www.mrui.uab.es/mrui/.

[14] http://www.s-provencher.com/paqes/lcmodel.shtml.

[15] Seeger U, Klose U, Mader I, Grodd W, Nagele T. **Parameterized evaluation of macromolecules and lipids in proton MR spectroscopy of brain diseases**. *Magn Reson Med*;49(1):19– 28 (2003).

Capítulo VI

Espectroscopia de alto campo por resonancia magnética aplicada a la clasificación de tumores gliales caracterizados genéticamente

VI.1 Introducción

El análisis genético de los tejidos tumorales es un método de clasificación con el que se pretende realizar una mejor tipificación de la caracterización anátomo-patológica que se hace usualmente de los tumores. En los últimos años muchos trabajos han asociado a tumores clasificados como similares por anatomía patológica, "subtipos" diferentes por una clasificación genética. Un ejemplo típico se da en el caso de los tumores de mama[1-2-3]. En los tumores gliales de cerebro, existen "marcadores genéticos" que se asocian con un comportamiento distinto en lo que se refiere a evolución y respuesta al tratamiento (Capítulo III). El caso más conocido es la buena respuesta al tratamiento y sobrevida de los pacientes con oligodendrogliomas con deleción 1p-19q[4]. Por otro lado, muchos trabajos mostraron la capacidad de la RMN de alto campo para generar clasificadores de muestras biológicas, tanto con muestras líquidas[5] como con muestras sólidas (HR-MAS)[6-7].

El presente trabajo tuvo dos objetivos centrales:

- evaluar si es posible, utilizando un equipo que no cuenta con la facilidad de HR-MAS, obtener espectros de RMN de buena calidad de tumores gliales a partir de una preparación simple de la muestra.

- determinar si existe una relación entre el perfil metabólico de esos espectros y la caracterización genética de tres grupos de tumores gliales oligodendrogliomas, (O; grado II), oligoastrocitomas (OA; grado III) y glioblastomas (GB, grado IV)) según la clasificación que se realiza en el servicio de Anatomía Patológica y Anatomía Molecular de FLENI, sobre tumores resecados en la institución.

VI.2 Metodología

VI.2.1 Obtención y preparación de las muestras

61 muestras de tumores gliales (17 O, 15 OA y 29 GB) se obtuvieron de pacientes sometidos a cirugía de cerebro en los quirófanos de FLENI por la presunción de tener un tumor cerebral por estudios de MRI previos. En cada caso se enviaron fragmentos del tumor de los quirófanos al Dpto. de Anatomía Patológica, parte de esas muestras se utilizó en el análisis anátomo-patológico para la clasificación en O, OA o GB, y otra parte fue congelada a –80 °C

en contenedores plásticos. Un día antes de la medición de los espectros de RMN, las muestras sólidas congeladas se descongelaron y disgregaron con un homogeneizador de tejidos manual en 0,7 ml de agua deuterada (D_2O, 99,9% D, Aldrich). La suspensión resultante se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 2500×g durante 5 minutos para precipitar los restos sólidos que degradarían la homogeneidad del campo magnético en el resonador. El sobrenadante se transfirió mediante una micropipeta a un tubo Eppendorf. El tiempo total del proceso fue de 8-10 minutos. La solución se volvió a congelar y se conservó a -80 °C hasta el momento de medir los espectros de RMN. Los restos sólidos se conservaron por separado a 80 °C.

VI.2.2 Adquisición de los espectros

Los espectros de RMN ^{1}H se adquirieron en un espectrómetro Bruker Avance II 500 (^{1}H a 500 MHz) utilizando una sonda multinuclear BBI (Bruker Avance; Bruker GmBH, Rheinestetten, Germany). Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (aprox. 25°C).

Los sobrenadantes provenientes de la disgregación de los tumores se mantuvieron congelados hasta el momento de la medición. Previo a la adquisición, cada muestra se descongeló y la solución se transfirió a un tubo de RMN de 5 mm.

La homogeneización del campo magnético se realizó en forma automática (Topshim) y sólo en unos pocos casos fue necesario un ajuste manual adicional. Se realizaron dos adquisiciones, un espectro unidimensional estándar (secuencia zgpr) con cancelación de la señal del agua por saturación con una onda continua de baja intensidad de 500 μs seguido inmediatamente de un pulso de rotación de 90º (7 μs) y un tiempo de espera de 6 s. Se realizaron 80 adquisiciones, cada una de 32.768 puntos complejos sobre un ancho espectral de 12,1 ppm centrados en la resonancia del agua (4,7 ppm) y un espectro TOCSY (secuencia mlevgph19) de 1024 (F2) × 128 (F1) puntos complejos, con 4 adquisiciones por valor de F1 sobre un ancho espectral de 10,2 ppm, con un tiempo de relajación de 2 s y tiempo de spin lock de 60 ms. El tiempo total de medición por muestra (incluyendo la homogeneización de campo) fue de aproximadamente 35 minutos.

VI.2.3 Procesamiento de los espectros

VI.2.3.1 Programa Topspin 2.1 (Bruker)

Por su sencillez y reproducibilidad se utilizó este programa como primer visualizador de los espectros durante la adquisición y para apodizar el espectro con un filtro exponencial de 1Hz. Luego se ajustaron manualmente la fase (de 0 y 1er orden) y la línea de base de los espectros.

Estos espectros procesados fueron guardados y utilizados posteriormente en el análisis con el programa ACD/NMR.

VI.2.3.2 Programa Quest

Los espectros fueron procesados con el programa Quest, que se encuentra dentro del módulo de procesamiento y simulación de espectros del programa jMRUI (www.mrui.uab.es/mrui/*)* (Capítulo IV). Previo al procesamiento, cada espectro adquirido que constaba de 32.768 puntos se redujo a 16.384 (para bajar el tiempo de procesamiento), se corrigió la fase manualmente, se apodizó con un filtro Lorentziano de 1 Hz y se canceló el pico del agua por el método de HLSVD (Hankel Lanczos Squares Singular Values Decomposition)[8].

Construcción de la base de espectros

La base de espectros individuales de la región alifatica (0-4,5 ppm) fue construida a partir de dos programas pertenecientes a jMRUI, un simulador de espectros que los genera a partir de las interacciones cuánticas de los núcleos (NMR-SCOPE)[9] y con "Simulation" (Capítulo IV). Los espectros generados con "Simulation" se obtuvieron a partir de los datos de los espectros obtenidos de la Human Metabolome Database (HMDB)[10]. Todos los picos de los lípidos fueron creados con Simulation a partir de publicaciones[11-12].

El término "_x.x" de Lip_x.x hace referencia a la ubicación del Lip en ppm.

Cada espectro fue procesado con la misma base y se utilizó la opción "Sustraccion" en el cálculo de la línea de base. Los datos de la cuantificación y valor de Cramer-Rao de cada metabolito fueron exportados a una planilla de cálculo Excel.

Aquellos espectros en los cuales la mayoría de las cuantificaciones tuvieron valores de Cramer-Rao mayores de 20% fueron descartados del análisis estadístico. Del mismo modo, si más del 30% de un metabolito de los distintos espectros tenían un coeficiente de Cramer-Rao mayor de 20%, ese metabolito fue descartado del análisis. Con el resto se creo una planilla de cálculo en Excel con los valores de cuantificación de cada uno de los metabolitos. A estas planillas Excel se le agregó una columna con los valores que tipificaban genéticamente a cada uno de los tumores (Anexo I).

VI.2.3.3 Programa ACD/NMR

Los espectros previamente procesados con el programa Topspin fueron abiertos con el programa ACD/NMR y alineados tomando como referencia el primer pico del lactato (señal a 1,32 ppm). Luego se segmentó manualmente el espectro en un conjunto de "bins" variables respetando los picos más importantes de los metabolitos. Se fijaron las áreas correspondientes

a la zona del agua (4.65-5.10 ppm) y las regiones entre 8.50-10.85 ppm y -1.30-0.65 ppm donde no se segmento la señal de modo de no agregar amplitud al proceso de normalización posterior. Esta segmentación se guardó y se aplicó a todos los espectros alineados. Luego se calcularon las áreas debajo de cada "bin" y se normalizó por el área total de todos los metabolitos. El resultado final de cada bin corresponde a una fracción (x100) del área total calculada de la sección del espectro analizado. Los resultados se presentan en formas de tablas que fueron exportadas e ingresadas en una planilla de cálculo Excel, donde se les agrego una columna con los valores que tipificaban genéticamente cada tumor (Anexo I).

VI.2.4 Programa MetaboAnalyst

Los datos obtenidos de Quest y ACD/NMR fueron analizados con el programa "on-line" MetaboAnalyst (http://www.metaboanalyst.ca/)[13] y la aplicación estadística PLS-DA, previa eliminación de variables con valores bajos (línea de base ruidosa) y normalización de los datos con "Quantile normalization within replicates after log transformation"[14-15]. Previo al análisis con PLS-DA, se realizó un análisis PCA sobre los datos para determinar las muestras que tenían un patrón de espectro muy distinto del promedio de las muestras. Aquellas muestras que quedaron fuera del 90% del intervalo de confianza por PCA fueron excluidas del análisis y se repitió nuevamente el PCA.

VI.3 Resultados

VI.3.1 Cuantificación con Quest

La Figura VI.1 muestra la base de espectros utilizada en la clasificación Quest de un espectro de alto campo con la lista de los resultados, el espectro estimado y el residuo.

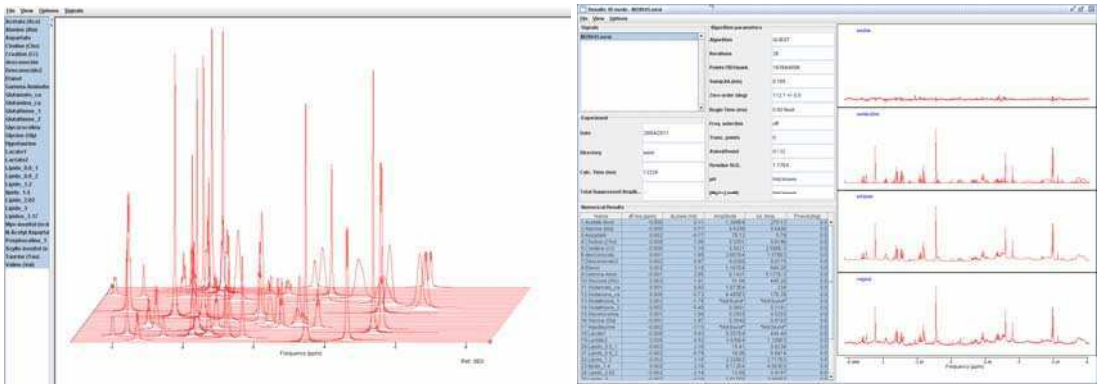


Figura VI.1: Base de metabolitos normalizados usada en el procesamiento Quest y resultado de la cuantificación de un espectro de un tumor glial de alto campo.

Durante el proceso de cuantificación se decidió separar los grupos de resonancias Lac y GHS para mejorar la cuantificación. Así, se utilizaron 4 resonancias, Lac_1 el doblete a 1,33 ppm y Lac_2 el cuarteto a 4,12 ppm y GSH_1 el multiplete a 2,56 ppm y GSH_2 para el multiplete a 2,97 ppm.

La base contó con los siguientes espectros: Acetato (Ace), Alanina (Ala), Aspartato (Asp), Colina (Cho), Creatina (Cr), Desc_1, Desc_2, Etanol (Et), Acido γ-aminobutírico (GABA), Glutamato (Glu), Glutamina (Gln), Glutation_1 (GSH_1), Glutation_2 (GSH_2), Glicerfosfocolina (GPCho), Glicina (Gly), Hipotaurina (H-Tau), Lactato1 (Lac_1), Lactato2 (Lac_2), Lípido_0.9_1 (Lip_0.9_1), Lípido_0.9_2 (Lip_0.9_2), Lípido_1.2 (Lip_1.2), Lípido_1.4 (Lip_1.4), Lípido_2.02 (Lip_2.02), Lípido_3 (Lip_3), Lípido_1.17 (Lip_1.17), Mio-inositol (Mio), N-Acetil aspartato (Naa), Fosfocolina (PCho), Scillo-inositol (S-Ino), Taurina (Tau), Valina (Val). Desc_1 y Desc_2 hacen referencia a dos picos a los que no fue posible asignarle un metabolito conocido, pero que por la intensidad y frecuencia con la que aparecían en las muestras se decidió incluirlos en el análisis.

Del primer análisis de los resultados se eliminaron las sustancias Asp, Gluc, GSH_2 y S-Ino por tener un error (Cramer-Rao) mayor del 20% en mas del 30% de las muestras tumorales. Se eliminaron también 4 espectros de O, 3 espectros OA y 3 espectros GB ya que más del 30% de los metabolitos tenían errores mayores de 20 %. Para el análisis del grupo O_OA (punto **VI.3.3**) también se eliminaron Desc_2, H-Tau y Lip_1.2 por tener la mayoría de las muestras errores mayores de 20%. Para el análisis del grupo OA_GB se eliminó solamente el NAA por tener en casi todos los GB un error mayor al 20%.

VI.3.2 Cuantificación con ACD/NMR

Por la segmentación manual de la región alifática se crearon 185 bins de tamaños variables (en ppm). A varios de los segmentos les fueron asignados los metabolitos correspondientes por su ubicación (en ppm) en el espectro (Fig. VI.2 y VI.3).

Previo a la segmentación se eliminaron 3 espectros de O, 3 espectros de OA y 2 espectros GB por ser espectros o muy distintos en los metabolitos que se midieron (contaminación de la muestra o baja SNR) o por ser espectros con picos muy anchos (mala homogeneidad).

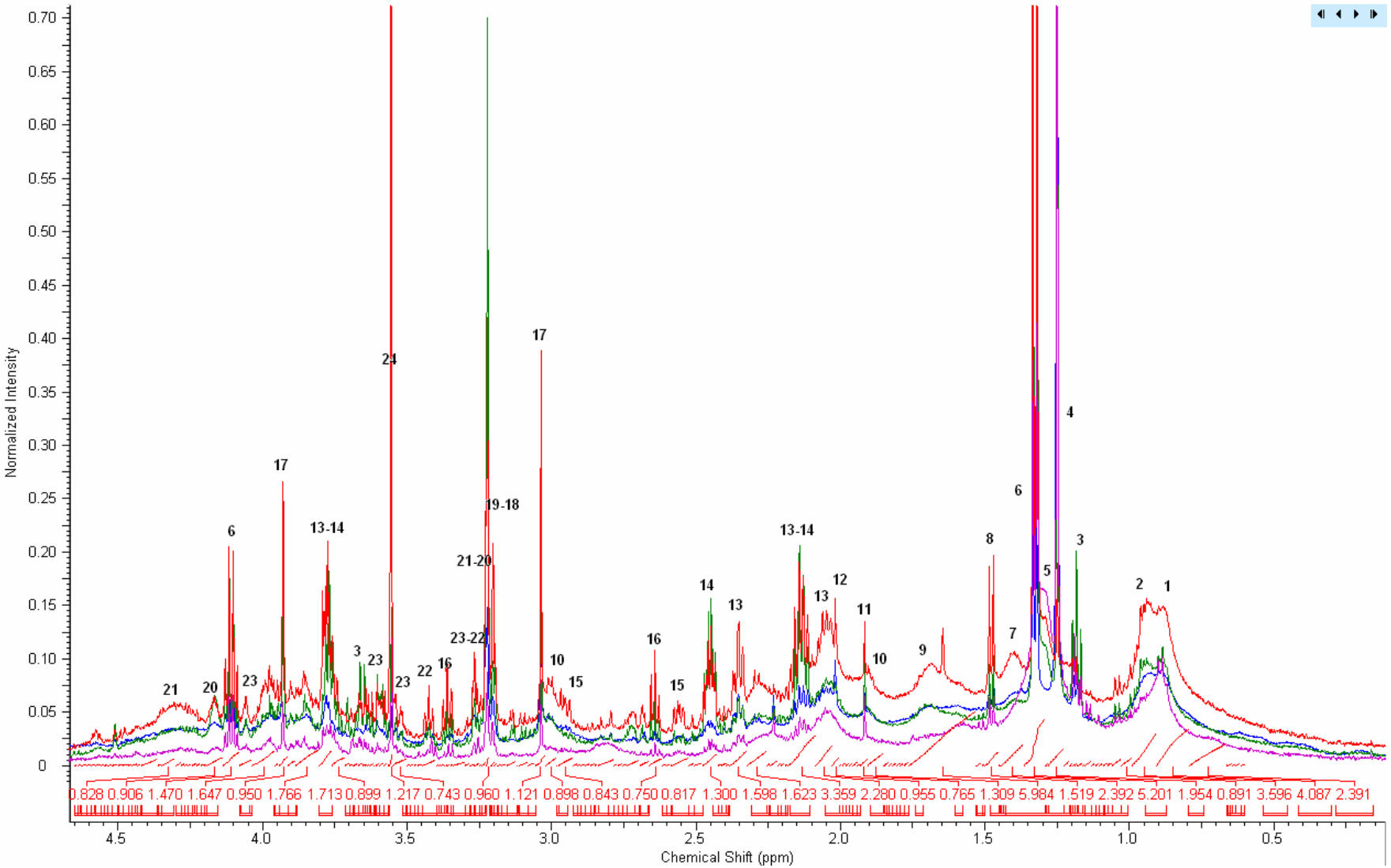
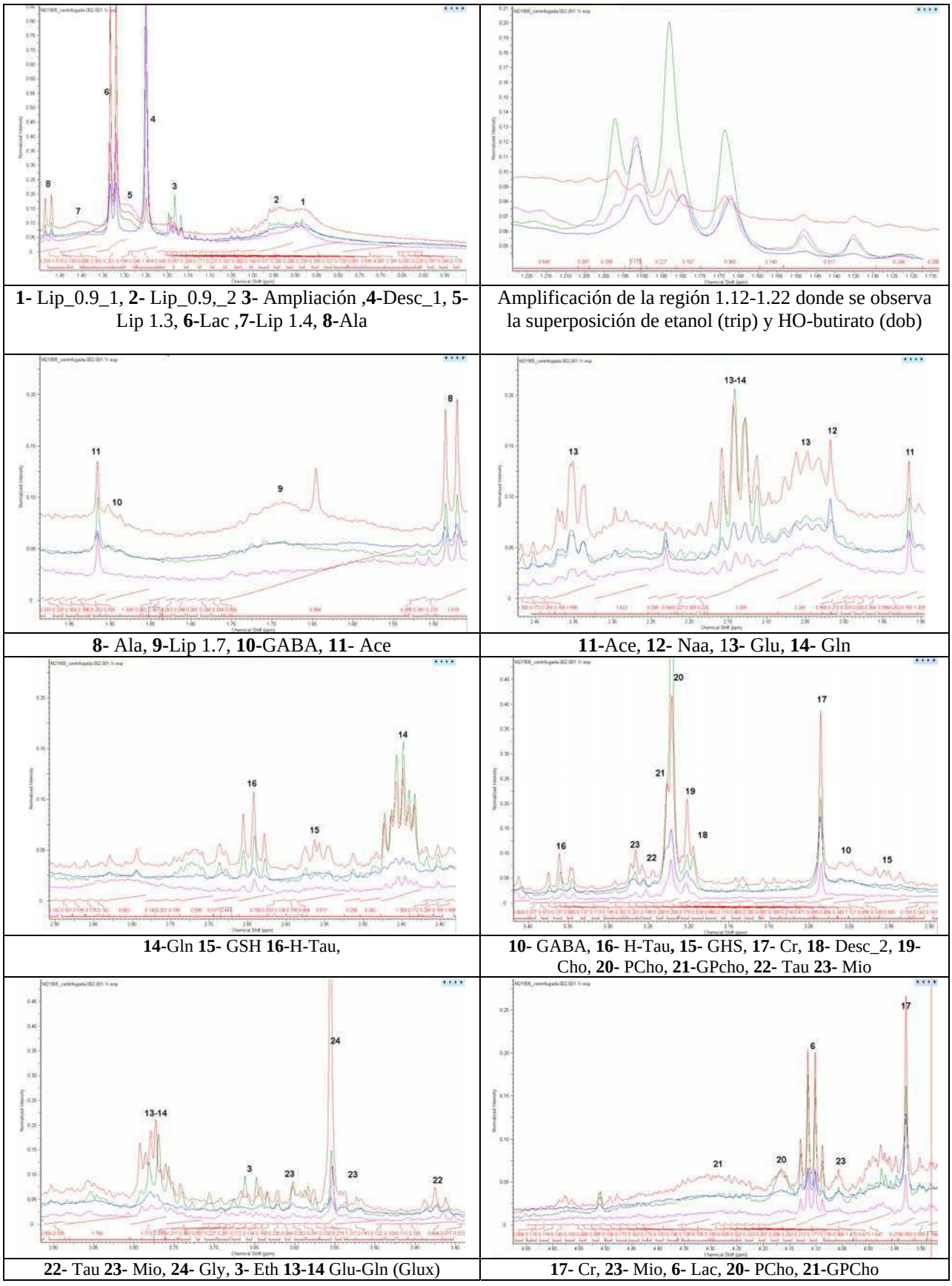


Figura VI.2 Segmentación de amplitud variable (manual) en un grupo de espectros de tumores gliales. Esta segmentación permite cuantificar los espectros según "metabolitos", ya que la amplitud de los distintos segmentos depende (en lo posible) de los distintos metabolitos y la superposición entre ellos.



1- Lip_0.9_1, **2-** Lip_0.9,_2 **3-** Ampliación ,**4-**Desc_1, **5-** Lip 1.3, **6-**Lac ,**7-**Lip 1.4, **8-**Ala	Amplificación de la región 1.12-1.22 donde se observa la superposición de etanol (trip) y HO-butirato (dob)
8- Ala, **9-**Lip 1.7, **10-**GABA, **11-** Ace	**11-**Ace, **12-** Naa, 1**3-** Glu, **14-** Gln
14-Gln **15-** GSH **16-**H-Tau,	**10-** GABA, **16-** H-Tau**, 15-** GHS, **17-** Cr, **18-** Desc_2, **19-** Cho, **20-** PCho, **21-**GPcho, **22-** Tau **23-** Mio
22- Tau **23-** Mio, **24-** Gly, **3-** Eth **13-14** Glu-Gln (Glux)	**17-** Cr, **23-** Mio, **6-** Lac, **20-** PCho, **21-**GPCho

Figura VI.3: Detalle de la Figura VI.2 con los distintos picos y sus correspondientes segmentos para la cuantificación de los metabolitos utilizados en este trabajo.

VI.3.3 Grupos tumorales de análisis

Para el análisis de los datos se construyeron dos bases con los grupos de tumores de grado de malignidad contigua, respetando la dificultad que suele tener la anatomía-patología en la caracterización de los tumores gliales:

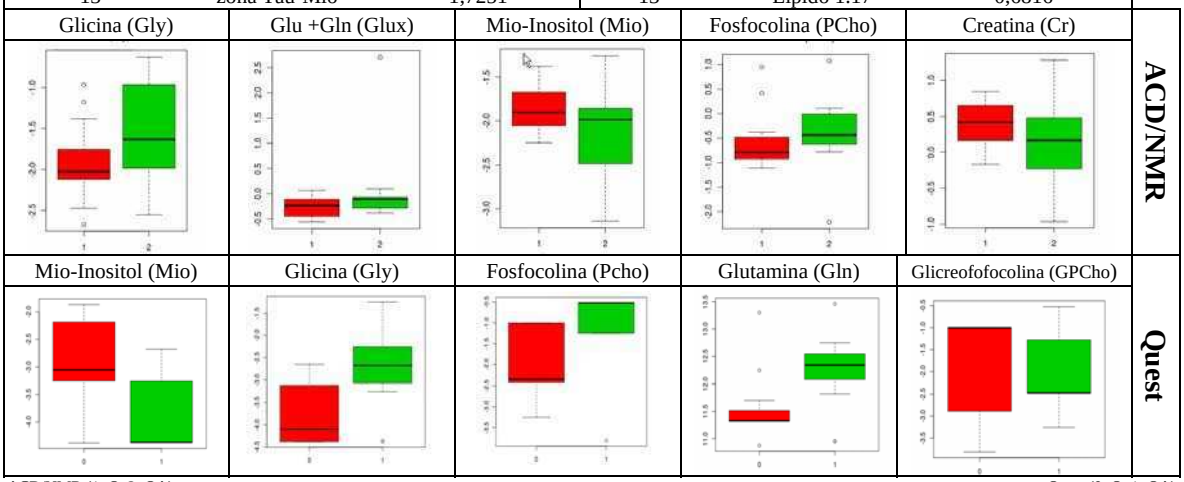
- Base 1: Oligodendrogliomas (O, grado II) - Oligoastrocitomas (OA, grado III), denominada **grupo O-OA**
- Base 2: Oligoastrocitomas (OA; grado III) - Glioblastomas (GB; grado IV), denominada **grupo OA-GB**

En cada uno de esos grupos se analizaron distintas variables genéticas que son relevantes a cada grupo. En el grupo O-OA, 1p-19q por su importancia en la respuesta del tratamiento, 10q por la mala evolución de tumores e IDH1 por el mejor pronóstico de sobrevida. En el grupo OA-GB las mutaciones de los genes CDKN2A, EGFR y la deleción MGMT por la relevancia de estos marcadores en caracterizar estos tumores por agresividad y respuesta al tratamiento.

A continuación, para mayor claridad, se presentan las tablas VI.1 a VI.8 con los metabolitos mas relevantes (coeficientes VIP) resultantes de la clasificación PLS-DA para los programas Quest y ACD/NMR y los diagramas de caja de estos primeros metabolitos. Los resultados completos con los gráficos PCA y PLS-DA 2D y 3D, donde se puede observar la separación de los grupos por la clasificación y la calidad estadística de clasificación PLS-DA (valores R^2 y Q^2) se presentan en el Anexo II.

Tabla VI.1. Metabolitos relevantes (coeficientes VIP) resultantes de la clasificación PLS-DA para el grupo O_OA

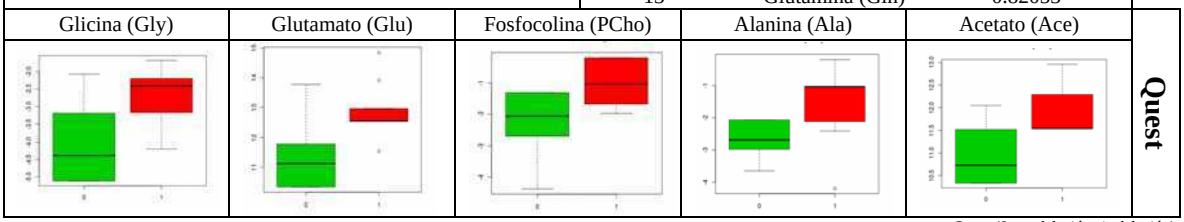
ACD/NMR			Quest		
	Metabolito	Coef VIP		Metabolito	Coef VIP
1	**Glicina (Gly)**	2,8206	1	**Mio-Inositol (Mio)**	1,6444
2	Glutamato+Glutamina (Glux)	2,3835	2	**Glicina (Gly)**	1,6122
3	[3.2793 .. 3.2828]	2,2088	3	Alanina (Ala))	1,5456
4	[3.2391 .. 3.2486]	2,1549	4	**Fosfocolina (PCho)**	1,517
5	**Fosfocolina (PCho)**	2,0991	5	Glutamina (Gln)	1,316
6	**Mio-Inositol (Mio)**	1,9283	6	Glicerocolina (GPCho)	1,0546
7	[4.6402 .. 4.6495]	1,8943	7	Desconocido (Desc_1)	0,99857
8	**Creatina (Cr)**	1,8182	8	**Creatina (Cr)**	0,87567
9	[3.6875 .. 3.6995]	1,8018	9	Valina (Val)	0,84493
10	[4.6261 .. 4.6402]	1,7467	10	Colina (Cho)	0,8369
11	**Creatina (Cr)**	1,742	11	Glutamato (Glu)	0,79068
12	[3.2828 .. 3.2993]	1,735	12	Etanol	0,7687
13	zona Tau-Mio	1,7251	13	Lípido 1.17	0,6816



ACD/NMR (1=O, 2=OA) Quest (0=O, 1=OA)

Tabla VI.2. Metabolitos relevantes (coeficientes VIP) resultantes de la clasificación PLS-DA para el grupo O_OA_1p_19q

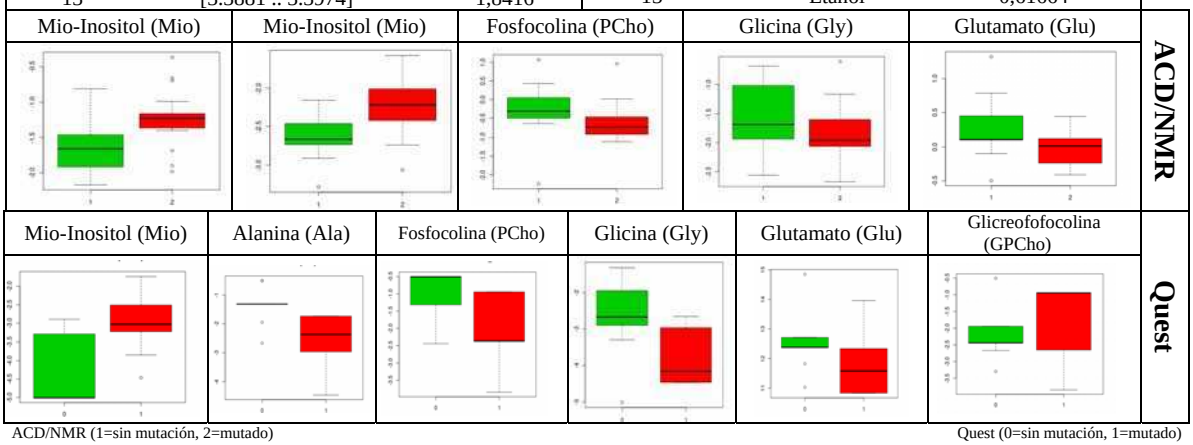
ACD/NMR	Quest		
		Metabolito	**Coef VIP**
Mala estadística	1	Glicina (Gly)	1.7498
	2	Glutamato (Glu)	1.654
	3	Desconocido (Desc_1)	1.3336
	4	Fosfocolina (PCho)	1.2845
	5	GABA	1.2733
	6	Alanina (Ala))	1.2599
	7	Acetato (Ace)	1.0483
	8	Colina (Cho)	0.98616
	9	Lípido 1.17	0.96416
	10	Creatina (Cr)	0.94652
	11	Valina (Val)	0.90461
	12	Lípido 2.02	0.82168
	13	Glutamina (Gln)	0.82053



Quest (0=no deleción, 1=deleción)

Tabla VI.3: Metabolitos relevantes (coeficientes VIP) resultantes de la clasificación PLS-DA para el grupo O_OA IDH1

ACD/NMR			Quest		
	Metabolito	Coef VIP		Metabolito	Coef VIP
1	**Mio-Inositol (Mio)**	2,692	1	**Mio-Inositol (Mio)**	2,0826
2	**Mio-Inositol (Mio)**	2,5699	2	Alanina (Ala))	1,5783
3	[3.6692 .. 3.6835]	2,3023	3	**Fosfocolina (PCho)**	1,5756
4	1er pico Etanol	2,275	4	**Glicina (Gly)**	1,4346
5	2do pico etanol	2,2658	5	Desconocido	1,089
6	**Mio-Inositol (Mio)**	2,2511	6	**Glutamato (Glu)**	1,0827
7	3rer pico etanol	2,2268	7	Glicerocolina (GPCho)	1,0481
8	**Fosfocolina (PCho)**	2,1803	8	Lactato1	1,032
9	[3.6835 .. 3.6875]	2,1589	9	Lactato2	0,91728
10	**Glicina (Gly)**	2,0332	10	Glutamina (Gln)	0,76665
11	pico principal Etanol	1,9665	11	Valina (Val)	0,663
12	**Glutamto (Glu)**	1,933	12	Lípido 2.02	0,62695
13	[3.3881 .. 3.3974]	1,8416	13	Etanol	0,61664



ACD/NMR (1=sin mutación, 2=mutado) Quest (0=sin mutación, 1=mutado)

Tabla VI.4: Metabolitos relevantes (coeficientes VIP) resultantes de la clasificación PLS-DA para el grupo O_OA_10q

ACD/NMR			Quest		
	Metabolito	Coef VIP		Metabolito	Coef VIP
1	**Fosfocolina (PCho)**	3,0428	1	Mio-Inositol (Mio)	1,8623
2	[3.6538 .. 3.6690]	2,5636	2	**Fosfocolina (PCho)**	1,5307
3	Desconocido 1	2,4372	3	Alanina (Ala))	1,4063
4	**Glicina (Gly)**	2,374	4	Colina (Cho)	1,341
5	pico 3r0 etanol	2,2505	5	**Glicina (Gly)**	1,2647
6	[3.6692 .. 3.6835]	2,1931	6	Taurina (Tau)	1,2173
7	[3.6438 .. 3.6538]--	2,1769	7	Desconocido	1,2171
8	Glux	2,0865	8	Glutamina (Gln)	1,0831
9	pico principal etanol	2,0736	9	Valina (Val)	1,0714
10	etanol	2,0379	10	Glicerocolina (G-cho)	0,89453
11	[3.2828 .. 3.2993]	2,0349	11	Creatina (Cr)	0,84102
12	pico 2d0 etanol	2,0108	12	GABA	0,76983
13	Glutamato+Glutamina (Glux)	1,9151	13	Lactato2	0,71699

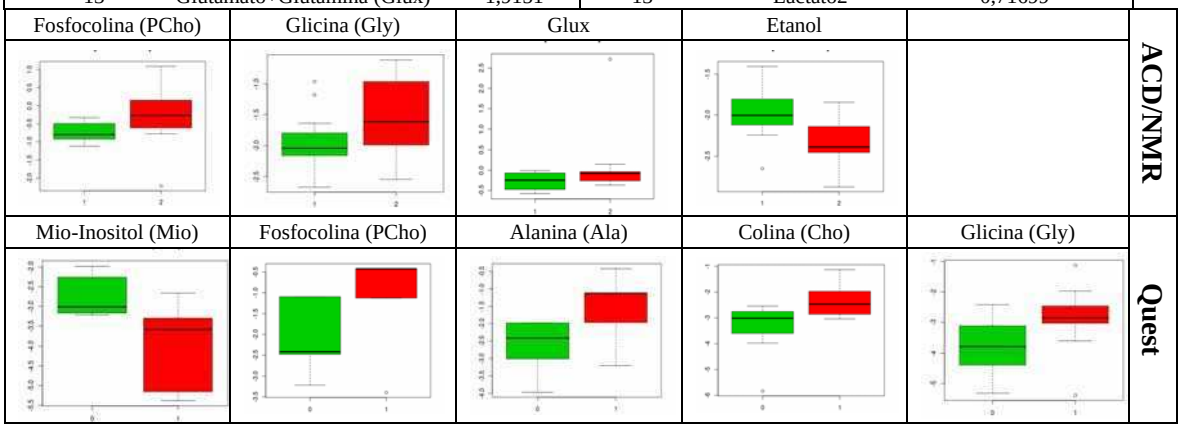
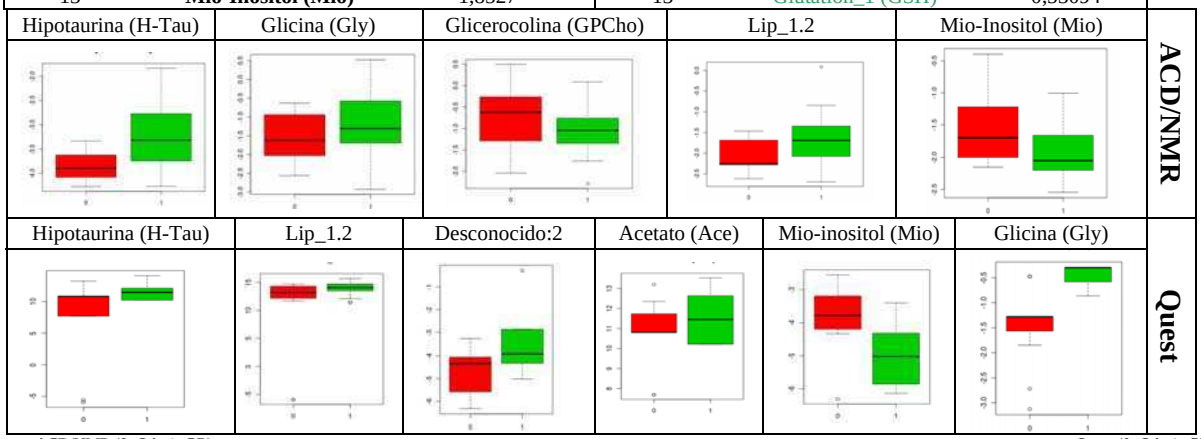


Tabla VI.5: Metabolitos relevantes (coeficientes VIP) resultantes de la clasificación PLS-DA para el grupo OA_GB

ACD/NMR			Quest		
	Metabolito	Coef VIP		Metabolito	Coef VIP
1	**Hipotaurina (H-Tau)**	4,6225	1	**Hipotaurina (H-Tau)**	2,9415
2	**Hipotaurina (H-Tau)**	3,3142	2	**Lipido_1,2**	2,9178
3	Desconocido 1	2,6018	3	Desconocido2 (Desc_2)	1,0253
4	[3.6875 .. 3.6995]	2,3049	4	Acetato (Ace)	1,0125
5	**Glicina (Gly)**	2,1878	5	**Mio-Inositol (Mio)**	0,88059
6	Glicerocolina (GPCho)	2,1088	6	Alanina (Ala)	0,85064
7	[3.2793 .. 3.2828]	2,0654	7	Glutamina (Gln)	0,82708
8	[3.6835 .. 3.6875]	2,0026	8	Lípido_2,02	0,74425
9	**Lipidos 1.2**	2	9	**Glicina (Gly)**	0,68788
10	**Mio-Inositol (Mio)**	1,9636	10	Lípido_0,9_2	0,56252
11	Lípido 0.9_1	1,9489	11	Lípido_1,17	0,54926
12	**ultimo pico Mio-Inositol (Mio)**	1,8691	12	Creatina (Cr)	0,53478
13	**Mio-Inositol (Mio)**	1,8527	13	Glutation_1 (GSH)	0,53094



ACD/NMR (0=OA, 1=GB) Quest (0=OA, 1=GB)

Tabla VI.6: Metabolitos relevantes (coeficientes VIP) resultantes de la clasificación PLS-DA para el grupo OA_GB_CDK2N

ACD/NMR			Quest		
	Metabolito	Coef VIP		Metabolito	Coef VIP
1	**Hipotaurina (H-Tau)**	4,7099	1	**Hipotaurina (H-Tau)**	3,3974
2	[3.3881 .. 3.3974]	2,6837	2	Lípido_1,2	1,4112
3	**Fosfocolina (PCho)**	2,3297	3	Glutamina (Gln)	1,2012
4	**Lactato 1**	2,1867	4	Acetato (Ace)	1,0541
5	Desconocido 1	2,1248	5	Lipido_0,9_1	0,97794
6	Creatina (Cr)	2,1239	6	**Fosfocolina (PCho)**	0,92185
7	Mio-Inositol (Mio)	1,923	7	Glutamato (Glu)	0,89093
8	[3.3798 .. 3.3881]	1,8024	8	Lípido_1,17	0,8773
9	**Taurina (Tau)**	1,7767	9	**Taurina (Tau)**	0,82032
10	Mio-Inositol (Mio)	1,7644	10	Alanina (Ala)	0,71046
11	[3.4454 .. 3.4628]	1,736	11	**Lactato1**	0,67358
12	**Hipotaurina (H-Tau)**	1,5905	12	Lactato2	0,6328
13	Glutamato+Glutamina (Glux)	1,5386	13	Creatina (Cr)	0,58499

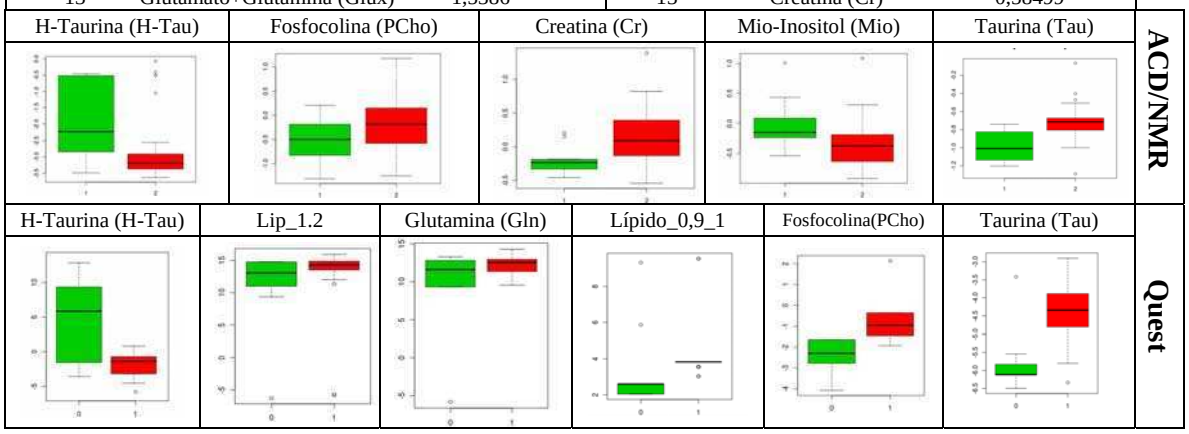
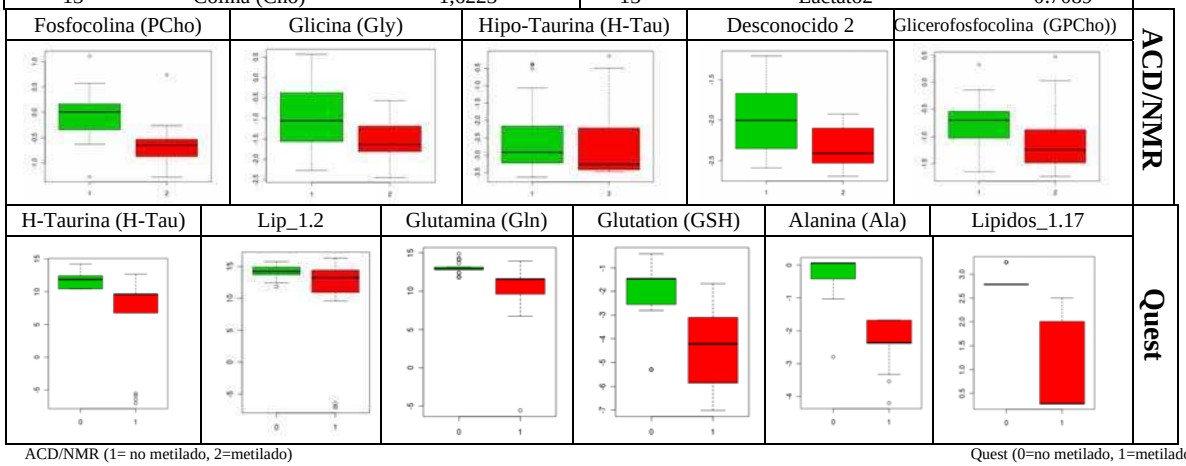


Tabla VI.7: Metabolitos relevantes (coeficientes VIP) resultantes de la clasificación PLS-DA para el grupo OA_GB_MGMT

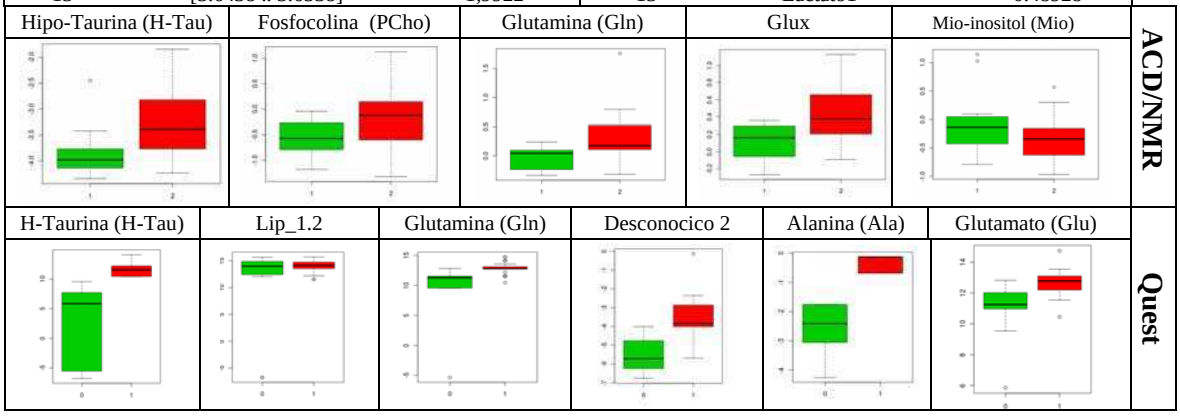
ACD/NMR			Quest		
	Metabolito	Coef VIP		Metabolito	Coef VIP
1	**Fosfocolina (PCho)**	3,3498	1	**Hipotaurina (H-Tau)**	2.9905
2	**Glicina (Gly)**	3,3478	2	Lipido_1.2	1.9418
3	[1.2243 .. 1.2804]	2,7429	3	Glutamina (Gln)	1.396
4	**Hipotaurina (H-Tau)**	2,6378	4	Glutation (GHS)	1.0726
5	**Hipotaurina (H-Tau)**	2,1541	5	Alanina (Ala)	0.94559
6	[3.3881 .. 3.3974]	1,9536	6	Lipidos_1.17	0.91882
7	Desconocido 2	1,9403	7	**Fosfocolina (PCho)**	0.83782
8	[3.2082 .. 3.2121]	1,9338	8	Glutamato (Glu)	0.82165
9	Glicerocolina (GPCho)	1,7833	9	Mio-Inositol (Mio)	0.8204
10	1er pico Etanol	1,76	10	Taurina (Tau)	0.77117
11	[1.4524 .. 1.4991]	1,6441	11	**Glicina (Gly)**	0.76212
12	[3.6538 .. 3.6690]	1,6289	12	Acetato (Ace)	0.74255
13	Colina (Cho)	1,6223	13	Lactato2	0.7089



ACD/NMR (1= no metilado, 2=metilado) Quest (0=no metilado, 1=metilado)

Tabla VI.8: Metabolitos relevantes (coeficientes VIP) resultantes de la clasificación PLS-DA para el grupo OA_GB_EGFR

ACD/NMR			Quest		
	Metabolito	Coef VIP		Metabolito	Coef VIP
1	**Hipotaurina (H-Tau)**	4,2507	1	**Hipotaurina (H-Tau)**	3.6685
2	**Hipotaurina (H-Tau)**	3,0588	2	Lipido_1.2	1.7993
3	**Fosfocolina (PCho)**	2,6191	3	**Glutamina (Gln)**	1.3857
4	**Glutamina (Gln)?**	2,5872	4	Dsconocido2	0.95181
5	[3.6692 .. 3.6835]	2,484	5	Alanina (Ala)	0.91495
6	**Glutamato+Glutamina (Glux)**	2,3473	6	**Glutamato (Glu)**	0.75026
7	Mio-Inositol (Mio)	2,1916	7	Lipidos_1.17	0.74828
8	Desconocido 1	2,0412	8	Desconocido	0.68706
9	[3.6538 .. 3.6690]	2,0074	9	Lipido_2.02	0.63749
10	**Glicina (Gly)**	2,0057	10	**Fosfocolina (PCho)**	0.58001
11	Creatina (Cr)	1,9946	11	Glutation (GSH)	0.56064
12	[3.6835 .. 3.6875]	1,9944	12	**Glicina (Gly)**	0.52846
13	[3.6438 .. 3.6538]	1,9922	13	Lactato1	0.48928



VI.4 Análisis de los resultados

El análisis de los datos que se presenta a continuación analiza los grupos O-OA y OA-GB, de modo de comparar grupos de tumores contiguos respecto a su agresividad. Las tablas que muestran los perfiles genéticos de los distintos tumores analizados en este trabajo (Anexo I) permiten identificar dos grupos bien diferenciados, los O (grado II) y los GB (grado IV), ya que los valores de IDH1, 10q y EGFR son "0,1,1" en todos los GB y "1,0,0" en los O. Los OA (grado III) son un grupo de transición, donde no existe, a excepción del 10q, un parámetro genético que claramente diferencie a los OA de los O o a los OA de los GB. Por esta razón y, para simplificar el análisis, sólo se realizaron las comparaciones entre O-OA y OA-GB de aquellos parámetros genéticos relevantes en cada grupo:

- 1p-19q, 10q y IDH1 en O-OA y
- 10q, CDKN2A EGFR MGMT en OA-GB.

Grupo O-OA

Los pesos VIP de la clasificación hecha a partir de la cuantificación de los metabolitos por Quest fueron siempre menores que el cálculo de áreas por "bins" realizado con el programa ADC/NMR. Sin embargo, la estadística, dada por los valores de R^2 y Q^2 es considerablemente mejor con Quest que con ADC/NMR. Con estos últimos, en muchos casos, la certeza estadística es muy baja, pero sirve como herramienta para verificar y confrontar los resultados con Quest, donde varios espectros y metabolitos (Asp, GSH, Gluc, H-Tau) fueron eliminados del análisis por tener valores de Cramer-Rao con un error excesivo.

Dentro del grupo O-OA puede identificarse un patrón dado por los metabolitos Gly, Glux (Glu+Gln), PCho, Mio, y Cr que permite una buena diferenciación entre los O y los OA (Tabla VI.1). Esos metabolitos surgen como las sustancias más relevantes. Esto se observa con los dos métodos de cuantificación usados, aunque con distinto valor estadístico. Del diagrama de cajas, que se repite también para los dos métodos de procesamiento, surge que la concentración de Gly, PCho y Glux en los OA es mayor que en los O, y que el Mio y la Cr son mayores en O. Solo con Quest aparece GPCho como un metabolito relevante con mayor concentración en O que en OA.

Respecto a la alteración del gen IDH1, nuevamente los dos métodos muestran un buen patrón de separación dado principalmente por el Mio (Tabla VI.3). Nuevamente la PCho, Gly y Glu complementan la clasificación, pero con otro pesos estadísticos comparados con la

clasificación O-OA. El diagrama de cajas muestra que la concentración de Mio es marcadamente mayor en los tumores con la deleción IDH1 y que en el resto de los metabolitos que hacen a la clasificación la relación es inversa. En particular, la Gly es mayor en los tumores sin deleción, con solapamiento casi nulo de valores entre los tumores con y sin deleción en el análisis con Quest.

La comparación de 1p-19q en este grupo mostró un comportamiento disímil entre Quest y ACD/NMR (Tabla VI.2). El análisis de ACD/NMR no permitió ver una separación entre los dos grupos, sin embargo la cuantificación de los espectros con Quest dio una buena clasificación, con los mismos metabolitos (Gly, PCho, Glu) en mayor concentración en aquellos tumores con la deleción 1p, la 19q o ambas deleciones.

Ambos métodos de análisis permiten una clasificación de la deleción 10q, sin embargo el patrón de metabolitos no resultó tan claro como con la clasificación O-OA y O-OA_IDH1 (Tabla VI.4). Las sustancias que separan este deleción genética son las mismas que en la clasificación O-OA ya que la diferencia entre los grupos O-OA y 10q proviene sólo de dos muestras, como se puede ver en el Anexo I. Nuevamente la PCho y la Gly son metabolitos relevantes evidenciados por ambos métodos, y como ocurrió en el caso de O-OA la certeza estadística es mejor con Quest aunque el peso estadístico de los metabolitos es moderado.

Grupo OA-GB

En el caso de los tumores del grupo OA-GB, los patrones de metabolitos que permitirían clasificar la deleción o no de los genes estudiados resultó más compleja. En primera instancia, todos los grupos OA-GB muestran a la H-Tau como un metabolito importante en las clasificaciones. Además, en todas las clasificaciones con Quest, salvo la de OA-GB, se repite la secuencia H-Tau, Lip 1.2, Gln como los metabolitos más relevantes.

Para el caso OA-GB (Tabla VI.5), los diagramas de caja de estas sustancias muestran que la H-Tau es un marcador con mayor concentración en los GB. Del mismo modo, Lip_1.2 también tiene mayor concentración en GB, como puede verse en los espectros clínicos[16-17], donde es reconocido como un marcador de necrosis. Con ambos métodos de análisis, el Mio también aparece con mayor concentración en OA que en GB, siendo nuevamente un marcador de menor agresividad. En particular con Quest ningún pico del grupo de las “Cho`s” permite diferenciar OA de GB, pero el conjunto de los Lips en general es más abundante en los GB que en los OA. También es interesante resaltar un pico cercano al grupo de Cho que no se pudo asignar a ninguna sustancia (Desc_2). Este pico no se descartó del análisis porque, comparando con espectros de tumores cerebrales de muestras de FLENI

adquiridos con HR-MAS en la Universidad de Valencia[18], se observó este pico con regularidad en varias de las muestras.

La deleción CDK2N (Tabla VI.6) presenta un cambio interesante, los tumores con esta deleción son los que tienen menor concentración de H-Tau. La PCho resultó un marcador relevante con valores de concentración mayor en los tumores con deleción CDK2N, ya que aparece como una sustancia principal con ambos métodos de análisis. Resulta interesante también la presencia de la Tau con mayor concentración en los tumores con deleción, observada con ambos métodos de análisis. Las estadísticas en esta clasificación son muy buenas con los dos métodos, evidenciado en los buenos valores de R^2 y Q^2 (Anexo II).

En el caso de MGMT (Tabla VI.7), la estadística del análisis ADC/NMR no es buena, nuevamente la H-Tau, PCho y Gly son los marcadores mas importantes, con mayor concentración de todos en los tumores sin metilar. También, todos los picos del grupo de Cho están presentes con esta técnica de análisis, con mayor concentración en los tumores que no tienen la metilación. Por otra parte, en el análisis con Quest, la estadística es muy buena, con la presencia relevante (después del grupo H-Tau, Lip 1.2, Gln) de GHS, un conocido antioxidante, con menor concentración en los tumores que están metilados.

En el caso de EGFR, el análisis con ADC/NMR resulta en una estadística pobre en la clasificación. En el caso de Quest, además de los 3 primeros metabolitos (H-Tau, Lip 1.2, Gln) se destaca la presencia de la sustancia Desc_2, Ala y Lip 1.7 con buena separación entre concentraciones como se ve de los diagramas de bloques.

VI.5 Discusión

De los gráficos y los metabolitos que clasifican los dos grandes grupos de tumores, es posible inferir un grupo de metabolitos que diferenciaría patrones tumorales. Así se seguiría un patrón en el cual, al malignizarse un tumor, la concentración de H-Tau, Gly, PCho Glu, Gln y distintos tipos de Lips aumenta y la de Mio disminuye. Este es un patrón que coincide parcialmente con trabajos similares recientes de HR-MAS[19] (con el Mio, PCho, GPCho) y fuertemente con muestras liofilizadas[20] (Gly, Mio, Glu-Gln). También se observó una mayor concentración de GPCho en los tumores de bajo grado comparado con los de alto grado (Tablas VI.1 y VI.3) y un aumento de PCho en los de alto grado respecto a los de bajo grado, comportamiento ya observado por otros autores[5-21]. En particular es interesante el rol de la Gly en la clasificación de los tumores gliales, que está analizado en algunos trabajos recientes del gran número de trabajos de espectroscopia en tumores[22-23-24-25-26]. Una aparente

contradicción surgiría del análisis del grupo O-OA con Quest que muestra que la Gly y la PCho son mayores en los tumores con deleción de 1p-19q, que son los que mejor sobrevida tienen. Sin embargo debe tenerse en cuenta que lo que define la deleción 1p-19q es la respuesta al tratamiento, no siendo un marcador de agresividad por si mismo.

Un marcador genético muy importante en tumores gliales es el IDH1, ya que se cree que es el primer cambio genético en manifestarse en los tumores O-OA y su deleción es un marcador básico de benignidad. Con IDH1, los metabolitos Mio, PCho y Gly fueron los marcadores importantes en la clasificación. La presencia de Mio en los espectros clínicos es considerado como un marcador de menor agresividad en los tumores gliales[27-28-29-30]. Otros dos metabolitos que aumentan con la no deleción del IDH1 es el conjunto de Glu-Gln. En el caso de 10q nuevamente la PCho y Gly son los marcadores relevantes con mayor concentración en los tumores que tienen la deleción, con aportes de Glu-Gln.

En el caso de la diferenciación del grupo OA-GB, la concentración de H-Tau marca la principal diferencia entre GB y OA. Con los dos métodos de análisis el Mio (nuevamente) aparece como un marcador importante, donde una mayor concentración implicaría menor agresividad. Con los dos métodos también los distintos tipos de “Lip`s” empiezan a aparecer como marcadores relevantes, aun cuando en estas muestras no se tiene medida la concentración real, por el procedimiento de centrifugado que se les realizó para tener una buena homogeneidad de campo. En general, en la preparación de las muestras se buscó quitar los restos sólidos por los problemas que generan en la homogeneidad del campo magnético. Sin embargo, la contribución de los Lip`s en la clasificación concuerda con lo observado en los espectros de los tumores “in vivo” donde por ejemplo las señales de lípidos a 0,9 ppm y 1,3 ppm, que coinciden con los Lip_1.2 y Lip_0.9 de este trabajo, constituyen un diferenciador de O-OA y GB por MRS clínica[31].

En el caso de CDK2N, ambas técnicas dan resultados con buena estadística, pero sin mostrar un patrón claro de metabolitos al comparar Quest y ACD/NMR, excepto por la H-Tau que aparece con mayor concentración en los tumores sin deleción, un comportamiento distinto al observado con las otras alteraciones genéticas. También es interesante la presencia de la Tau, que aparece con los dos métodos de análisis, ya que es una sustancia que podría ser medida en un espectro clínico si se tiene una buena homogeneidad. Independientemente de la relación entre CDK2N y la Tau, esta sustancia fue asociada como un marcador de apoptosis en tumores cerebrales “in vitro”[32].

En el caso de MGMT y EGFR la estadística del análisis con ADC/NMR es pobre, pero nuevamente se destaca la presencia de H-Tau. El análisis con Quest de MGMT muestra la presencia de GSH en los no metilados, siendo GSH un antioxidante caracterizado en otros estudios[33] como un marcador relevante por la mala respuesta al tratamiento. La presencia de GHS se asocia a que las células tumorales resisten mejor la radio y quimioterapia. En el caso de EGFR, la presencia de Desc_2 es importante, porque es un pico que se manifiesta en los GB y OA, y casi no se detecta en los O.

Un análisis global de los datos muestra una marcada diferencia entre la fuerza estadística en la clasificación de Quest y ADC/NMR y el valor de importancia que cada sustancia tiene en la clasificación. Donde en general los valores de R^2 y Q^2 son muy buenos con Quest, los valores de VIP del PLS-DA son pobres, mientras que con ADC/NMR se da la inversa.

Se tienen tres grandes diferencias entre los dos métodos de análisis, la primera es la dificultad que tiene el ADC/NMR de resaltar las diferencias por la contribución de los distintos picos de Lip`s y MM`s cuando con Quest algunos aparecen en las clasificaciones de OA-GB, aunque en posiciones no muy relevantes por la centrifugación de las muestras. Además, con ADC/NMR aparecen “bins”, en general de tamaño muy reducido, que no tienen asignado ningún metabolito.

Las otras dos diferencias importantes entre los dos métodos se dan en la línea de base y el solapamiento de las señales de dos o más sustancias, que dificulta la cuantificación. En el caso de Quest, el primer problema está relativamente bien resuelto ya que se tiene en cuenta y se modela al hacer la cuantificación. Ese modelaje depende muchas veces de la relación señal/ruido del espectro (Capítulo IV). En el caso de solapamiento de señales, Quest también permite, si la SNR del espectro es buena, cuantificar cada metabolito por separado con precisión razonable. En el caso de ADC/NMR la cuantificación de los picos con baja concentración puede ser muy afectada por la línea de base o por la superposición de señales. En ese sentido Quest es un mejor programa para el análisis de espectros de alto campo, ya que permite una mejor modelización de la línea de base (background) y una mejor estimación de metabolitos donde existe solapamiento de las señales. Con ADC/NMR, estos dos problemas afectan notablemente los resultados de la cuantificación. En ese sentido, que pocas señales de MM o Lips se identifiquen con ADC/NMR y que señales de baja intensidad y/o superpuestas a una línea de base alejada del cero, sean difíciles de cuantificar no hace a este programa la mejor opción para las sustancias de baja concentración. Este problema podría ser

resuelto con la adquisición de espectros 2D, estudiando los picos de estas sustancias fuera de la diagonal[34].

Por el contrario, ADC/NMR tiene la ventaja de la simpleza del análisis y que el cálculo no depende de una base de espectros individuales, donde malos ajustes de las condiciones iniciales con Quest lleva a cálculos en las concentraciones con mucho error (Cramer-Rao). Entre los problemas a tener en cuenta están los corrimientos de la posición asignada en la base de espectros a las sustancias por cambios de pH[35] o baja relación SNR que hacen que el error en la estimación de las concentraciones se propague al resto de los metabolitos. En este caso, esas sustancias deben quitarse de la base y repetir el cálculo, lo que en cierto aspecto hace a Quest un poco arbitrario y dependiente del operador.

Aun con estas limitaciones, el análisis realizado con estos tumores, permitió encontrar varios parámetros interesantes que se pueden trasladar a los espectros clínicos, en especial, la presencia de Gly. Si bien en un espectro de alto campo los varios picos del Mio no se solapan con el único pico de la Gly, en un espectro clínico con un TE= 30 ms, el pico principal del Mio y el de la Gly resuenan a la "misma" frecuencia (3,56 ppm) y no es posible diferenciarlos visualmente o en un análisis cuantitativo. Sin embargo, es posible inferir la contribución de cada metabolito con la adquisición de dos espectros con distintos valores de TE en la misma ubicación.

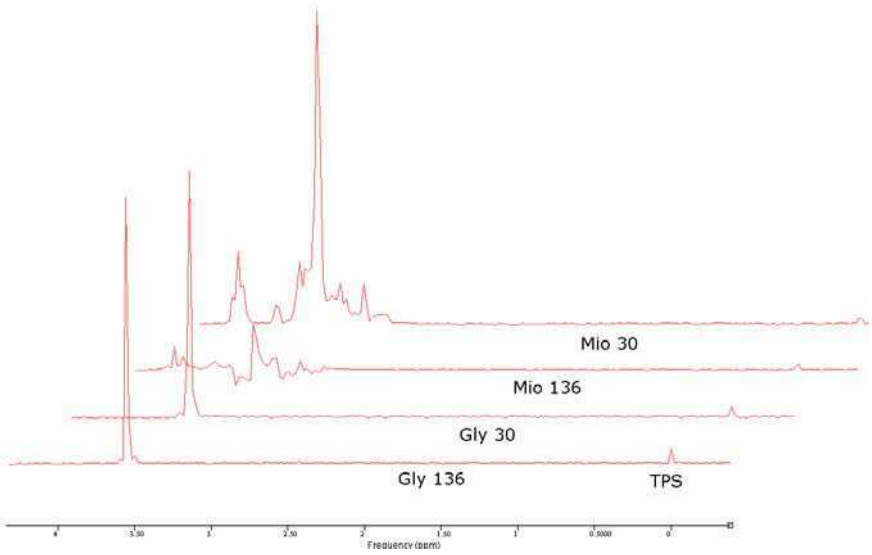


Figura VI.4: Espectros clínicos de Gly y Mio normalizados por altura de TPS a 30 y 136 ms. Puede verse la diferencia de las curvas según el TE donde el Mio decae y cambia de forma mientras que la Gly permanece prácticamente invariante.

Dado que el T_2 del Mio es corto comparado con la Gly y considerando la forma particular de los espectros de estas dos sustancias, en un espectro con TE=136 ms es posible inferir la

presencia de Gly por la forma de la curva ya que el Mio decae mucho mas que la Gly (Fig. VI.4), como se ve en la figura donde los picos están normalizados respecto al TPS.

Este comportamiento permite hacer una comparación retrospectiva de algunos espectros clínicos en tumores que se adquirieron con los dos tiempos de eco para ver si es posible inferir o no la presencia de Gly en el espectro y el grado de agresividad de los mismos.

Los siguientes casos son ejemplos de la diferencia de los espectros y la presencia de Mio y/o Gly y la evolución de los pacientes.

		1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
Gly	OA anaplásico	no del	no del	ambas del	normal	normal	normal	No metilado	wt

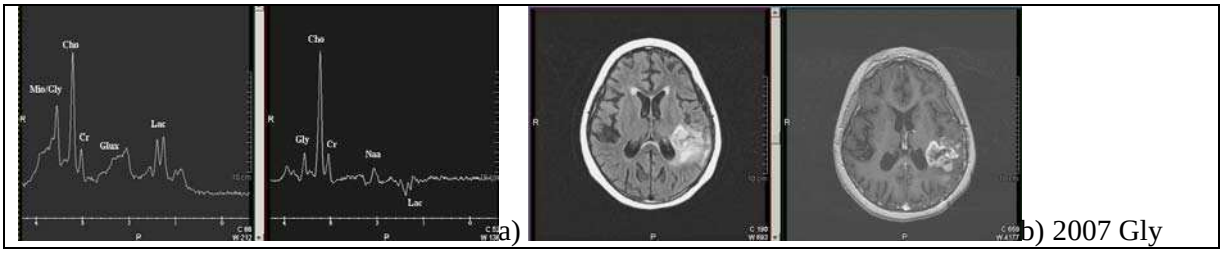


Figura VI.5 Único estudio de un tumor cerebral pre-cirugía a) espectros TE de 30 ms y 136 ms donde claramente se observa mucha caída Naa, Cho muy elevada y Lac. La Gly se ve claramente en el espectro con TE de 136 ms, al disminuir el Mio por el aumento del tiempo de eco b) imágenes FLAIR y T_1.con Gd del tumor.

		1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
Mio/Gly	OA anaplásico	del	no del	ambas del	del	165 x amp.	normal	No metilado	wt

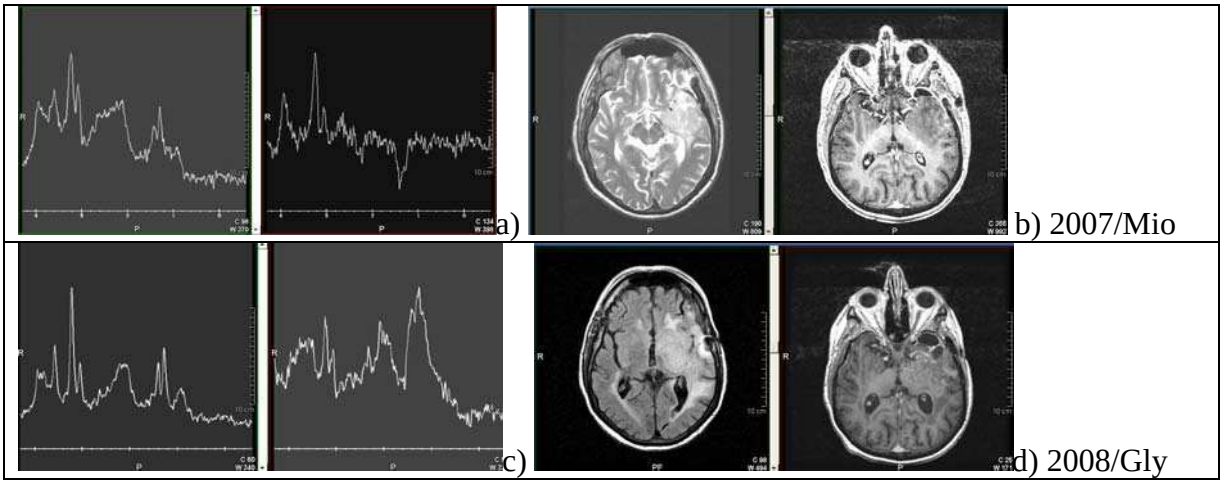


Figura VI.6: OA anáplásico donde en a) el, estudio 2007 muestra en los espectros de 30 ms y 136 ms mucha caída Naa, Cho elevada, Lac y mucho Glux (Glu-Gln) y b) las imágenes T_2 y T_1 con Gd muestran una imagen localizada sin refuerzo, c) el estudio de 2008 muestra en un espectro de 30 ms más Cho, Glux elevado, ausencia de Naa y un claro pico de Gly; otro espectro de 30 ms en otra localización muestra picos de Lip (necrosis) y ausencia de Mio/Gly, d) las imágenes muestran en el FLAIR el crecimiento del tumor y la presencia de refuerzo en la imagen T_1 con Gd.

		1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
Gly	OA anaplásico	no del	no del	ambas del	LOH	164 x amp.	normal	Metilado	wt

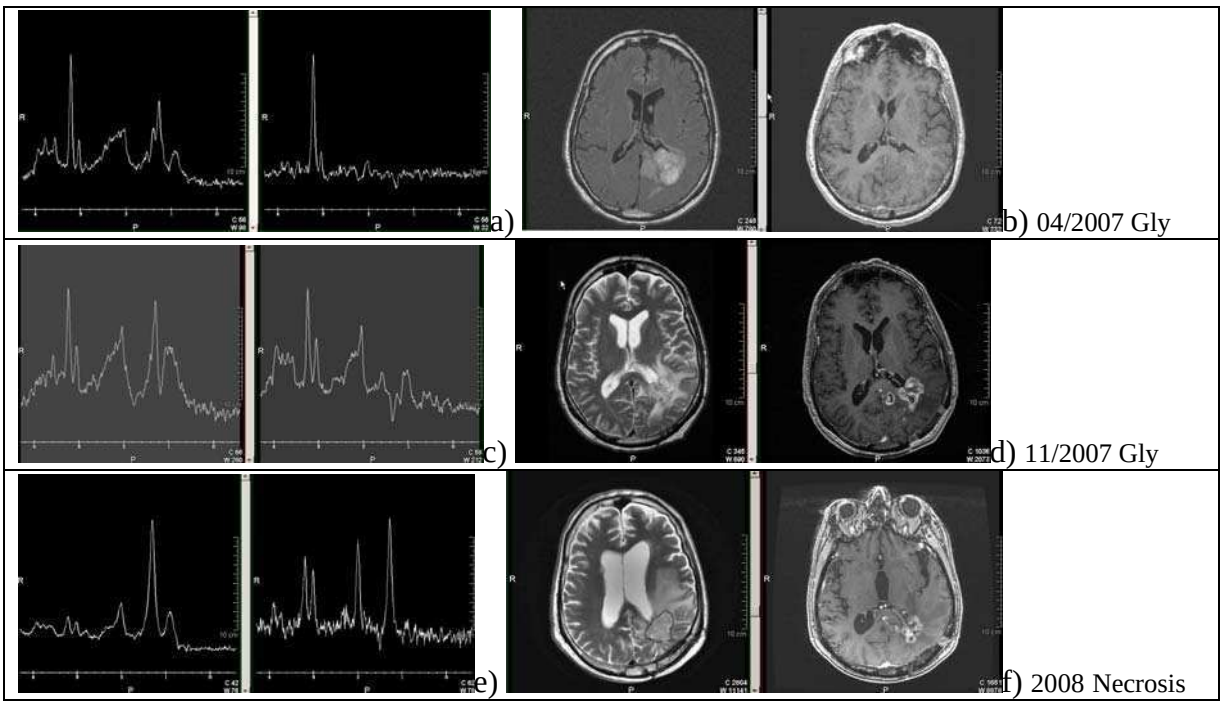


Figura VI.7: OA anaplásico en donde los estudios del 2007 a) y c) muestran mucha caída de Naa, Cho muy elevada, Lac y mucho Glux. Tienen un moderado pico de Mio/Gly visible más claramente en el primer espectro de 30 ms del 11/2007. Las imágenes de 2007 b) y d) muestran la progresión del tumor por el aumento del volumen y el refuerzo en las T_1 con Gd. El estudio 2008 e) post-cirugía muestra en un espectro los dos picos de Lip (necrosis) y ausencia de Mio/Gly y moderada disminución de Naa con aumento del volumen de lesión y refuerzo en la T_1.con Gd.

		1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
Gly	OA anaplásico	parcial	no del	ambas del	LOH	29 x amp.	Normal	No metilado	wt

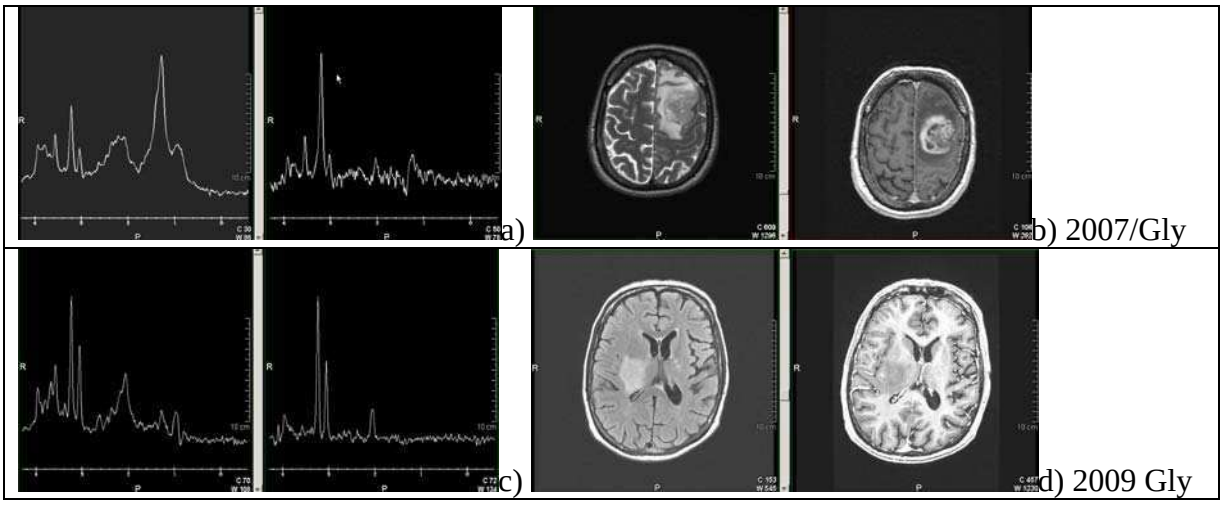


Figura VI.8: OA anaplásico donde el estudio del 2007 a) muestra mucha caída Naa, Cho y Glux elevado, Lac, presencia de Lip y Gly claramente visible en el TE de 136 ms. Las imágenes del 2007 b) muestran el perfil agresivo del tumor por la imagen T_1 con Gd. El estudio de 2009 muestra un comportamiento extraño en las imágenes, d) el tumor cruzó el hemisferio derecho y creció principalmente migrando por las fibras axonales hasta el tronco con un leve refuerzo por el Gd, con un espectro en el hemisferio derecho c) donde se observa un disminuido pico de Gly , moderado aumento de Cho y muy poco Naa.

		1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
Mio	OA	parcial	no del	ambas del	LOH	NA	NA	Metilado	NA

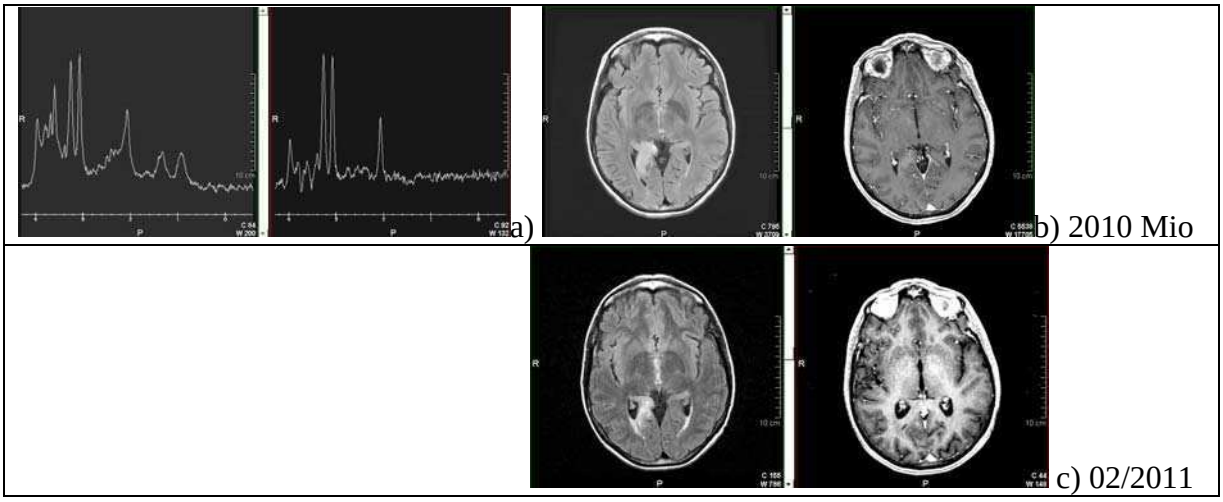


Figura VI.9: OA que mejoró por imagen. En el estudio del 2010 el espectro a) muestra caída del Naa, Cho casi normal y picos de MM elevados, con mínimo pico de Lac, y un elevado pico de Mio (sin pico de Gly) como se puede ver por su disminución en el espectro de 136 ms . En las imágenes b) se observa un leve refuerzo en el cuerpo calloso. El estudio del 2011 c) muestra (sin espectro) que el volumen del tumor disminuyó y el refuerzo por contraste desapareció.

		1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
Gly	GB	parcial	parcial	Del (DMBT-1)	del	3 x amp	normal	Metilado	wt

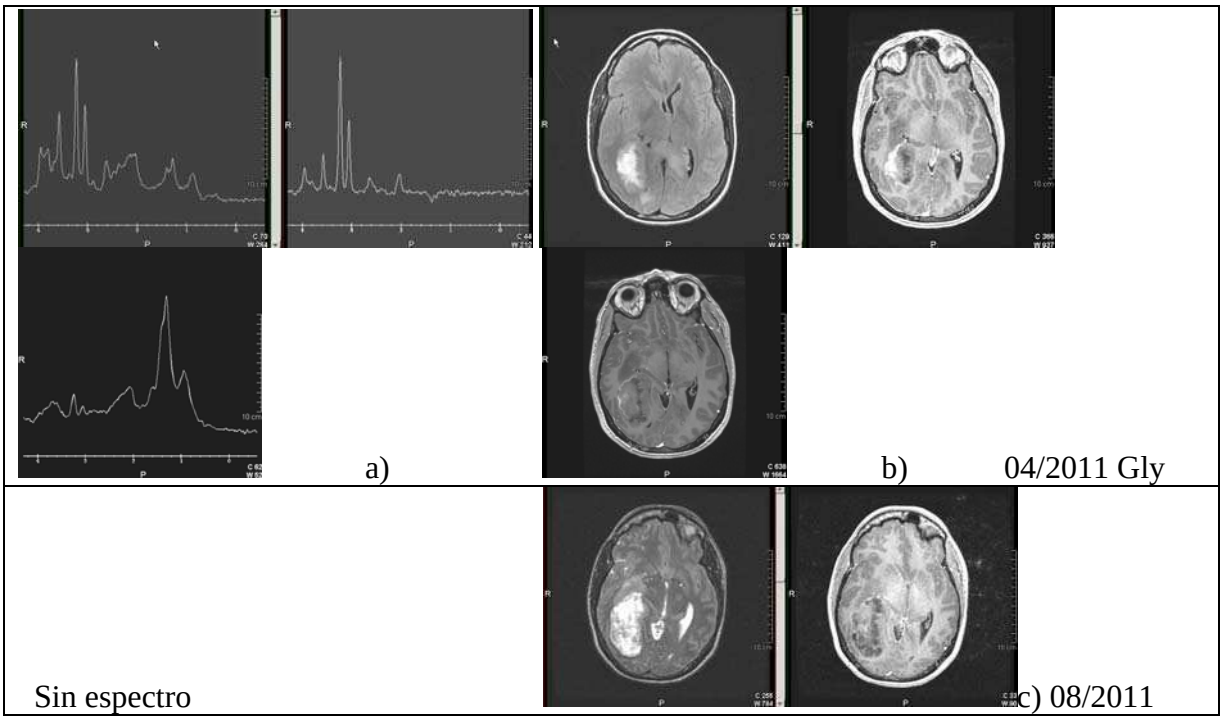


Figura VI.10: Dos estudios de un GB pre-cirugía, a) con un espectro (inferior) del 04/2011 con un claro patrón de necrosis por la elevada presencia de Lip y Cho y dos espectros de 30 ms y 136 ms (superior) donde se observa Cho elevada, Lac, clara disminución del Naa y el marcado pico de Gly. Las imágenes b) muestran un patrón de GB- En el estudio del 08/2011 c) (sin espectro) se observa el marcado aumento de la lesión.

		1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
Gly	OA difuso	no del	no del	del	normal	amp x 38	normal	Metilado	normal

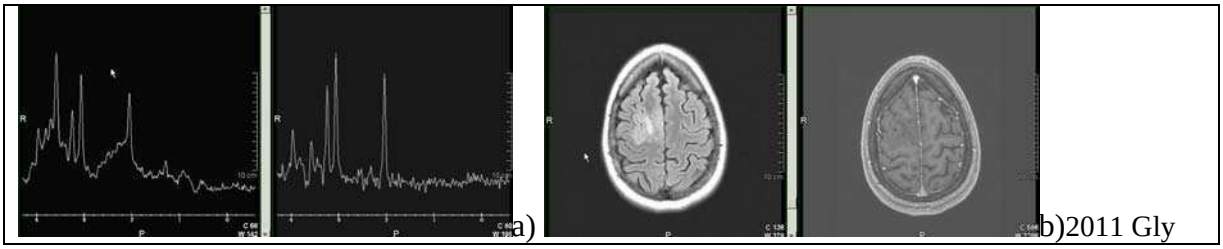


Figura VI.11: OA de células difusas. Los espectros a) muestran una franca caída del NAA y un claro pico Mio/Gly que se observa en el espectro de 136 ms. Las imágenes no captan contraste y muestran apariencia de edema.

		1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
Mio	O	no del	no del	no del	normal	normal	normal	Metilado	R132H

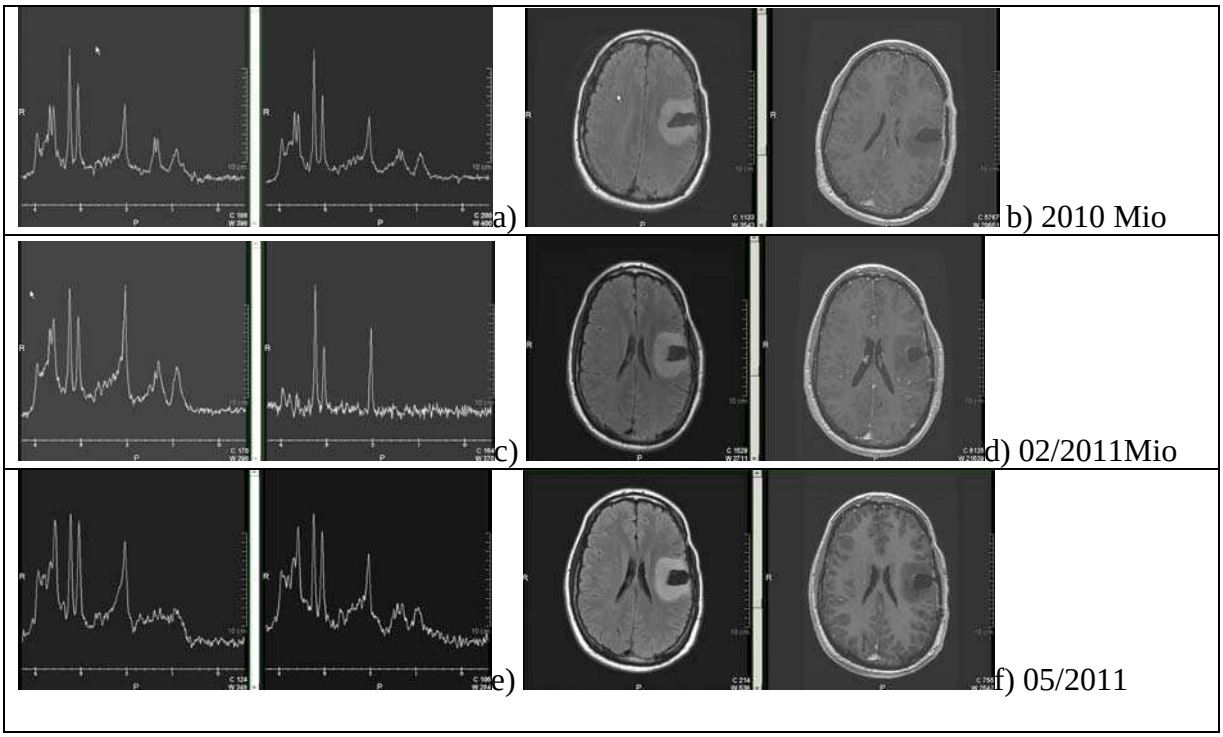


Figura VI.12: O post-cirugía estable que muestra una mejora en los espectros con el tiempo a) y c) por el aumento de Naa y disminución de la Cho y un aumento del Mio, sin cambios significativos en el tamaño del tumor remanente b), d) y f). Sin embargo en el estudio del 05/2011 (sin espectro de 136 ms) se observa en los espectros de 30 ms un marcado aumento de Mio/Gly sin poder diferenciarlos.

También es interesante evaluar el caso particular del conjunto de picos que forman el pico de Colina en un espectro clínico, que esta formado por Cho, PCho y GPCho. Como la PCho y GPCho son dos metabolitos importantes que permiten diferenciar tumores gliales de alto y bajo grado[19-36] y, por los resultados de este trabajo, podrían caracterizar genéticamente tumores gliales, se podrían medir sus concentraciones con un espectro clínico de ^{31}P donde los picos de PCho y GPCho aparecen separados (Fig. VI.5). Esto sin embargo implica un

cambio muy importante en el estudio de los tumores cerebrales ya que se necesitarían bobinas de adquisición, generadores y amplificadores sintonizados con el ^{31}P y nuevas secuencias para poder realizarlos[37-38].

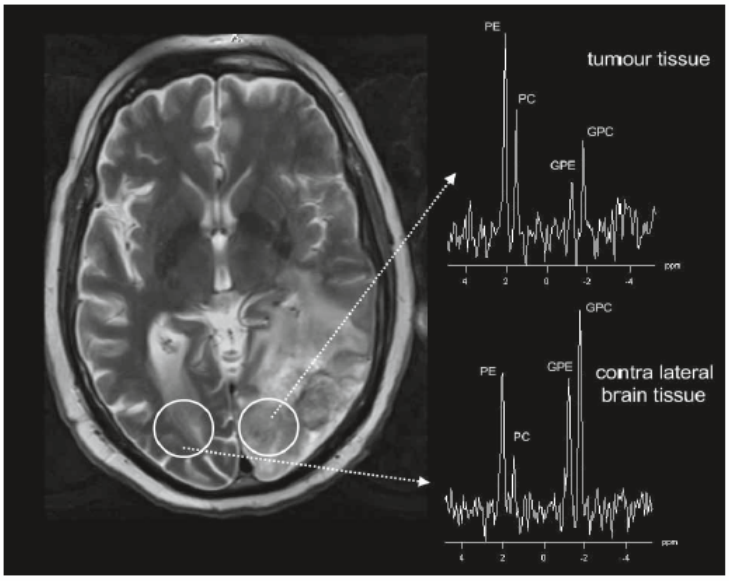


Figura VI.13 Espectros de ^{31}P de GB y tejido normal donde se observa la diferencia de concentración de GPCho (GPC) y PCho (PC) entre tumor y tejido normal (ref 38).

Por último, un aumento de Tau, un metabolito que en espectros clínicos de buena calidad podría ser cuantificable, podría ser un posible marcador de deleción CDK2N y de alteración del proceso anti-tumoral del gen p53. Si bien la posibilidad que la Tau sea un marcador de apoptosis podría estar en contradicción con la correlación entre deleción de CDK2N y Tau, en otros trabajos se observa un aumento de Tau al aumentar el grado de malignidad del tumor, en particular la mayor concentración de Tau se tiene en los GBs[39] y meduloblastomas[40]. En nuestra muestra, la mayoría de los GBs tienen la deleción CDK2N lo que podría manifestar una relación entre CDK2N y Tau.

VI.6 Conclusiones

Este trabajo principalmente muestra que es posible realizar, en equipos de resonancia de alto campo sin la facilidad de HR-MAS, espectros de tejidos mediante una preparación sencilla que consiste sólo en “triturado” y centrifugado, y utilizarlos para realizar una clasificación metabolómica de tumores cerebrales gliales.

Los dos métodos de análisis de los espectros utilizados en este trabajo tienen ventajas y desventajas. El método de “bins” (ACD/NMR) es muy sencillo y fiable, siempre que la segmentación pueda ser manual, pero no permite discriminar muchos metabolitos cuando estos se solapan, en especial el grupo de Lip y MM, que tienen T_2 cortos y FWHM grandes.

En el caso de análisis de espectros por ajuste de curvas de las sustancias individuales (Quest), este método permite una mejor clasificación de los metabolitos, aun de los Lip y MM, pero requiere una muy buena base de datos con los metabolitos y espectros con muy buena relación señal/ruido. De los dos métodos, Quest es sin duda un mejor programa de análisis de estos espectros por la mejor estimación de los Lip`s, MM´s y solapamientos de los distintos metabolitos.

La buena calidad de los espectros de alto campo permitió realizar distintas clasificaciones anátomo-genéticas sobre tumores gliales con buenas resultados estadísticos y similares a otros trabajos de espectroscopia de alto campo. Y si bien, las clasificaciones fueron "globales", donde se pierde un poco la incidencia de las sustancias individuales en la clasificación, algunos metabolitos surgen como diferenciales.

El Mio y la Gly son dos metabolitos que surgen claramente como marcadores y permitirían realizar una estimación del grado de agresividad de un tumor del tipo O-OA. La presencia de Gly elevada sería un predictor de mayor agresividad y el Mio de menor. Y si bien las señales de estas dos sustancias se solapan en un espectro clínico, es posible inferir la presencia de Gly con la adquisición de dos espectros en la misma ubicación y distintos tiempos de eco.

Del mismo modo se observó que una mayor concentración de Glux (Glu+Gln), PCho, GPCho y H-Tau son marcadores de malignidad, aunque utilizar estos metabolitos para caracterizar espectros clínicos de tumores es mucho mas complicado por la dificultad en la detección y la cuantificación.

El aumento del pico de Cho que se observan en los espectros de los tumores clínicos (que es la suma de señales de Cho, PCho y GPCho), podría ser analizado con espectroscopia clínica de ^{31}P para estimar sí la mayor contribución corresponde a la PCho o a la GPCho y así determinar el grado de agresividad del tumor.

Además, la Tau, un metabolito difícil de identificar en los espectros clínicos, podría ser un marcador molecular a ser usado para evaluar alteración del control antitumoral p53 en espectros clínicos de buena calidad.

La espectroscopia de alto campo se está revelando como una herramienta útil para el estudio metabolómico en distintos tejidos/fluidos biológicos. En particular este trabajo muestra que permite realizar clasificación de tumores gliales, y que parte de los resultados pueden trasladarse a la espectroscopia clínica actual. Es muy probable que con métodos de análisis bien protocolizados y métodos de clasificación optimizados pueda llegar a servir como un

método más de clasificación de tumores cerebrales “in-vitro” al mismo nivel que las técnicas genético-moleculares. Es de esperar además que con el aumento del campo B_o de los resonadores clínicos, espectros de mejor resolución permitan aplicar los resultados in-vitro para una mejor clasificación in-vivo de los tumores gliales[41].

Corolario

IDH1 mutación en tumores gliales y producción de *2-hidroxiglutarato (2HG)* medido por RMN

C.1 Introducción

En los últimos años se ha demostrado que la mutación IDH1 es un indicador genético que en tumores gliales indica buena prognosis[42-43-44], independiente del tratamiento al que se someta al tumor. Se sabe que los tejidos con esta mutación tienen asociado un aumento de 2-hidroxiglutarato (2HG) intra y extracelular[45-46]. Y si bien la técnica para determinar la mutación IDH1 es por medio de análisis genéticos, la posibilidad de identificar 2HG en tumores gliales por medio de espectroscopía de alto campo posiblemente permitiría caracterizar a los mismos, con la ventaja de la sencillez y practicidad de la RMN.

En trabajos recientes se ha mostrado la capacidad de la HR-MAS 1D y 2D[47-48] para detectar al 2HG en muestras de tumores gliales. Este metabolito puede identificarse en espectros de alto campo porque presenta varios multipletes en regiones que no muestran gran solapamiento con otras sustancias. En particular dos grupos de señales son los más fáciles de definir, cerca del triplete del Mio a 4,02 ppm (cuadruplete) y entre Glu y Gln a 2,25 ppm (multiplete) (Fig. VI.14).

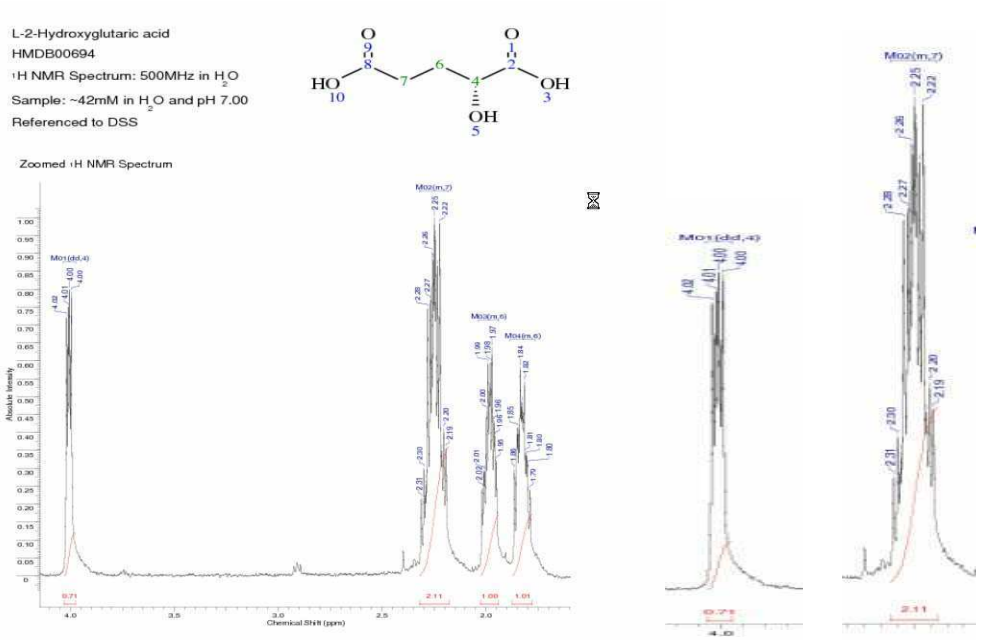


Figura VI.14: Espectro de 500 MHz de 2-(L)-hidroxiglutarato con las ampliaciones de los grupos a 4 ppm y 2,25 ppm (de Human Metabolome Database http://hmdb.ca).

Si bien en el procesamiento de los espectros descrito en este capítulo no se evaluó el 2HG, a continuación se presenta un análisis preliminar, en los 3 grupos tumorales aquí definidos (O, OA y GB), para determinar si los mismos mostraban presencia de 2HG. El propósito fue ver

si la metodología utilizada para preparación de la muestra era adecuada para identificar esta sustancia y determinar como se relaciona la presencia o ausencia de la mutación IDH1 según el análisis genético realizado a las muestras (Anexo I), con la sustancia 2HG. Dada la combinación de una posible baja concentración y una mala homogeneidad de campo que se puede traducir en la imposibilidad de resolver grupos de picos en un espectro 1D, el análisis de los espectros 1D (medidos con la secuencia zgpr) de las muestras se complementó con el de los espectros 2D H-H TOCSY que permiten identificar el 2HG por los picos de correlación a 4,02/2,25, 4,02/1,98 y 4,02/1,89 ppm (Fig. VI.15)

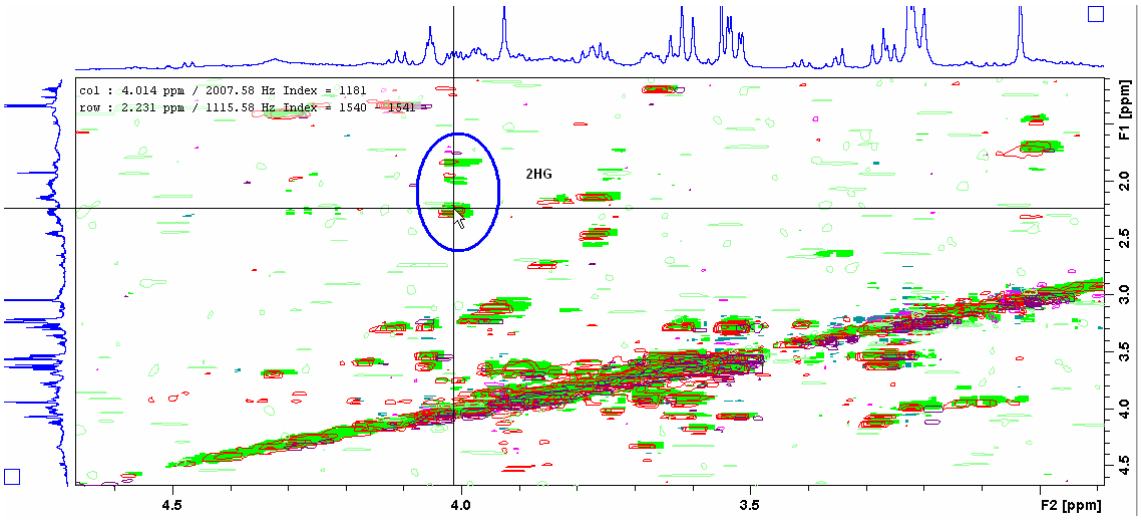


Figura VI.15: Superposición de 3 espectros 2D H-H TOCSY de 3 muestras distintas en los que se observaba la presencia de 2HG en los espectros 1D. Claramente se pueden observar los picos de correlación a 4,02/2,25, 4,02/1,98 y 4,02-1,89 ppm que identifican al 2HG.

C.2 **Resultados**

Las siguientes figuras presentan las ampliaciones de los espectros en regiones especificas (2HG, Gly-Mio y el grupo de las “colinas”) de los distintos grupos de tumores (O-OA-GB). Los espectros de cada uno de estos grupos fueron separados según distintos criterios para un mejor análisis. Estas separaciones se describen a continuación.

- Oligodendrogliomas (O)

Como en el grupo de los O solo había una muestra de tejido con IDH1(-) (no mutado), este grupo de tumores se separó en dos, uno en los que se aseguró la presencia de 2HG (los 8 superiores) y otro en los que no (los 6 inferiores) (Fig. VI.16).

En algunos espectros del primer grupo se define claramente la presencia de 2HG con los cuatro picos característicos entre 4,00 ppm y 4,03 ppm, pero en otros la baja homogeneidad no permitía asignar las señales. A pesar de ello, los espectros 2D TOCSY permitieron resolver algunos de los picos fuera de la diagonal que identifican al 2HG. Así por ejemplo, el

primer espectro superior es el único IDH1(-), donde el ancho de los picos debido a la mala homegeneidad no permite definir la presencia de la sustancia, sin embargo el espectro 2D claramente identifica los 3 picos de correlación en la línea de 4,02 ppm (Fig. VI.17).

En un segundo caso, una muestra IDH1(+) (mutado) (espectro violeta del grupo sin 2HG) con un espectro 1D con un patrón de picos similar (aunque solo son 3 picos) en la región de 4,00 ppm y 4,03 ppm no muestra en el espectro 2D el patrón del 2HG (Fig. VI.18).

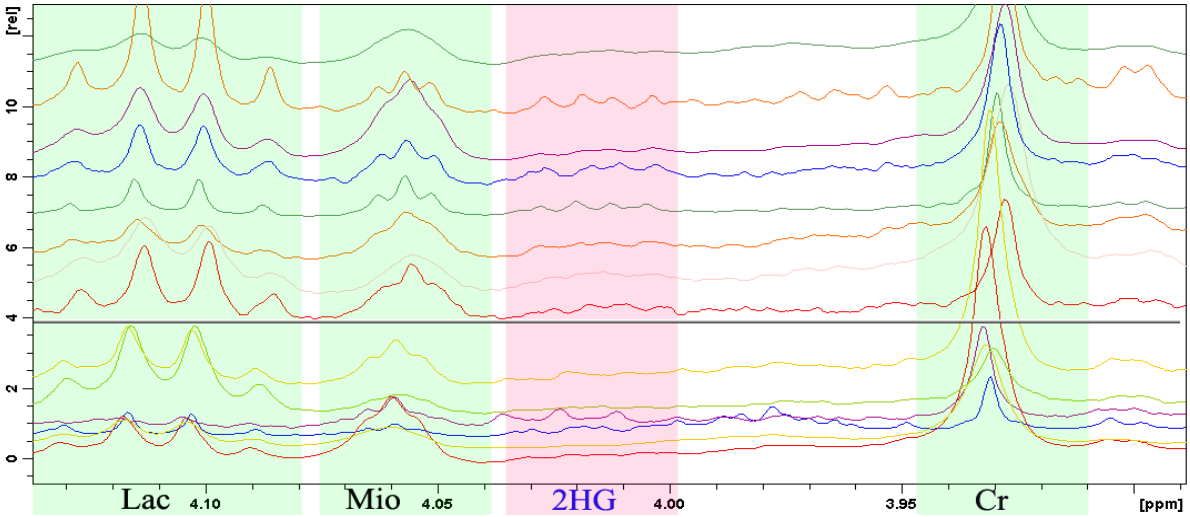


Figura VI.16: Ampliación de los espectros del grupo de tumores O en la región de 4 ppm donde aparece un grupo de picos del 2HG. La línea media negra horizontal separa los espectros con la presencia (grupo superior) de aquellos sin la presencia de 2HG (grupo inferior). En el grupo superior, el primer espectro (color verde) es el único con IDH1(-).

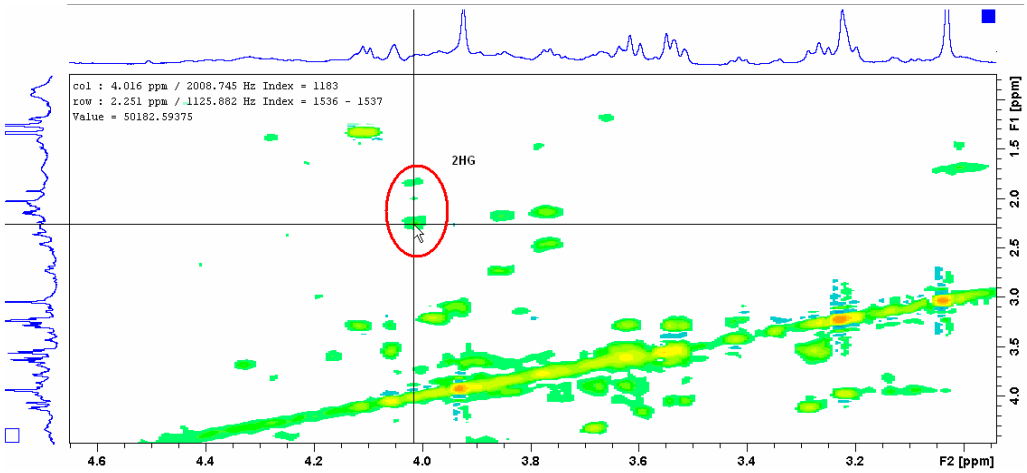


Figura VI.17: Espectro 2D H-H TOCSY de la muestra O 22328 con IDH1(-) en la que contrariamente a lo postulado por la no-mutación IDH1 se observa la presencia de 2HG.

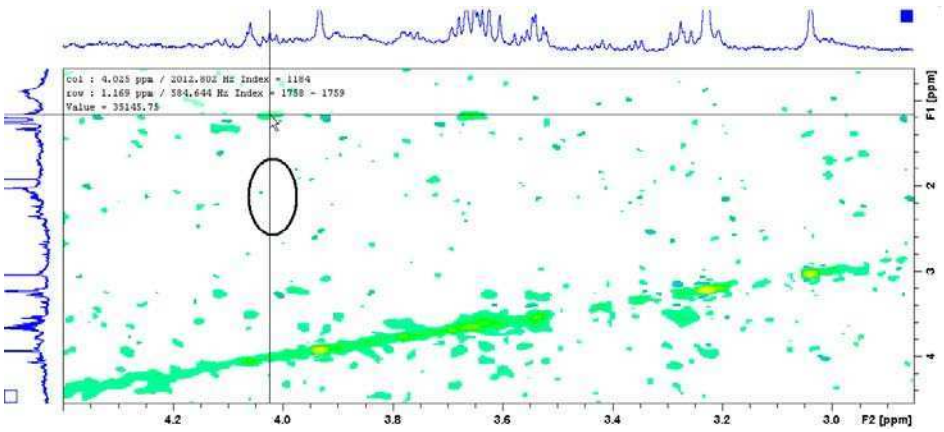


Figura VI.18: 2D H-H TOCSY de la muestra O 21472 con IDH1(+) en la que contrariamente a lo postulado por la mutación IDH1 no se observa la presencia de 2HG.

Es interesante reparar, a partir de la separación de los espectros por la presencia de 2HG, en la relación que existe entre la altura de los picos de Mio-Gly y PCho-GPCho en este grupo de tumores.

En el caso de los picos de Mio-Gly, la altura del Mio es mayor o similar al de la Gly en el grupo de las muestras con presencia de 2HG. Algo similar se observa en las muestras sin 2HG, salvo con dos muestras donde el pico de Gly es marcadamente superior al del Mio (Fig. VI.19). Respecto a los picos de las colinas salvo por un único caso, aquellos tumores con presencia de 2HG muestran un mayor pico de GPCho que PCho, a diferencia de los que no muestran la presencia de 2HG (Fig. VI.20) donde la altura de los picos es similar o la altura de la PCho es mayor que la GPCho. Cabe destacar que el espectro que tiene la Gly acentuadamente elevada, es el mismo con el pico de PCho marcadamente elevado (espectro azul del grupo 2HG negativo).

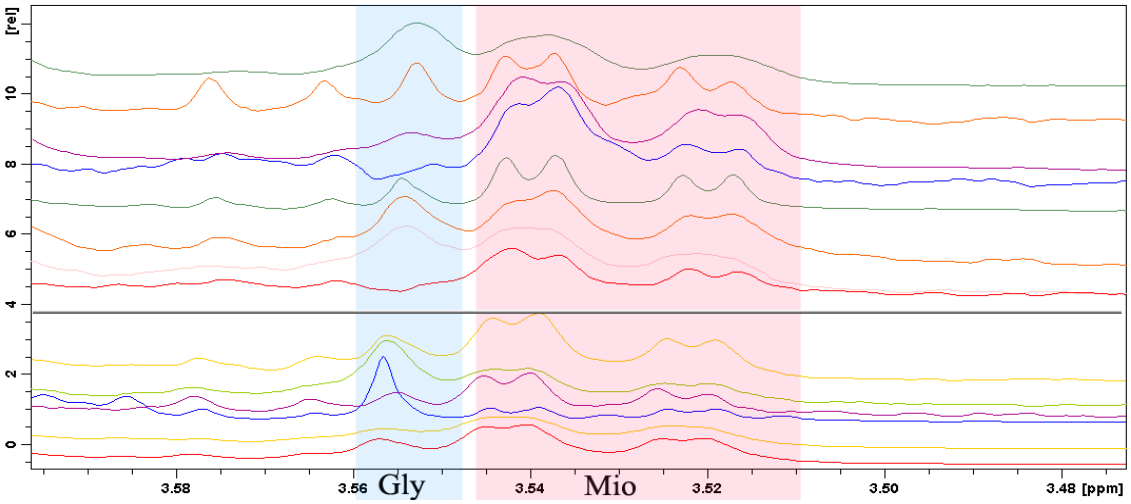


Figura VI.19: Ampliación de los espectros del grupo de tumores O en la región donde aparecen los picos de Gly y Mio. La línea media negra horizontal separa los espectros con la presencia (grupo superior) de aquellos sin la presencia de 2HG (grupo inferior). Salvo por dos casos sin 2HG, en el resto de los espectros la altura de los picos Mio es superior o similar al de la Gly.

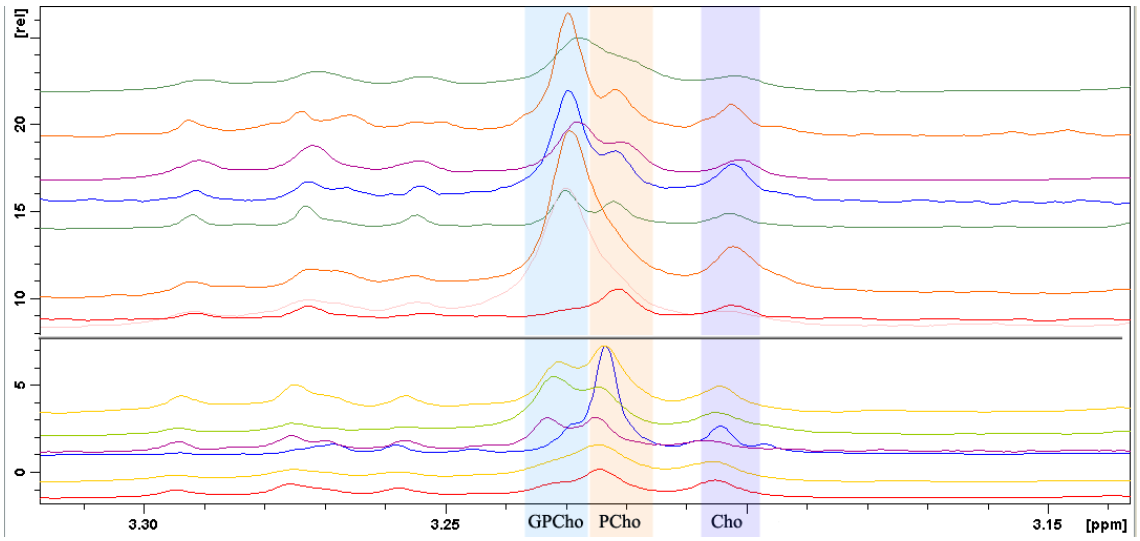


Figura VI.20: Ampliación de los espectros del grupo de tumores O en la región donde aparecen los picos de las "colinas". La línea media negra horizontal separa los espectros con la presencia (grupo superior) de aquellos sin la presencia de 2HG (grupo inferior). En el grupo superior, salvo por un caso la GPCho es mayor que la PCho. Una relación inversa se observa en ausencia de 2HG.

- Astrocitomas (OA)

En este grupo los primeros 4 espectros superiores de la Figura VI.21 corresponden a las muestras de tejido con IDH1(+) y el resto IDH1(-). Los dos primeros no muestran el patrón de picos del 2HG, sin embargo, el espectro 2D permite distinguir la presencia de 2HG en baja concentración de una muestra (OA 21097) (Fig. VI.22). Los otros dos claramente muestran la presencia de 2HG. El grupo de los IDH1(-) restante no muestra presencia de 2HG en los espectros 1D ni en los 2D.

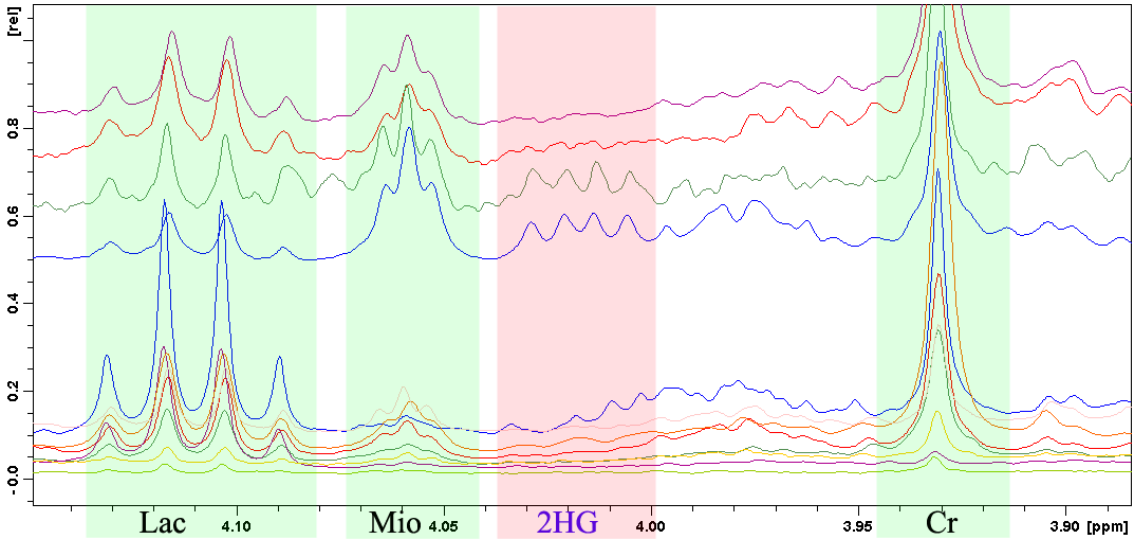


Figura VI.21: Ampliación de los espectros del grupo de tumores OA en la región de 4 ppm donde aparece un grupo de picos del 2HG. Los 4 primeros espectros son IDH1(+) de los cuales los dos últimos claramente muestran la presencia de 2HG, sin embargo en los 2 primeros no es fácil determinar la presencia. Los restantes son todos IDH1(-) y en ninguno de esas muestras se identifica 2HG.

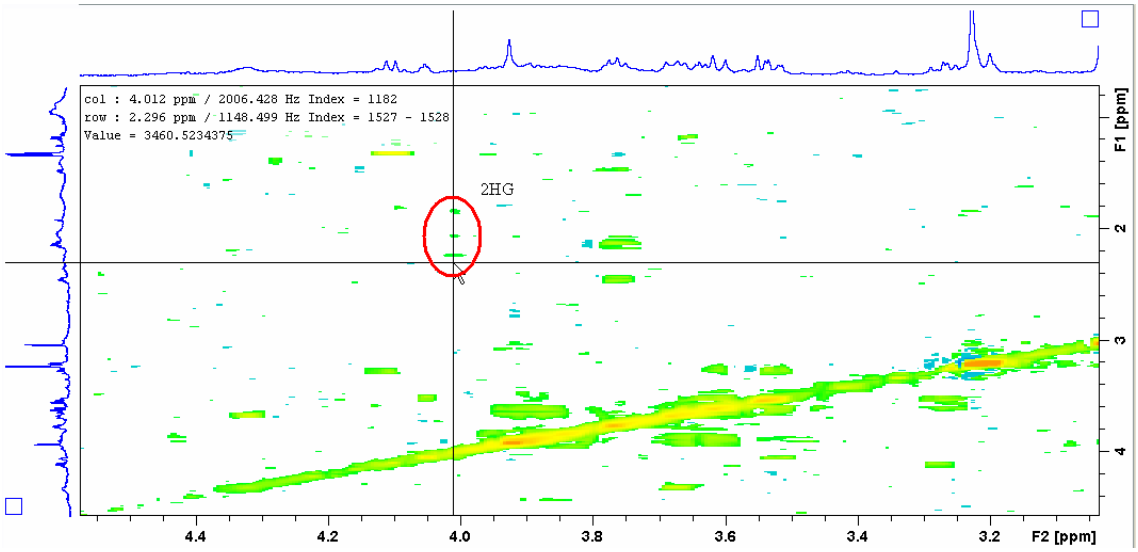


Figura VI.22: Espectro 2D H-H TOCSY de la muestra OA 21097 IDH1(+) en la que se observa la presencia de 2HG.

Al analizar la relación Gly-Mio claramente se observa un aumento marcado del pico de Gly respecto al Mio en muchas de las muestras con IDH1(-). En las muestras con IDH1(+) la relación de alturas es muy similar a la del grupo de O donde las alturas son similares (Fig. VI.23).

Muy interesante es que todos los espectros de las muestras IDH1(+) tienen mayor concentración de GPCho que PCho, a diferencia de las muestras IDH1(-) que tienen mayor concentración de PCho que GPCho, enfatizando el patrón que se insinuaba con los O (Fig. VI.24).

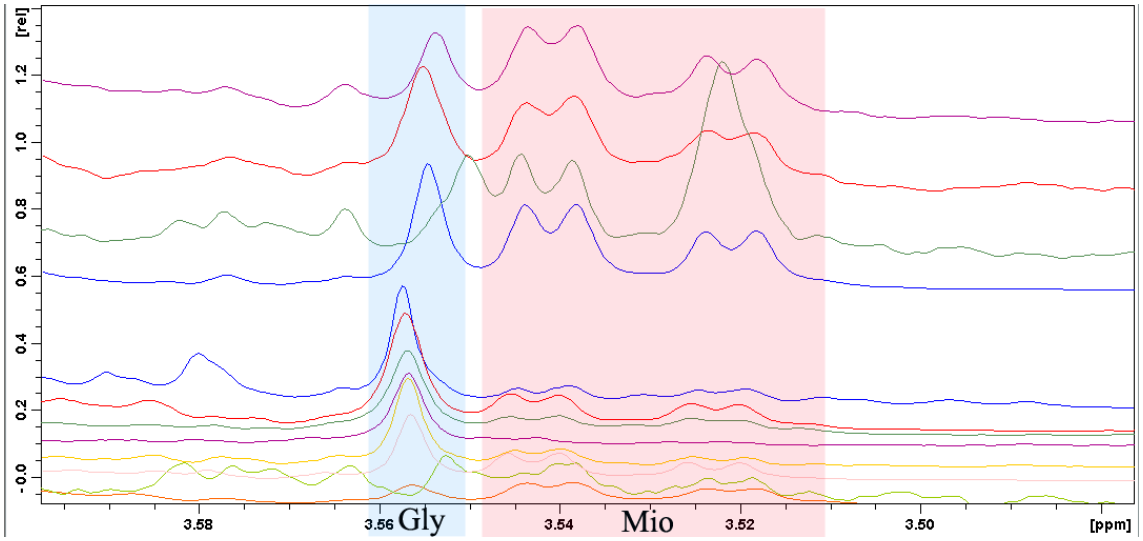


Figura VI.23: Ampliación de los espectros del grupo de tumores OA en la región donde aparecen los picos de Gly y Mio. Los 4 primeros espectros son IDH1(+) donde la relación de altura de los picos es muy similar como en los O. Los restantes son todos IDH1(-) donde el pico de Gly es en la mayoría de los casos marcadamente mayor que el de Mio.

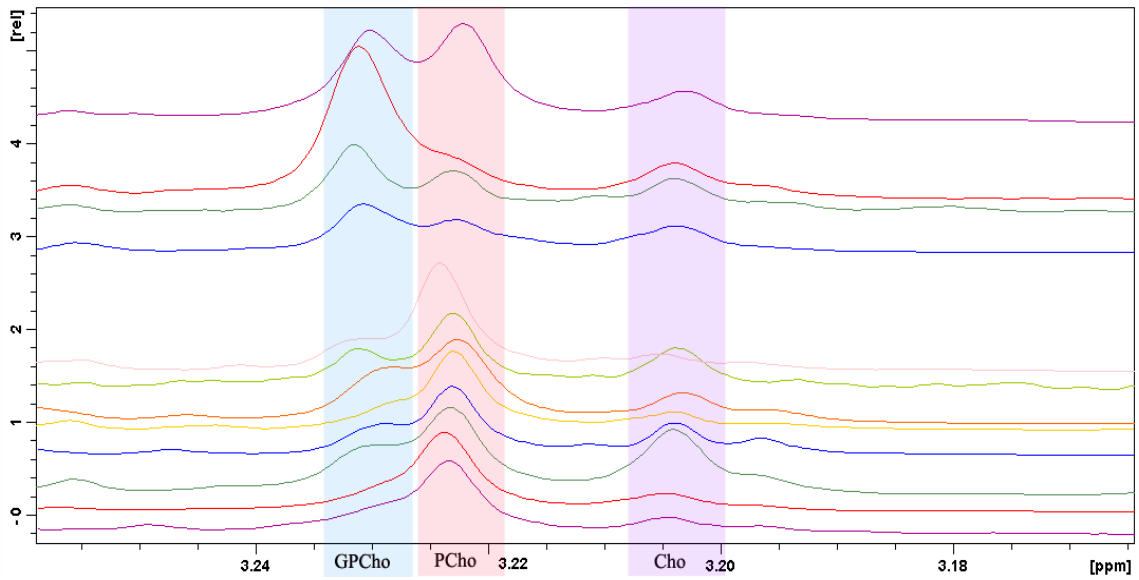


Figura VI.24: Ampliación de los espectros del grupo de tumores OA en la región donde aparecen los picos de las "colinas". Los 4 primeros espectros son IDH1(+) donde al igual que en los O, la GPCho es mayor que la PCho. Los restantes son todos IDH1(-) donde ahora el pico de PCho es siempre mayor que el de GPCho.

- Glioblastomas (GB)

En el caso de los GB, donde todas las muestras son IDH1(-), ninguno de los espectros muestra la presencia de 2HG (Fig. VI.25) y en todas la altura del pico de Gly es acentuadamente mayor que la de Mio (Fig. VI.26). Además, en todas la altura del pico de PCho es mayor que la de GPCho (Fig. VI.27). También se observa en todas las muestras la presencia del pico Desc_2, un pico que casi no esta presente en el grupo de los O.

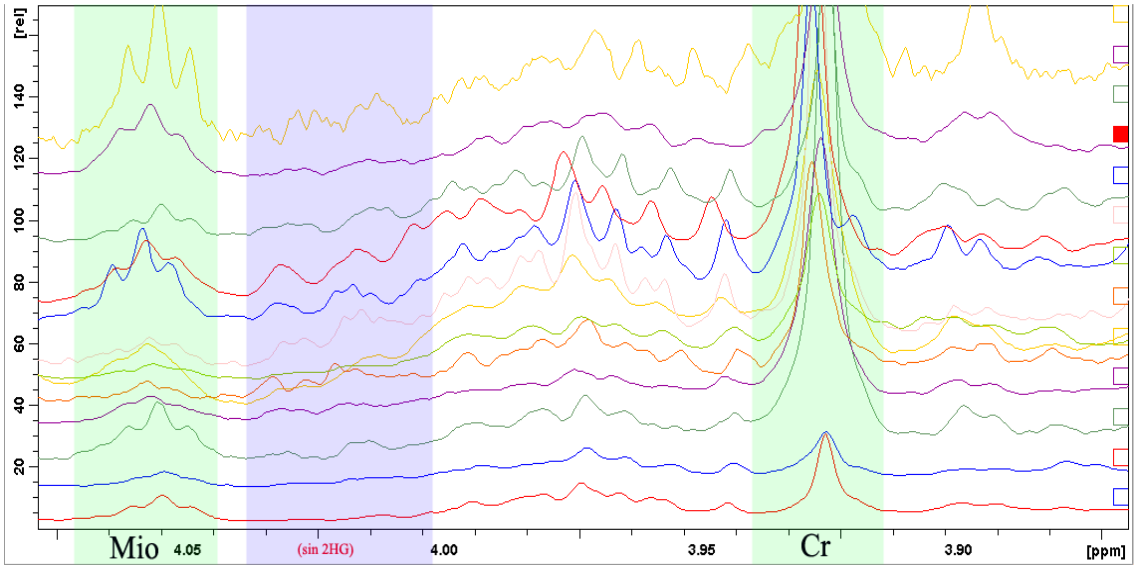


Figura VI.25: Ampliación de los espectros del grupo de tumores GB en la región de 4 ppm donde aparece un grupo de picos del 2HG. Todas las muestras son IDH1(-) y en ninguno de los espectros se observa el cuadruplete de 2HG.

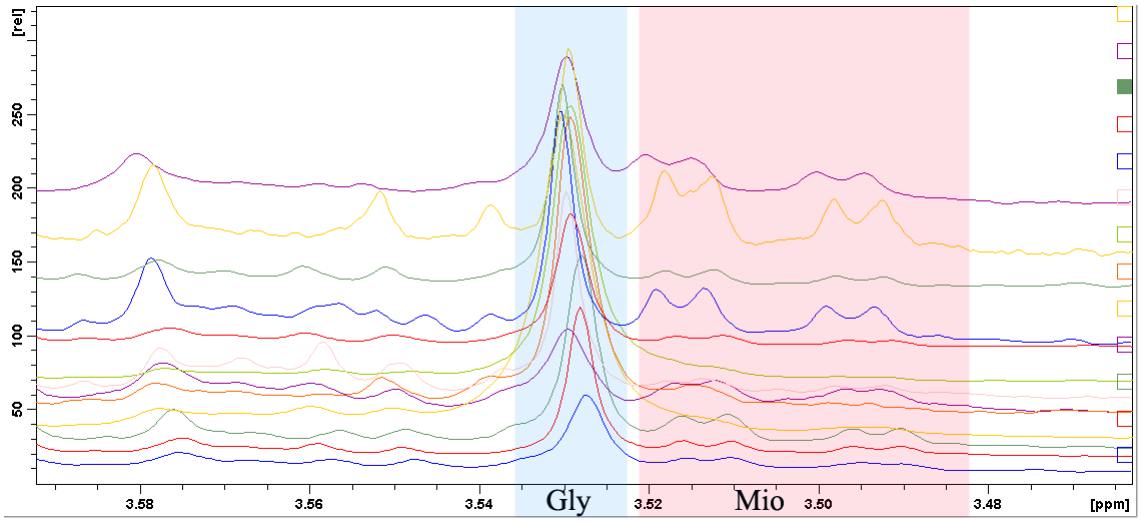


Figura VI.26: Ampliación de los espectros del grupo de tumores GB en la región donde aparecen los picos de Gly y Mio. Todas las muestras son IDH1(-) y en todas el pico de Gly es marcadamente superior al Mio.

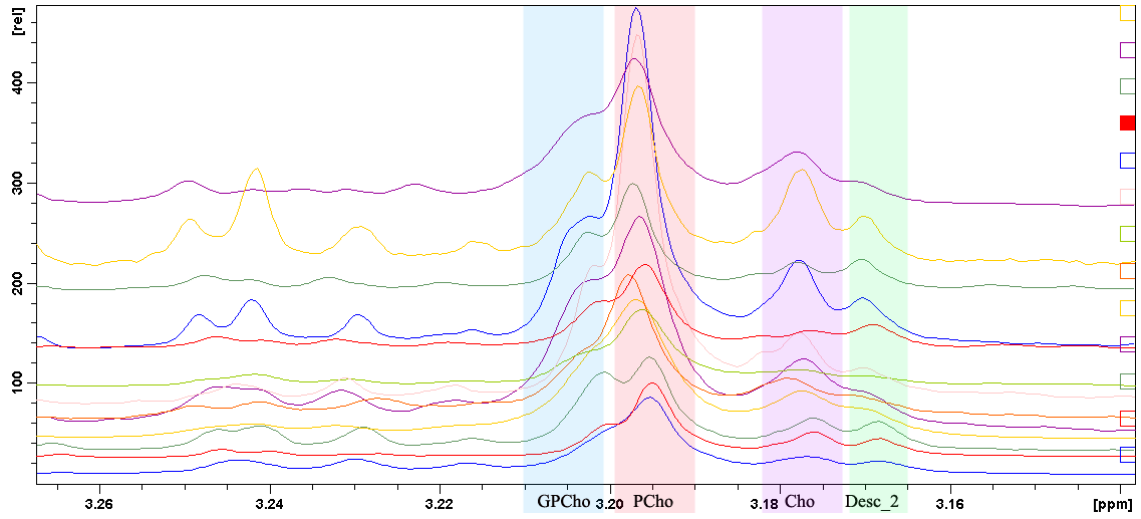


Figura VI.27: Ampliación de los espectros del grupo de tumores GB en la región donde aparecen los picos de las "colinas". Todas las muestras son IDH1(-) y en todas el pico de GPCho es siempre menor que el de PCho a diferencia de lo que se observa con los O que son en su mayoría IDH1(+). En todos los espectros es posible distinguir claramente el pico Desc_2, que aparece en varios espectros OA y en unos pocos O, en especial en aquellos con PCho elevada.

C.3 Análisis

Este último análisis enfocado en establecer un patrón de espectro de alto campo en tumores gliales con la mutación IDH1 permite afirmar que es posible, con esta técnica de procesar las muestras y adquirir los espectros, medir la presencia de 2-hidroxiglutarato (2HG) que se encuentra elevado en tejidos con la mutación. Si bien la correspondencia "presencia de 2HG-IDH1(+)" no sería exacta, como se observa en los O donde la mayoría de las muestras son IDH1(+), sería posible cuantificar esta sustancia.

Al analizar los espectros según la presencia de 2HG, se encuentra que aquellos tumores con 2HG tienen menor concentración de Gly y PCho, y mayor de Mio y GPCho. Al relacionar la

evolución clínica de los pacientes con IDH1(+) con los patrones de espectros que tienen 2HG se concluye nuevamente que altos valores de Gly y PCho son marcadores metabólicos de agresividad en tumores gliales, y por el contrario elevados valores de Mio y GPCho son indicadores de buena prognosis y sobrevida, que coincide con las conclusiones presentadas en este capítulo.

Queda por ver por último si es posible detectar y medir 2HG en espectros clínicos[49] por la baja concentración del mismo y por el solapamiento de sus resonancias con las demás sustancias. Aun los mejores programas de análisis de espectros clínicos no pueden superar esta limitación que esta dada por los valores de Cramer-Rao de los cálculos y que debe ser tenida en cuenta al analizar los datos.

Referencias

[1] C Sotiriou, S-Ying Neo, L M. McShane, E L. Korn, P M. Long, AJazaeri, P Martiat, S B. Fox, A L. Harris, E T. Liu **Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study** *Proc Natl Acad Sci U S A*. September 2; 100(18): 10393–10398 (2003)

[2] Zepeda-Castilla EJ, Recinos-Money E, Cuéllar-Hubbe M, Robles-Vidal CD, Maafs-Molina E. **Molecular classification of breast cancer** *Cirugia y Cirujanos* Jan-Feb;76(1):87-93. (2008) Review

[3] Borgan E, Sitter B, Lingjærde OC, Johnsen H, Lundgren S, Bathen TF, Sørlie T, Børresen-Dale AL, Gribbestad IS.. **Merging transcriptomics and metabolomics--advances in breast cancer profiling**. BMC Cancer. 2010 Nov 16;10:628

[4] Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN **Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas**. *J Natl Cancer Inst* 90:1473–1479 (1998)

[5] J. Mª. Pascual; F. Carceller; S. Cerdán, J. M. Roda. **Diagnóstico diferencial de tumores cerebrales "in vitro" por espectroscopía de resonancia magnética de protón. método de los cocientes espectrales** ***Neurocirugía***, Vol.9 N.1,. 4-10; Marzo, (1998)

[6] Chen JH, Wu YV, DeCarolis P, O'Connor R, Somberg CJ, Singer S.Resolution of creatine and phosphocreatine **1H signals in isolated human skeletal muscle using HR-MAS 1H NMR** *Magn Reson Med*. Jun;59(6):1221-4 (2008)

[7] Beathe Sitter, Tone F. Bathen, May-Britt Tessem, Ingrid S. Gribbestad **High-resolution magic angle spinning (HR MAS) MR spectroscopy in metabolic characterization of human cancer** *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Volume 54, Issues 3-4, 5, Pages 239-254 April 2009*

[8] L Vanhamme, R D. Fierro, Sabine Van Huffel, Ron de Bee, **Fast Removal of Residual Water in Proton Spectra** *J of Magnetic Resonance* 132, 197-203 June 1998

[9] D. Graveron-Demilly, A. Diop, A. Briguet, and B. Fenet, **Product-operator algebra for strongly coupled spin systems**, *Journal of Magnetic Resonance*, vol. A101,. 233–239, (1993)

[10] http://www.hmdb.ca

[11] Seeger U, Klose U, Mader I, Grodd W, Nägele T **Parameterized evaluation of macromolecules and lipids in proton MR spectroscopy of brain diseases**. *Magn Reson Med.* 2003 Jan;49(1):19-28.

[12] Hofmann L, Slotboom J, Boesch C, Kreis R. **Characterization of the macromolecule baseline in localized (1)H-MR spectra of human brain**. *Magn Reson Med. 2001* Nov;46(5):855-63

[13] www.metaboanalyst.ca

[14] KOHL S, KLEIN MS, HOCHREIN J, OEFNER PJ, SPANG R GRONWALD W**: State-of-the art data normalization methods improve NMR-based metabolomic analysis**. *Metabolomics*, **8**(1):146-160 (2012)

[15] http://astor.som.jhmi.edu/hex/Arrays/add/material/expressionist_series_4.pdf

[16] .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, Cabañas ME, Simonetti AW, Gajewicz W, **Calvar J**, Capdevila A, Wilkins PR, Bell BA, Rémy C, Heerschap A, Watson D, Griffiths JR, Arús C **Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra**. *NMR Biomed*. Jun;19(4):411-34 (2006)

[17] Crawford FW, Khayal IS, McGue C, Saraswathy S, Pirzkall A, Cha S, Lamborn KR, Chang SM, Berger MS, Nelson SJ. **Relationship of pre-surgery metabolic and physiological MR imaging parameters to survival for patients with untreated GBM** *J Neurooncol*. Feb;91(3):337-51. 2009.

[18] www.**etumour**.net/ *Dentro del proyecto eTumour muestras de tejido tumoral fueron enviadas de Fleni a la Universidad de Valencia para ser procesadas por HR-MAS y arrays geneticos.*

[19] A J Wright**,** G A Fellows**,** J R Griffiths**,** M Wilson**,** B A Bell**,** F A Howe ***Ex-vivo*** **HRMAS of adult brain tumours: metabolite quantification and assignment of tumour biomarkers** *Molecular Cancer***,** 9**:**66 **(** 2010)

[20] A.V. Faria, F.C. Macedo Jr. A.J. Marsaioli4, .M.C. Ferreira and F. Cendes **Classification of brain tumor extracts by high resolution 1H MRS using partial least squares discriminant analysis** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44: 149-164 (2011)

[21] Righi V, Roda JM, Paz J, Mucci A, Tugnoli V, Rodriguez-Tarduchy G, Barrios L, Schenetti L, Cerdán S, García-Martín ML.. **1H HR-MAS and genomic analysis of human tumor biopsies discriminate between high and low grade astrocytomas** *NMR Biomed* Jul;22(6):629-37 (2009)

[22]Valeria Righi, Ovidiu C. Andronesi, Dionyssios Mintzopoulos, Peter M. Black, A. Aria **High-resolution magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy detects glycine as a biomarker in brain tumors** *International Journal of Oncology* Feb 36(2) 301-306 (2010)

[23] Candiota A, Majos C, Julia-Sape M, *et al*: **M-Inositol and glycine content mesurment for grading astrocytic tumours with *in vivo* MRS**. *Magn Reson Mater Phy* 18: S193, (2005).

[24].Hattingen E, Lanfermann H, Quick J, Franz K, Zanella FE, Pilatus U **^{1}H MR spectroscopic imaging with short and long echo time to discriminate glycine in glial tumours**.. *MAGMA*. Feb;22(1):33-41. (2009)

[25] Mlynárik V, Cudalbu C, Clément V, Marino D, Radovanovic I, Gruetter R ..**In vivo metabolic profiling of glioma-initiating cells using proton magnetic resonance spectroscopy at 14.1 Tesla**. *NMR Biomed* Jul 27 (2011)

[26] Davies NP, Wilson M, Natarajan K, Sun Y, MacPherson L, Brundler MA, Arvanitis TN, Grundy RG, Peet AC **Non-invasive detection of glycine as a biomarker of malignancy in childhood brain tumours using in-vivo 1H MRS at 1.5 tesla confirmed by ex-vivo high-resolution magic-angle spinning NMR**. NMR Biomed. Jan;23(1):80-7 (2010)

[27] Chawla S, Oleaga L, Wang S, Krejza J, Wolf RL, Woo JH, O'Rourke DM, Judy KD, Grady MS, Melhem ER, Poptani H **Role of proton magnetic resonance spectroscopy in differentiating oligodendrogliomas from astrocytomas**. *J Neuroimaging.* Jan;20(1):3-8 (20.10)

[28] Howe FA, Barton SJ, Cudlip SA, Stubbs M, Saunders DE, Murphy M, Wilkins P, Opstad KS, Doyle VL, McLean MA, Bell BA, Griffiths JR **Metabolic profiles of human brain tumors using quantitative in vivo 1H magnetic resonance spectroscopy**. **Magn Reson Med**. Feb;49(2):223-32 (2003)

[29] Castillo M, Smith JK, Kwock L. **Correlation of myo-inositol levels and grading of cerebral astrocytomas**.AJNR *Am J Neuroradiol*. Oct;21(9):1645-9 (2000)

[30] Hattingen E, Raab P, Franz K, Zanella FE, Lanfermann H, Pilatus U. **Myo-inositol: a marker of reactive astrogliosis in glial tumors?** *NMR Biomed*. Mar;21(3):233-41 (2008)

[31] Calvar JA, Meli FJ, Romero C, Calcagno ML, Yánez P, Martinez AR, Lambre H, Taratuto AL, Sevlever G. **Characterization of brain tumors by MRS, DWI and Ki-67 labeling index.***J Neurooncol*. May;72(3):273-80 (2005)

[32] Opstad KS, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA**. Taurine: a potential marker of apoptosis in gliomas** *British Journal of Cancer* Feb **100**, 789–794. (2009)

[33] Monleón D, Morales JM, Gonzalez-Darder J, Talamantes F, Cortés O, Gil-Benso R, López-Ginés C, Cerdá-Nicolás M, Celda B..**Benign and atypical meningioma metabolic signatures by high-resolution magic-angle spinning molecular profiling**. *J Proteome Res*. Jul;7(7):2882-8 (2008).

[34] G. Erb, K. Elbayed, M. Piotto, J. Raya, A. Neuville, M. Mohr, D. Maitrot, P. ehrli,I .J. Namer **Toward improved grading of malignancy in oligodendrogliomas using metabolomics** *Magnetic Resonance in Gilles Medicine* May 59,(5), 959–965, (2008)

[35] O. Robert & J. Sabatier & D. Desoubzdanne & J. Lalande & S. Balayssac & V. Gilard & R. Martino & M. Malet-**Martino pH optimization for a reliable quantification of brain tumor cell and tissue extracts with ^{1}H NMR: focus on choline-containing compounds and taurine** Anal Bioanal Chem (2011) 399:987–999

[36] McKnight TR, Smith KJ, Chu PW, Chiu KS, Cloyd CP, Chang SM, Phillips JJ, Berger MS **Choline metabolism, proliferation, and angiogenesis in nonenhancing grades 2 and 3 astrocytoma.** *J Magn Reson Imaging.* Apr;33(4):808-16 (2011)

[37] Jannie Petra Wijnen **Multi-nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of human brain tumours** PhD thesis Department of Radiology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, the Netherlands July 2010

[38] Albers MJ, Krieger MD, Gonzalez-Gomez I, FH, McComb JG, Nelson MD Jr, Blüml S . **Proton-decoupled 31P MRS in untreated pediatric brain tumors** 2005 Magn Reson Med Jan;53(1):22-9.

[39] Chen W., Lou H, Zhang H, Nie, Lan W, Yang Y, Xiang Y, QI JianPin3, Lei Hao1, Tang H, Chen H, Deng F **Grade classification of neuroepithelial tumors using highresolution magic-angle spinning proton nuclear**

magnetic resonance spectroscopy and pattern recognition SCIENCE CHINA July Vol.54 No.7: 606–616 2011

[40] Hekmatyar SK, Wilson M, Jerome N, Salek RM, Griffin JL, Peet A, Kauppinen RA **^{1}H nuclear magnetic resonance spectroscopy characterisation of metabolic phenotypes in the medulloblastoma of the SMO transgenic mice.**. *Br J Cancer*. Oct 12;103(8):1297-304 (2010)

[41] **High-field MRS – Teaching Session II** *ESMRMB – 21st Annual Meeting Copenhagen, Sep 9 - 12, 2004* **www.kyb.mpg.de/fileadmin/user_upload/files/publications/pdfs/pdf2862.pdf**

[42] Shibahara I, Sonoda Y, Kanamori M, Saito R, Yamashita Y, Kumabe T, Watanabe M, Suzuki H, Kato S, Ishioka C, Tominaga T. **IDH1/2 gene status defines the prognosis and molecular profiles in patients with grade III gliomas.** *Int J Clin Oncol. 2011 Oct 6.*

[43] Lai A**,** Kharbanda S**,** Pope WB**,** Tran A**,** Solis OE**,** Peale F**,** Forrest WF**,** Pujara K**,** Carrillo JA**,** Pandita A**,** Ellingson BM**,** Bowers CW**,** Soriano RH**,** Schmidt NO**,** Mohan S**,** Yong WH**,** Seshagiri S**,** Modrusan Z**,** Jiang Z**,** Aldape KD**,** Mischel PS**,** Liau LM**,** Escovedo CJ**,** Chen W**,** Nghiemphu PL**,** James CD**,** Prados MD**,** Westphal M**,** Lamszus K**,** Cloughesy T**,** Phillips HS **Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin.** *J Clin Oncol.2011 Dec 1;29(34):4482-90.*

[44] Hartmann C, Hentschel B, Tatagiba M, Schramm J, Schnell O, Seidel C, Stein R, Reifenberger G, Pietsch T, von Deimling A, Loeffler M, Weller M; German Glioma Network. **Molecular markers in low-grade gliomas: predictive or prognostic?** *Clin Cancer Res. 2011 Jul 1;17(13):4588-99.*

[45]. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liau LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM**. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate**. *Nature. 2009 Dec 10;462(7274):739-44.*

[46] Jin G, Reitman ZJ, Spasojevic I, Batinic-Haberle I, Yang J, et al. **2-Hydroxyglutarate Production, but Not Dominant Negative Function, Is Conferred by Glioma-Derived NADP^{+}-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Mutations**. *PLoS ONE: 2011* Feb 4;6(2):e16812.

[47] A. Elkhaled, L. Jalbert, H. Yoshihara, G. Bourne, J. Phillips, S. Cha1, S. M. Chang, R. Srinivasan1, and S. J. Nelson **Presence of 2-Hydroxyglutarate in IDH1 mutated low-grade glioma using ex vivo proton HR-MAS spectroscopy** *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. 19 (2011)*

[48] A. Elkhaled, L. Jalbert, H. Yoshihara, G. Bourne, J. Phillips, S. Cha1, S. M. Chang, R. Srinivasan1, and S. J. Nelson **Metabolic characterization of glioma populations with emphasis on onco-metabolite 2-hydroxyglutarate** *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med*. 19 (2011)

[49] Pope WB, Prins RM, Albert Thomas M, Nagarajan R, Yen KE, Bittinger MA, Salamon N, Chou AP, Yong WH, Soto H, Wilson N, Driggers E, Jang HG, Su SM, Schenkein DP, Lai A, Cloughesy TF, Kornblum HI, Wu H, Fantin VR, Liau LM. **Non-invasive detection of 2-hydroxyglutarate and other metabolites in IDH1 mutant glioma patients using magnetic resonance spectroscopy**. J Neurooncol. 2011 Oct 21.

Capítulo VII

Estudio de la evolución tumores gliales por espectroscopia de ^{1}H clínica

VII.1 Introducción

Los tumores gliales representan aproximadamente el 35-40% de los tumores cerebrales. La caracterización de los mismos es un tema en continuo estudio y revisión. Para la misma se están utilizando tanto las técnicas usuales de anatomía patológica como técnicas moleculares, genéticas y de imágenes[1-2] ya que la clasificación por anatomía patológica puede no ser especifica, en especial en la transición de tumores grado II (oligodendrogliomas, O) a III (astrocitomas anaplásicos, OA) o de grado III a IV (Glioblastomas, GB). En esos casos es posible que distintos patólogos diagnostiquen de distinto modo una misma pieza histológica de un mismo tumor[3]. Esta clasificación es importante porque existe una clara correlación entre grado de agresividad y sobrevida de los pacientes y porque el tratamiento de los distintos tumores cerebrales es diferente según su agresividad[4-5].

El desarrollo de las neuroimágenes ha sido uno de los elementos que más ha impactado sobre las neurociencias en general y sobre la neuropatología en particular, dado que establece la observación del mismo fenómeno desde otra tecnología. Así entonces, en los últimos años las neuroimágenes se han convertido en una herramienta altamente sinérgica con el análisis microscópico de los tumores cerebrales.

Existe una clara tendencia en la neurooncología a incorporar y relacionar los aspectos diagnósticos y pronósticos de la neuropatología y las neuroimágenes. Estas últimas complementan a la neuropatología ayudando a definir los aspectos, siempre críticos, del muestreo (sampling) y del pronóstico, con sus criterios propios de agresividad (captación de contraste, efecto de masa, etc.). La observación-captación de contraste es un criterio decisivo en la gradación de los oligodendrogliomas en la clasificación de Dumas Duport[6].

Si bien se conoce, desde un punto de vista estadístico y general, la relación existente entre la sobrevida y la progresión de los tumores gliales según su clasificación patológica y actualmente también por su perfil genético,[7-8] el estudio de la evolución (y la respuesta el tratamiento) de los tumores cerebrales es un tema en desarrollo. Esto se debe a las claras implicancias clínicas que tiene el poder definir acciones a seguir en función de su evolución. El ideal es establecer, en un paciente, como está evolucionando el tumor y si el tratamiento es efectivo. Esto es particularmente importante en los tumores grado II y II-III, que son los que

potencialmente pueden malignizar a un grado IV con una disminución de la sobrevida del paciente. Actualmente la MRI y las imágenes nucleares (SPECT/PET) son los dos principales procedimientos de imágenes médicas que permiten evaluar la progresión (o no) de los tumores cerebrales[9-10].

En particular, la MRI tiene como característica diferencial la excelente calidad de las imágenes (resolución anatómica y contraste de los tejidos) que permite definir muy bien tamaño, textura, límites y compromiso de las lesiones cerebrales y de las estructuras adyacentes, además de poder estimar parámetros de difusión y perfusión de los tejidos y realizar espectros "in-vivo", que permiten inferir información adicional de los tejidos como densidad celular, angiogénesis y metabolismo [11-12-13-14].

Es por esto último que, del mismo modo que existen patrones de espectros para los distintos tumores gliales[15-16], en este trabajo se considera la hipótesis que los espectros "in-vivo" de tumores en tratamiento post-cirugía también presentan un patrón que permite establecer si el tumor está estable o cambiando (mejorando o empeorando). Así, estableciendo una relación sencilla con los 4 grados de agresividad en la que se clasifican los tumores gliales, aquí se definieron también 4 grupos cualitativos de patrones de espectros en asociación con los perfiles tumorales pre-cirugía caracterizados por los trabajos de ERM en tumores cerebrales[17-18].

La idea principal de este trabajo es analizar la utilidad de la espectroscopia clínica en el análisis de la evolución de tumores gliales y establecer sus limitaciones. Para ello se analizan, por imágenes y espectros monovoxel, varios tumores con distintos perfiles anátomo-moleculares en estudios sucesivos (estudio longitudinal). Secundariamente se discuten las mejoras factibles en la adquisición de las imágenes y espectros para hacer este análisis más riguroso y confiable.

VII.2 Métodos y mediciones

VII.2.1 Imágenes y espectros

Durante el período 2005-2011 se realizaron estudios sucesivos de imágenes a períodos de 2-8 meses sobre 20 pacientes con tumores cerebrales gliales. Los estudios constaron de una serie de secuencias 2D, Sagital T_1; Axial Flair, T_2 y T_1; difusión (DWI), perfusión T_2 y una secuencia contrastada 3D T_1 post-gadolinio. Se realizó también, sobre la región más representativa del tumor (mayor densidad o zona con refuerzo) espectros de tiempos de eco corto (30-35 ms), ajustando en lo posible el tamaño del voxel a la lesión, sin bajar el tamaño

del voxel de 15x15x15 mm. El número de adquisiciones dependió del tamaño del voxel, estando entre 128 y 256 (3,40-7 minutos de adquisición). A veces se realizó sobre la misma ubicación un espectro de 136 ms. En los sucesivos estudios a un mismo paciente, se intento adquirir los espectros de la misma región si la imagen del nuevo estudio no presentaba una región más patológica.

Los estudios se realizaron en resonadores GE (General Electric) de 1.5T y 3T del servicio de imágenes de FLENI, un CVI de 1.5T, un HDx de 1.5T y un HDx de 3T ya que es posible la comparación de espectros de campos de 1.5 T y 3 T[19].

Las imágenes de estos estudios se almacenaron en dos bases de datos (período 2005-2007 y período 2007-2011) en formato DICOM original de donde fueron exportadas para el análisis.

VII.2.2 Análisis de las imágenes

El tamaño de la lesión que comprometía el tumor se midió de las imágenes anatómicas con el programa MIPAV[20]. Este programa cuenta con una herramienta para definir VOI (Volume Of Interest) en las imágenes, integrarlos y calcular distintos parámetros de interés de ese VOI. Para definir los límites del tumor se uso la opción “Levelest”, que de una manera automática permite definir los bordes del VOI por la diferencia en la intensidad de señal de los pixels.

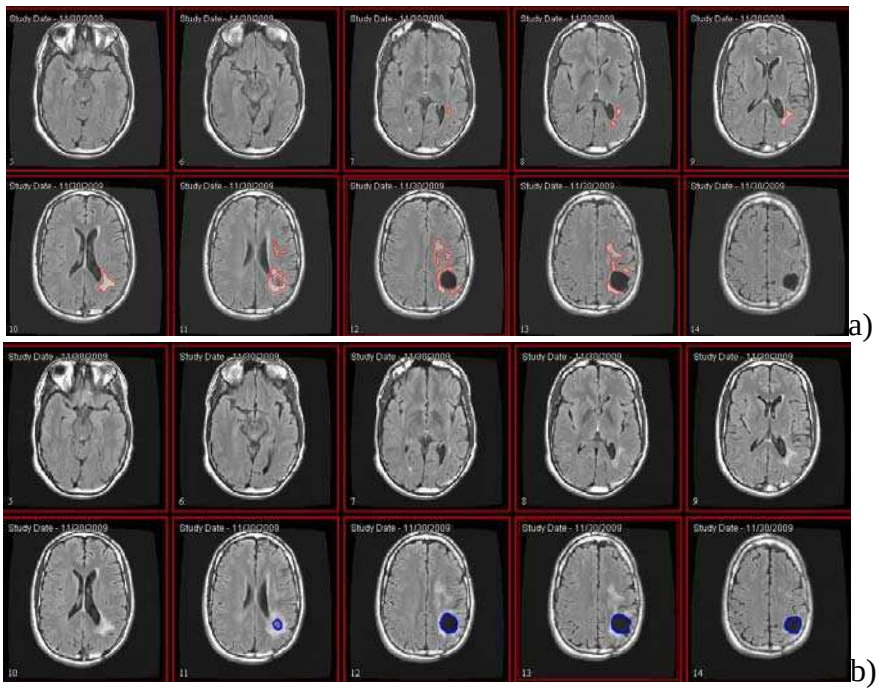


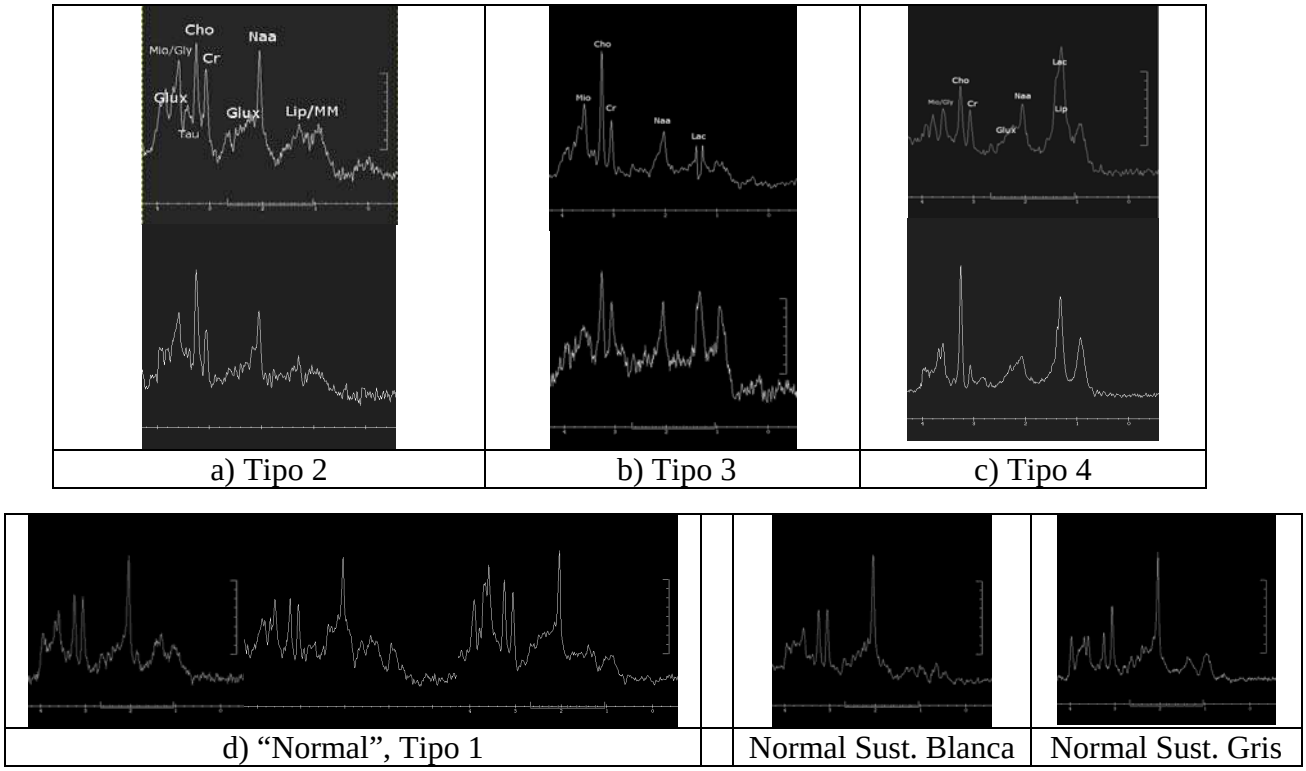
Figura VII.1: Segmentación de la lesión correspondiente al tumor a) y a la cavidad post-cirugía b) por medio de la aplicación “levelset·” del MIPAV en imágenes FLAIR de un tumor glial post-cirugía.

De este modo se midieron en las imágenes FLAIR el volumen (área del VOI x el espesor de

corte anatómico de la imagen) y el perímetro del la lesión tumoral y de la cavidad generada por la cirugía (Fig. VII.1). Los valores de áreas y perímetros se exportaron a una base.

VII.2.3 Análisis de los espectros

Los espectros se analizaron "como un todo", lo que en el Capítulo V se llamó "método clínico," de un modo cualitativo. Este método define un patrón de espectro con un estado metabólico-fisiológico asociado a un grado de agresividad. A partir de patrones de espectros que emulan los patrones de espectros de los 4 grados de agresividad de los tumores gliales pre-cirugía[17] aquí se fijaron 4 patrones de espectros ("normal" o tipo 1, tipo 2, tipo 3, tipo 4) para los espectros post-cirugía (Fig. VII.2).



a) Tipo 2	b) Tipo 3	c) Tipo 4

d) "Normal", Tipo 1	Normal Sust. Blanca	Normal Sust. Gris

Figura VII.2: Espectros "patrón" de distintos tumores gliales, en función de la forma cualitativa del espectro, siguiendo el patrón típico de clasificación de tumores gliales (ref 17-18). Aumento de Cho, Lip/MM, Lac y disminución de NAA, Cr, Mio indican aumento de la agresividad. Por "Normal" se entiende que si bien el espectro es de una lesión tumoral, el espectro no tiene un patrón claro de tumor.

Así, a partir de la representación de un espectro de tejido normal promedio de cerebro[21] y comparando con el espectro del estudio anterior (a veces pre-cirugía, la mayoría post-cirugía) se estimó si hubo cambios o no en el metabolismo del tumor. En este marco, un aumento de los picos de Cho, Lac y Lip y/o disminución en los picos de NAA, Cr, Mio indica aumento de la agresividad del tumor. Por el contrario, una disminución de los picos de Cho, Lac y Lip y/o aumento en los picos de NAA, Cr, Mio es un indicio de disminución de la agresividad del tumor y de buena respuesta al tratamiento.

VII.2.4 Clasificación del los tumores

En este trabajo se utilizó la clasificación de los tumores según el criterio del Dpto. de Anatomía Patológica y del Dpto. de Biología Molecular de FLENI, en el cual los tumores gliales se identifican como Oligodendrogliomas (O, grado II), Oligoastrocitomas (OA, grado III) y Glioblastomas (GB, grado IV).

También se les realizó a los tumores un análisis genético para caracterizarlos en 1p-19q, 10q, CDKN2A, EGFR, p53 MGMT, IDH1 y relacionarlos con la evolución y respuesta el tratamiento (Capítulo III).

Se les realizó también a los pacientes el test de **Karnofsky** (KPS). El KPS es un modo común de estimar la capacidad de pacientes con cáncer de realizar tareas cotidianas. La escala va del 0 al 100. Un puntaje alto significa que el paciente puede realizar la mayoría de las actividades cotidianas. La KPS se usa para pronosticar el estado del paciente y reconocer los cambios que tiene el paciente en su capacidad para realizar actividades la vida diaria.

Además se midió la fracción de células tumorales positivas en estadio Ki-67- (el índice Ki-67) que es un excelente marcador para determinar la fracción de crecimiento de una población de células, que a menudo se correlaciona con la evolución clínica del cáncer. En los tumores gliales el valor pronóstico de supervivencia y la recurrencia del tumor y el Ki-67 han sido repetidamente demostrados en análisis uni y multivariado[22].

VII.3 Resultados

Las siguientes tablas y gráficos muestran los valores medidos del volumen y perímetro de los distintos tumores, considerado como lesión tumoral la región donde el contraste de la señal en la secuencia FLAIR se diferencia del contraste del tejido normal, independiente de si esa región refuerza o no en la imagen 3D T_1 por el gadolinio (Gd) inyectado. De existir alguna zona del tumor con refuerzo por el Gd, solo se especificó, sin detallar el tamaño de esa región. Se especifica también en las tablas cual es el patrón del espectro adquirido de la región mas representativa del tumor según lo especificado en la sección de VII.2.3.

En cada caso también se presenta el perfil molecular-genético del tumor, para ver si se relaciona el perfil genético con la evolución de tumor. A partir de lo presentado en el Capítulo III, aquellas alteraciones genéticas “beneficiosas” en la evolución del tumor y el tratamiento como IDH1, MGMT metilado y deleción 1p-19q se destacan con color **verde** y las “perjudiciales” como deleción 10q, deleción CDKN2A, amplificación de EGFR y deleción p53 con el color **rojo**.

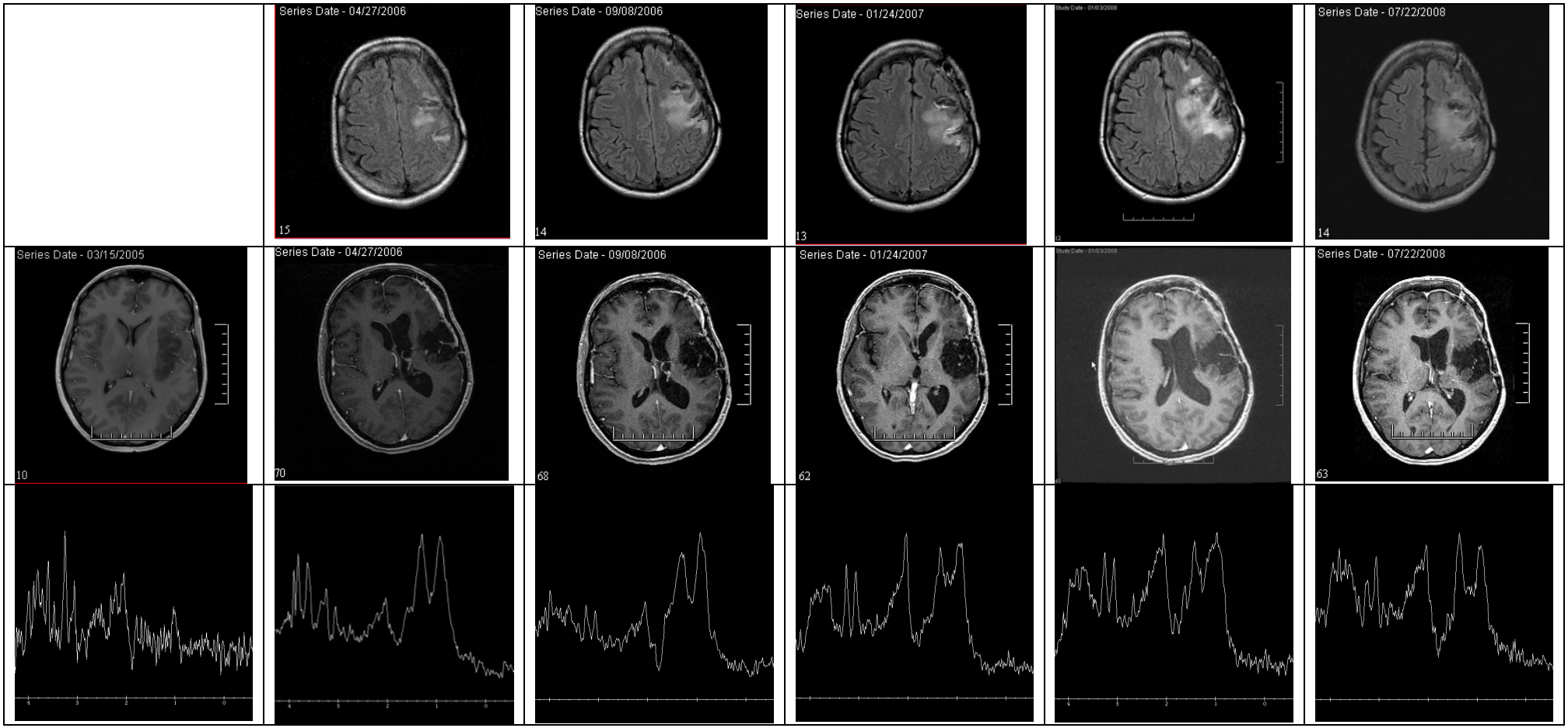
Se presentan dos gráficos, el primero con los valores, en los sucesivos estudios, del volumen y el perímetro del tumor y la cavidad (que se origina por la cirugía al remover parte del tumor) normalizados respecto a la primera medición. El segundo muestra el porcentaje de cambio entre estudios sucesivos, tanto en el tamaño y perímetro del tumor como de la cavidad.

Se presenta también una tabla con la **Escala Karnofsky**, (**KPS)** pre y post-cirugía a meses y años después de la cirugía, asimismo como se detalla el valor Ki 67.

En los primeros 9 pacientes, se muestran las imágenes de MRI más representativas de la lesión, de solo dos secuencias, FLAIR (para estimar el tamaño del tumor-edema) y T_1 con Gd (para evaluar rompimiento de la barrera hematocefálica) y los espectros. Esos casos son representativos del resto de los tumores analizados, donde solo se muestran las tablas y los gráficos de la evolución de estas variables.

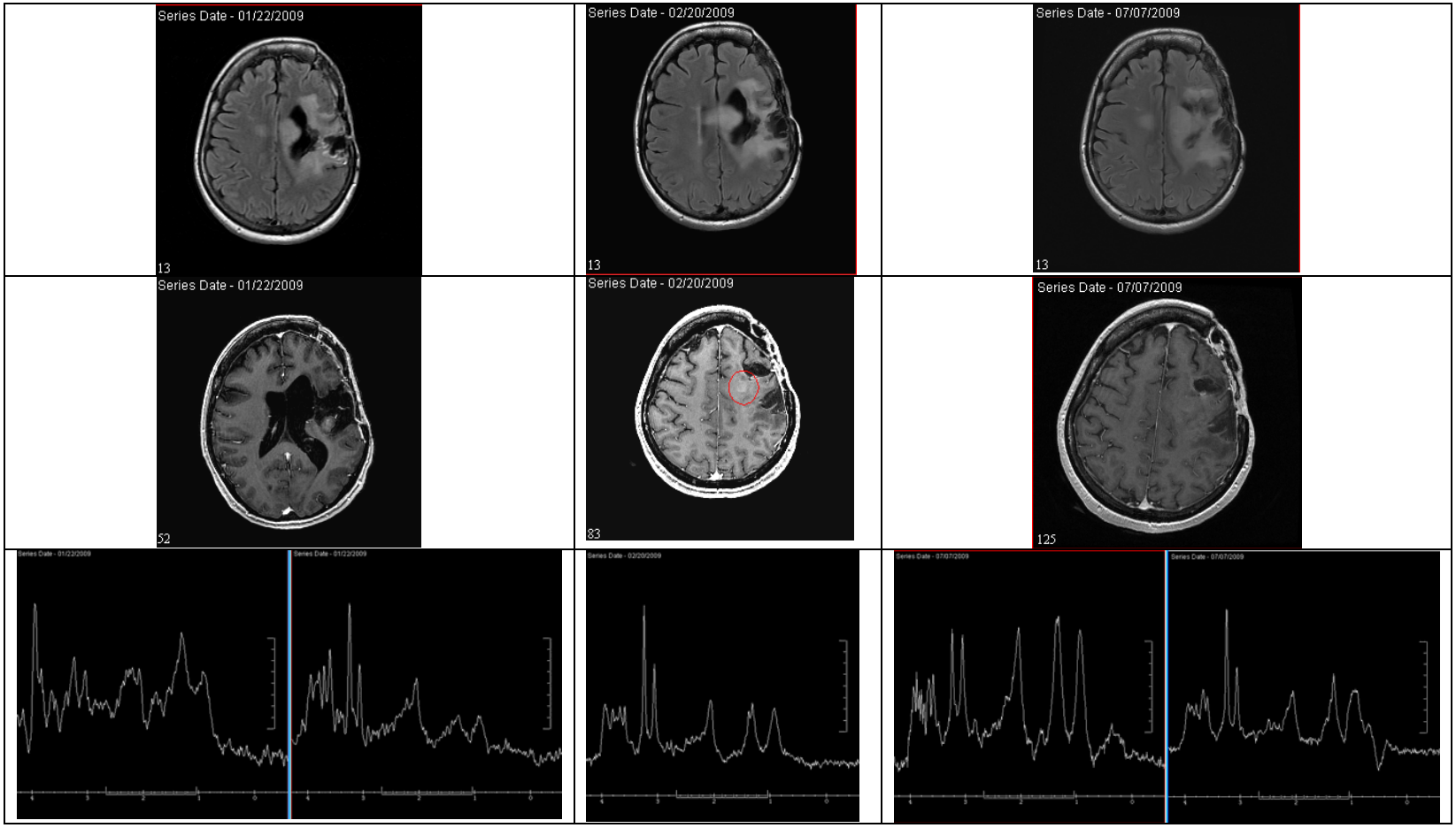
En los primeros 9 casos, las filas pintadas de gris en las tablas indican que las imágenes y espectros no se presentan por un tema de espacio. Los gráficos de volúmenes y perímetros están normalizados respecto del primer estudio; **s/e** indica que en ese estudio no se realizó espectro.

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
1	**42**	**15/03/2005**	**Front-temp. izq.**	**Oligodendroglioma**	**II**	**del**	**parcial**	**no del**	**normal**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**



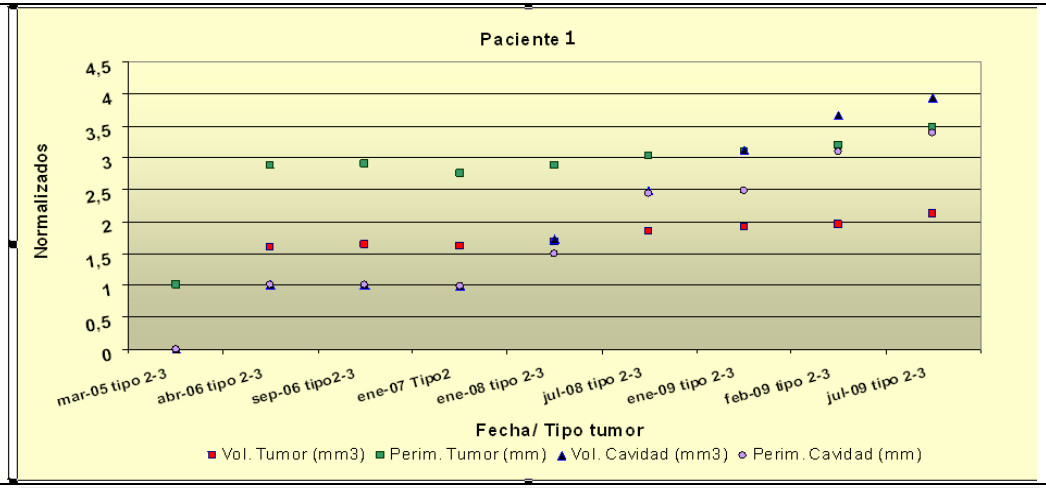
Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
mar-05	tipo 2-3	Neuronavegador	34217,430		854,858		no					Ruidoso
abr-06	tipo 2-3		54752,210	60,01%	2469,654	188,90%	no	8851,592		454,481		Lip/MM-Gly (¿)
sep-06	tipo2-3	Difícil de ver bordes post cirugía	56117,281	2,49%	2483,118	0,55%	no	8845,668	-0,07%	457,661	0,70%	MM
ene-07	tipo2		55751,165	-0,65%	2348,500	-5,42%	no	8745,219	-1,14%	448,287	-2,05%	MM- Cho normal
ene-08	tipo2-3	Mejor definición imágenes	57691,236	3,48%	2458,336	4,68%	no	15236,158	74,22%	681,357	51,99%	↓ Maa MM
jul-08	tipo 2-3	Crece desde el cuerpo calloso	63256,2469	20,81%	2596,2333	13,56%	no	21986,611	44,31%	1111,236	63,09%	MM-s/Mio

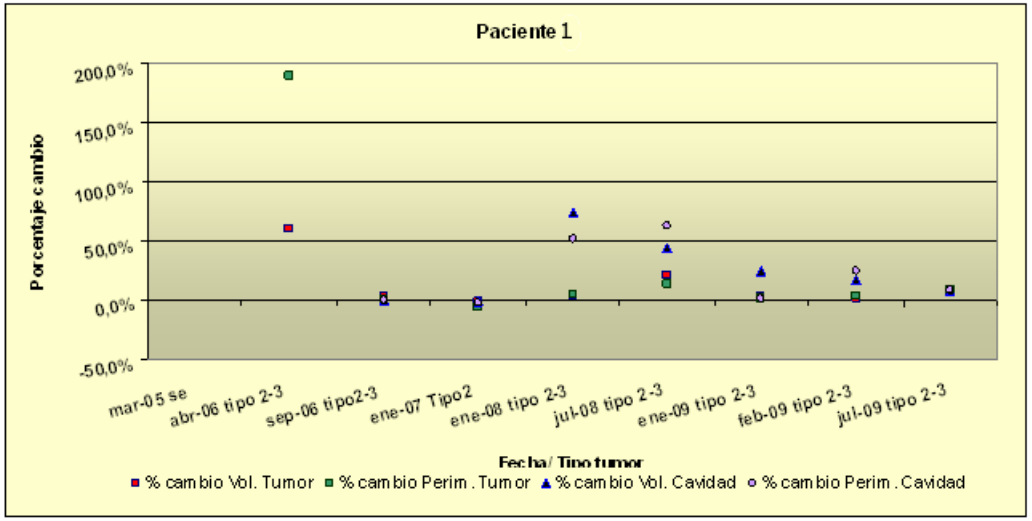
Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
1	**42**	**15/03/2005**	**Front-temp. izq.**	**Oligodendroglioma**	**II**	**del**	**parcial**	**no del**	**normal**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**



Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
ene-09	tipo 2-3	empieza a tener refuerzo	65682,505	3,84%	2635,739	1,52%	si	27548,230	25,30%	1127,668	1,48%	Lip-Cho
feb-09	tipo 2-3		67010,290	2,02%	2729,1453	3,54%	si	32461,820	17,84%	1407,298	24,80%	Cho-MM
jul-09	tipo 2-3		72453,157	8,12%	2973,85	8,97%	si	34789,558	7,17%	1537,128	9,23%	Cho-MM

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
1	**42**	**15/03/2005**	**Front-temp. izq.**	**Oligodendroglioma**	**II**	**del**	**parcial**	**no del**	**normal**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**



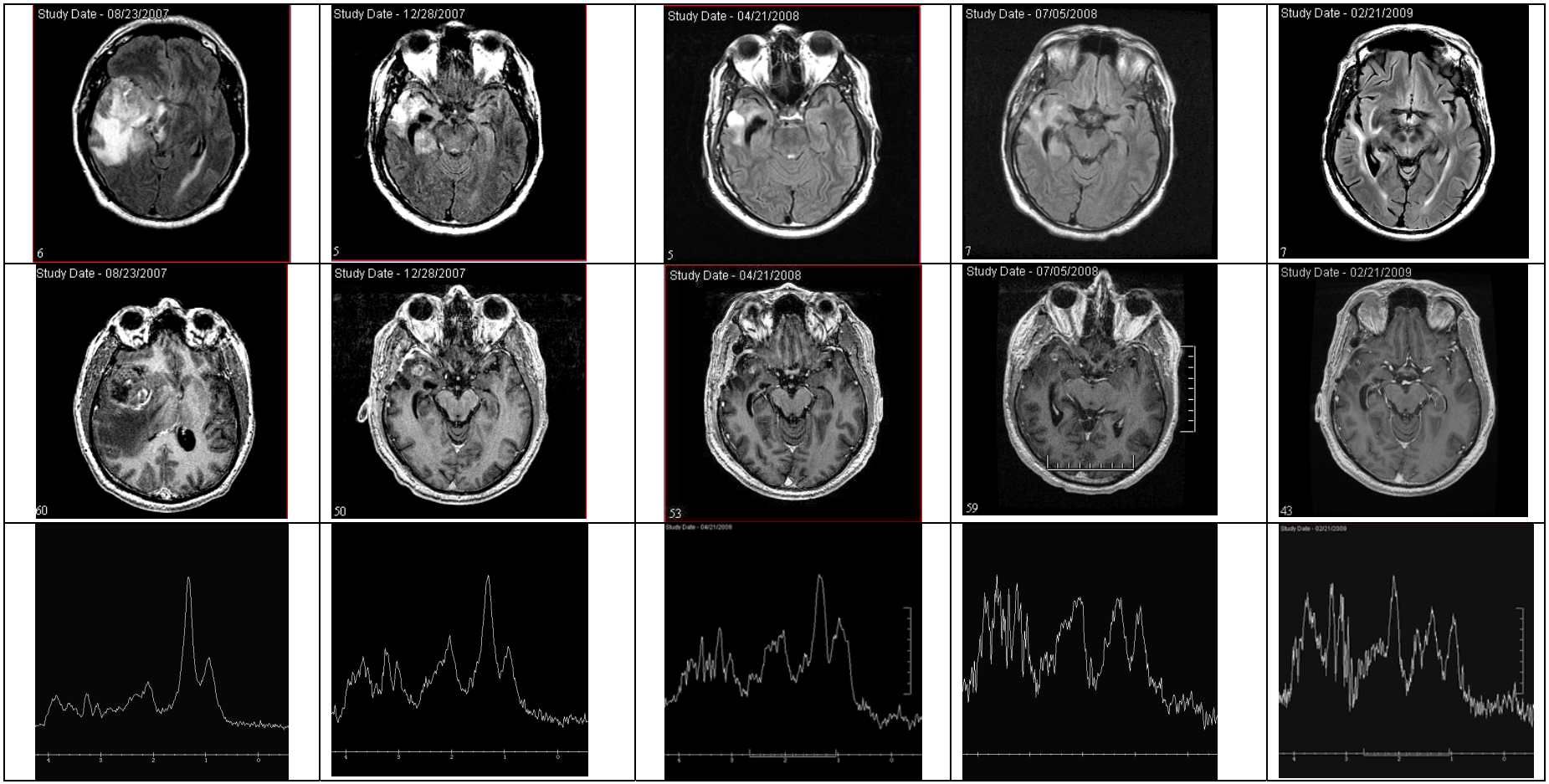


5

Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	Tumor Perímetro mm	Cavidad Volumen mm^3	Cavidad Perímetro mm
34217,430	854,858	8851,592	454,481

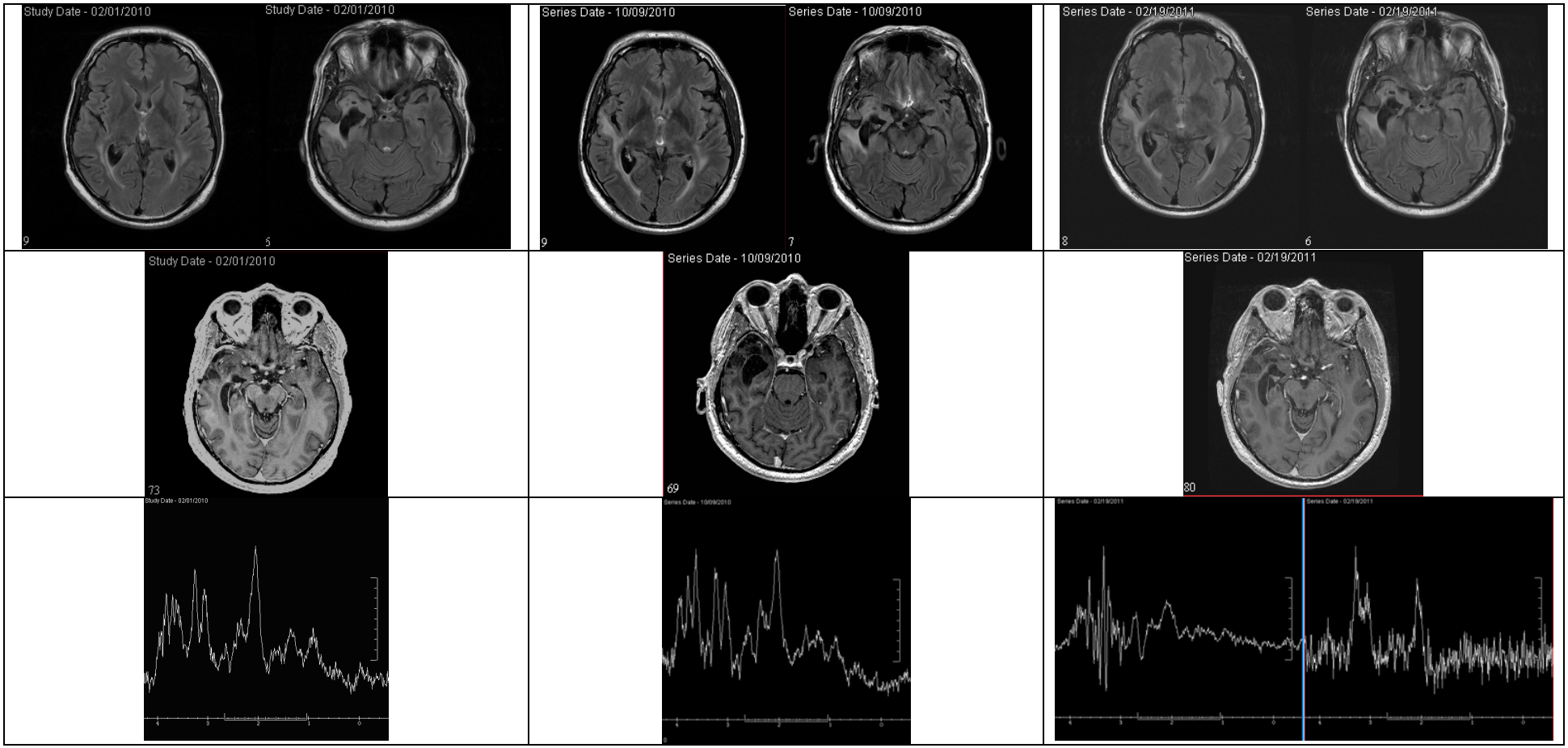
Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
2%	80%	50%	50%	50%	60%	60%	
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
2	**47**	**23/08/2007**	**Temporal derecho**	**Mixto**	**III**	**no del**	**no del**	**DMBT1 del**	**normal**	**25 x amp**	**normal**	**Metilado**	**wt**



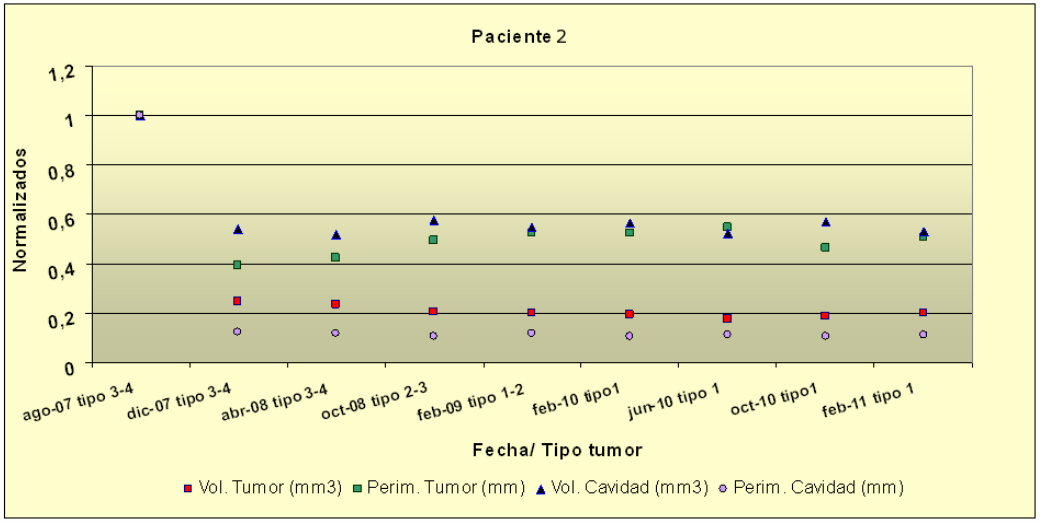
Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
ago-07	tipo 3-4	mucho edema, lípidos	92606,399		2323,738		si	13337,582		2638,247		Lip-Cho
dic-07	tipo 3-4	se redujo el edema,	22648,626	-75,5%	909,031	-60,88%	si	7198,341	-46,03%	331,976	-87,42%	Lip
abr-08	tipo 3-4		21650,4511	-4,41%	979,773	7,78%		6881,094	-4,41%	306,141	-7,78%	Lip-Cho-Gly?
oct-08	tipo 2-3		19280,3271	-5,36%	1155,006	9,17%	no	7677,932	5,36%	281,697	-7,98%	MM-ruidoso
feb-09	tipo 1-2		18391,902	-4,61%	1213,24	5,04%	no	7288,974	-5,07%	307,524	9,17%	Naa- Cho normal

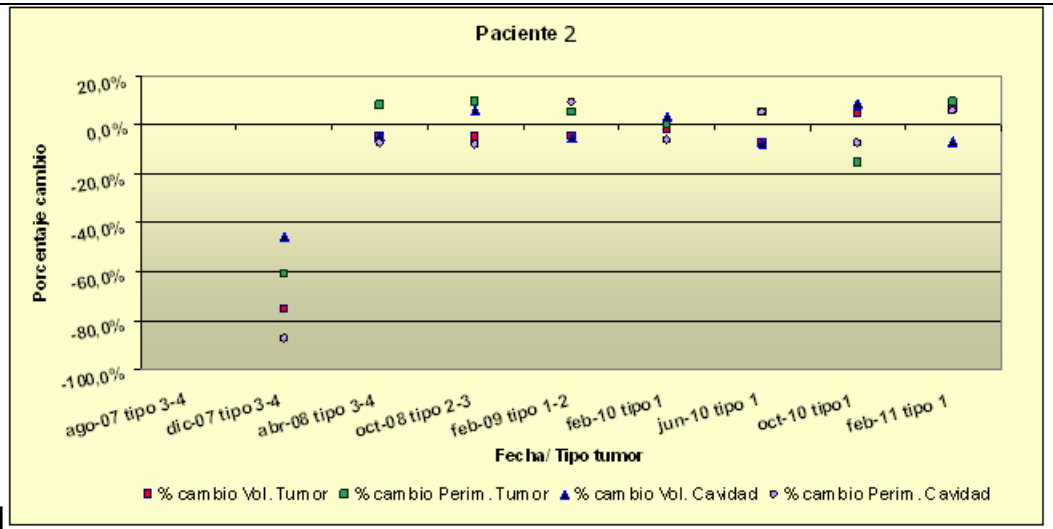
Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
2	**47**	**23/08/2007**	**Temporal derecho**	**Mixto**	**III**	**no del**	**no del**	**DMBT1 del**	**normal**	**25 x amp**	**normal**	**Metilado**	**wt**



Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
feb-10	tipo1		17982,569	-2,23%	1213,509	0,02%	no	7544,335	3,50%	280,936	-6,18%	Normal
jun-10	s/e	Igual que el estudio anterior	16589,454	-7,75%	1275,275	5,09%	no	6959,874	-7,75%	295,236	5,09%	s/e
oct-10	tipo1		17334,899	4,49%	1075,796	-15,64%	no	7576,709	8,86%	272,491	-7,70%	
feb-11	tipo 2	Igual que el estudio anterior	18427,284	6,30%	1175,589	9,28%	no	7034,284	-7,16%	287,187	5,39%	Espectros ruidoso-Mala ubicación

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
2	**47**	**23/08/2007**	**Temporal derecho**	**Mixto**	**III**	**no del**	**no del**	**DMBT1 del**	**normal**	**25 x amp**	**normal**	**Metilado**	**wt**

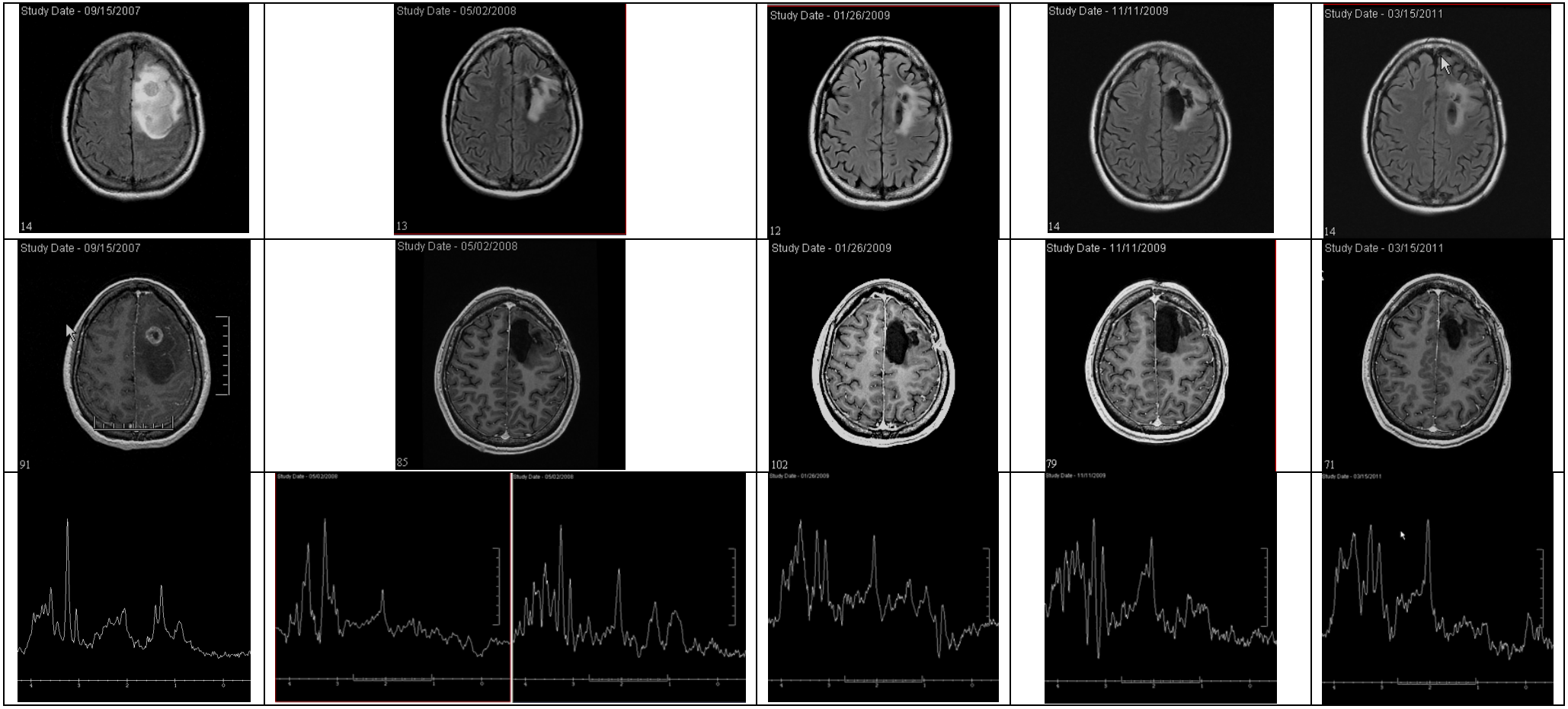




Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	Tumor Perímetro mm	Cavidad Volumen mm^3	Cavidad Perímetro mm
92606,399	2323,738	13337,582	2638,247

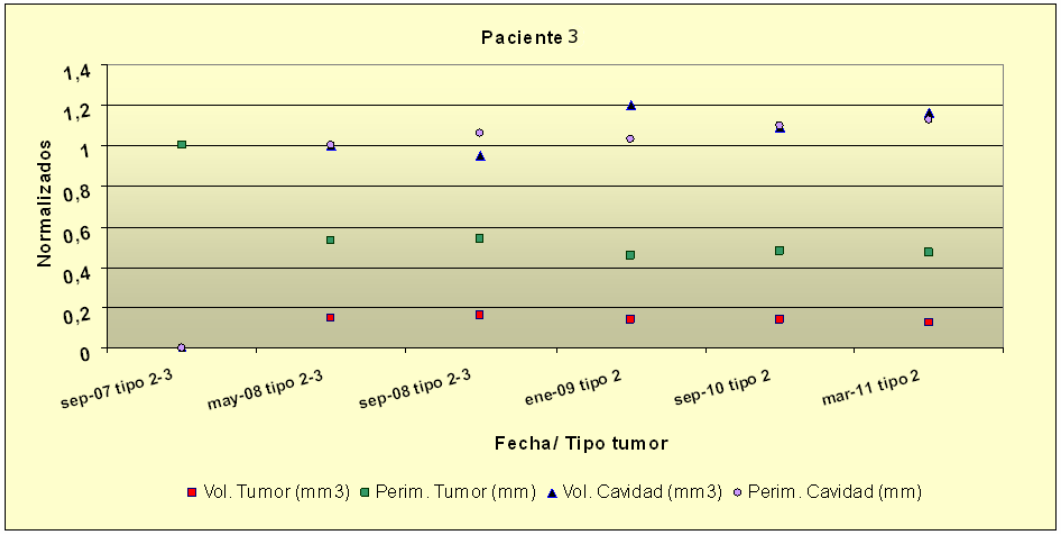
Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
2%	90%	70%	100%	90%	100%		
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

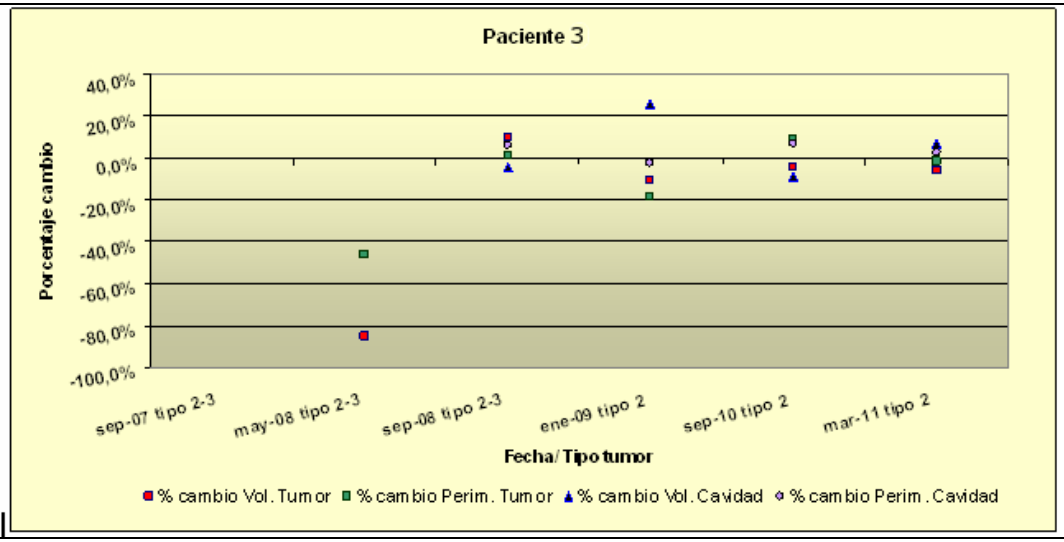
Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
3	**28**	**24/09/2007**	**Frontal izquierdo**	**Mixto**	**III**	**no del**	**no del**	**no del**	**del**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**



Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
sep-07	tipo 2-3	Neuronavegador	98946,437		1440,191		si					mucha colina sobre el refuerzo
may-08	tipo 2-3		14578,329	-85,27%	769,209	-46,59%	no	20535,197		621,285		mucho Mio/Gly-
sep-08	tipo 2-3		15978,329	9,60%	778,209	1,17%	no	19540,289	-4,84%	658,214	5,94%	
ene-09	tipo 2		14204,056	-11,10%	661,315	-18,88%	no	24640,1871	26,10%	641,274	-2,57%	mejoran las espectros
sep-10	tipo 2		13570,525	-4,46%	689,576	9,23%	no	22410,994	-9,05%	683,383	6,57%	
mar-11	tipo 2	Normal	12741,254	-6,11%	677,886	-1,70%		23891,257	6,61%	698,329	2,19%	

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
3	**28**	**24/09/2007**	**Frontal izquierdo**	**Mixto**	**III**	**no del**	**no del**	**no del**	**del**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**

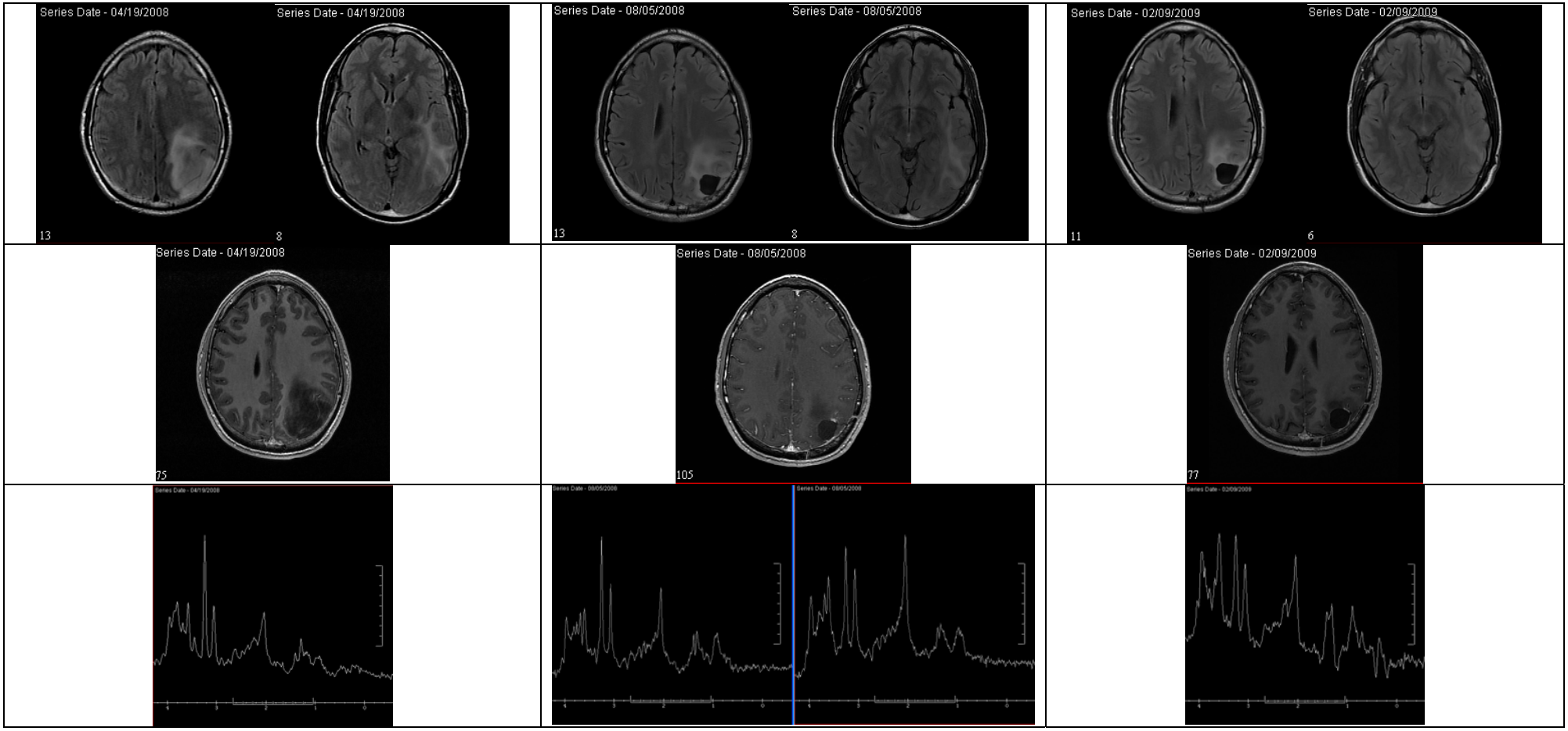




Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	Tumor Perímetro mm	Cavidad Volumen mm^3	Cavidad Perímetro mm
12741,254	677,886	20535,197	621,285

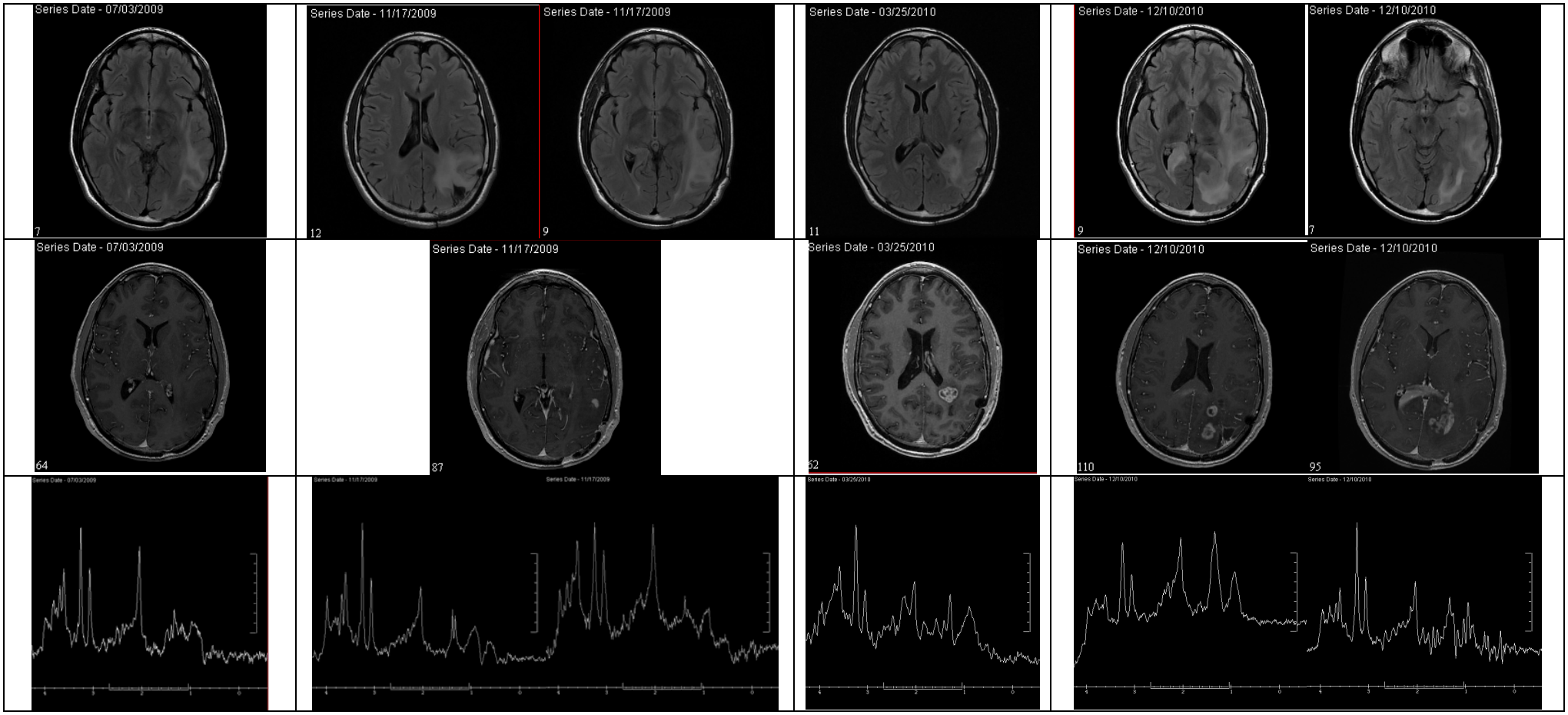
Escala Karnofsky (KPS							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
10%	100%	100%	100%	100%	90%		
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
4	**27**	**22/04/2008**	**Parietal Izquierdo**	**Mixto**	**III**	**del**	**del**	**ambas del**	**normal**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**



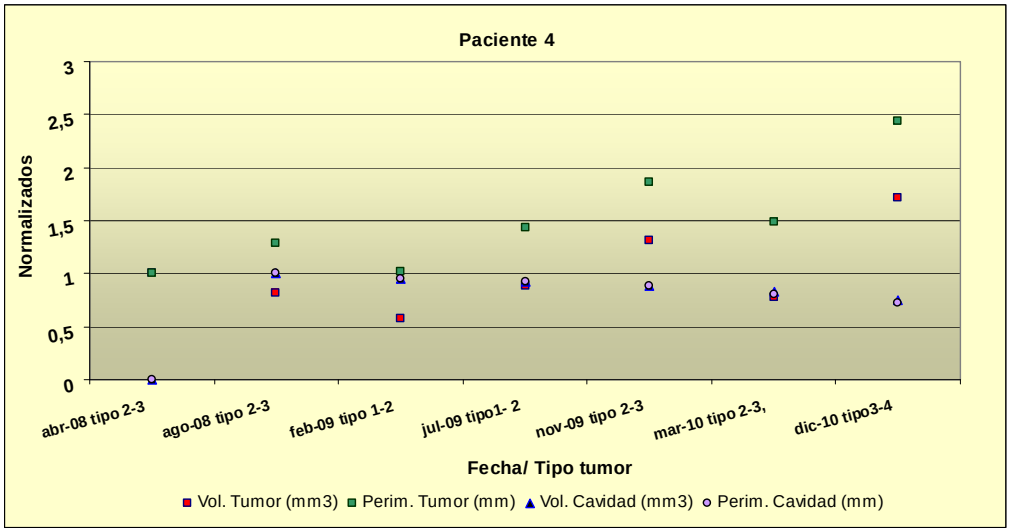
Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
abr-08	tipo 2-3	Neuronavegador	71414,788		1823,853		no					Cho-Lac-Gly
Ago-08	tipo 2-3		58626,490	-17,91%	2346,630	28,66%	no	6004,396		241,989		Mio
feb-09	tipo 1-2	Reduce edema	41069,268	-29,95%	1866,399	-20,46%	no	5739,375	-4,41%	230,795	-4,63%	↑ Mio/Gly-↓ Cho

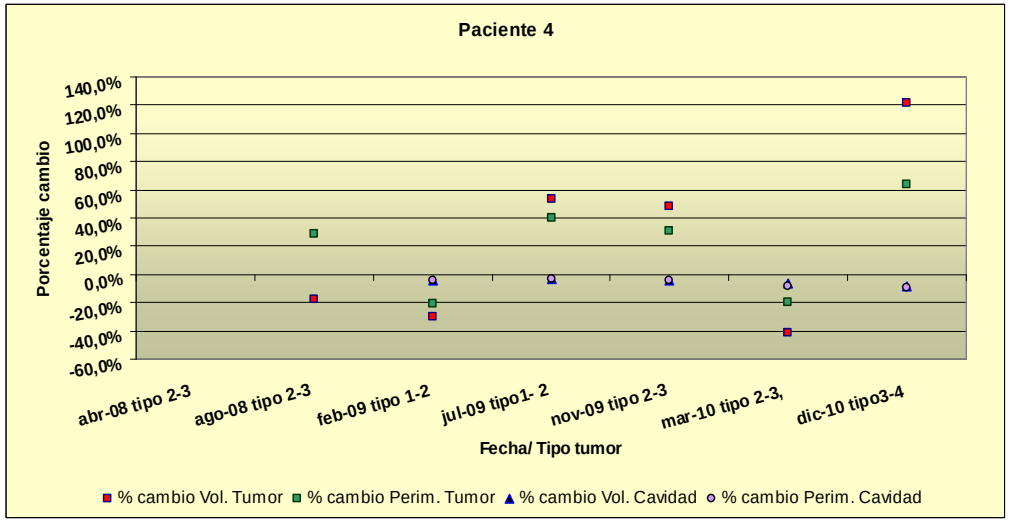
Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
4	**27**	**22/04/2008**	**Parietal Izquierdo**	**Mixto**	**III**	**del**	**del**	**ambas del**	**normal**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**



Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
jul-09	tipo1- 2		62954,510	53,29%	2614,496	40,08%	no	5532,896	-3,60%	224,122	-2,89%	
nov-09	tipo 2-3	Empieza a reforzar con Gd	93416,132	48,39%	3404,421	30,21%	si	5297,105	-4,26%	214,128	-4,46%	Lac Mio/Gly
mar-10	tipo 2-3,	Disminuye el edema	55069,038	-41,05%	2714,387	-20,27%	si, mucho	4974,294	-6,09%	195,944	-8,49%	Cho
dic-10	tipo3-4		121985,095	121,51%	4435,672	63,41%	si, aparecen otra lesiones	4541,442	-8,70%	176,443	-9,95%	Lip Cho-↓Mio/Gly

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
4	**27**	**22/04/2008**	**Parietal Izquierdo**	**Mixto**	**III**	**del**	**del**	**ambas del**	**normal**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**



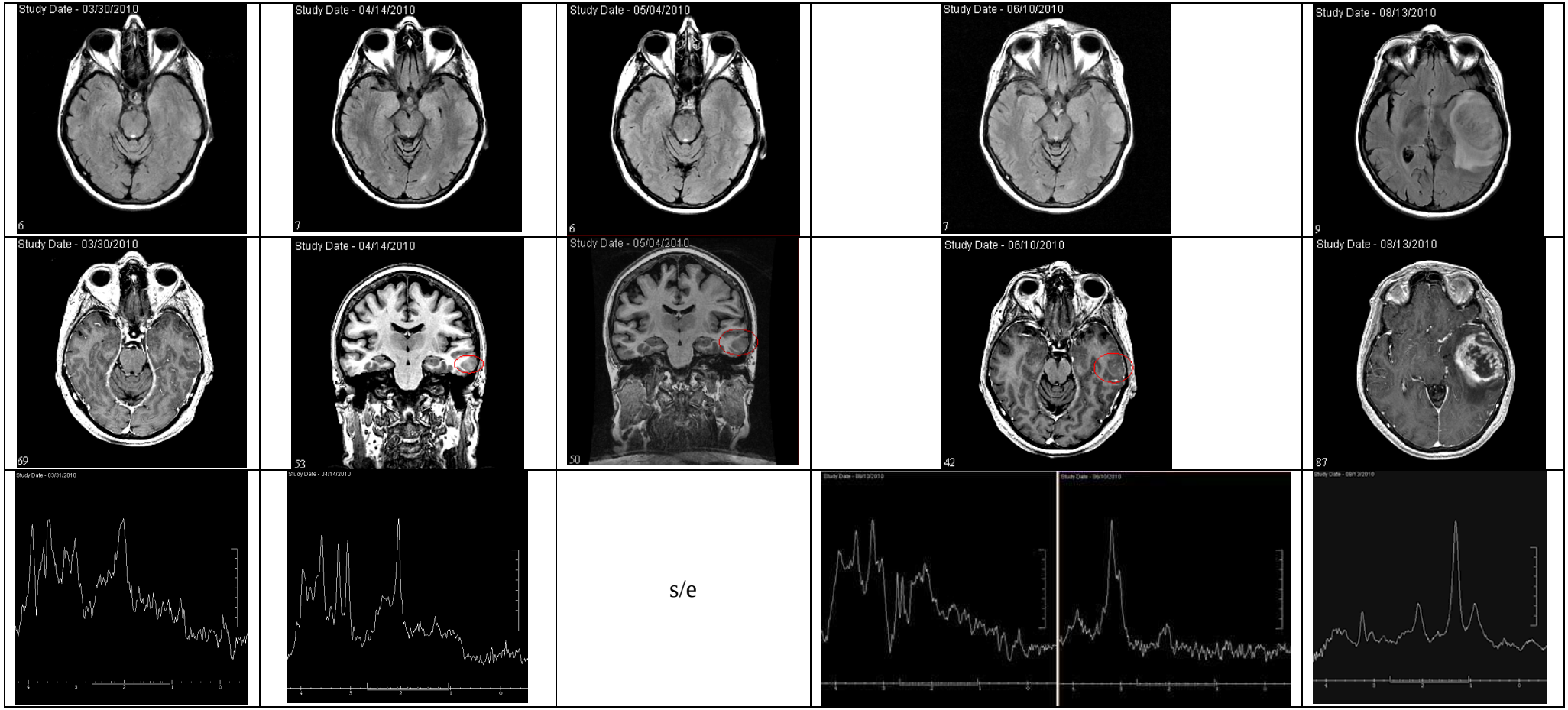


Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	Tumor Perímetro mm	Cavidad Volumen mm^3	Cavidad Perímetro mm
71414,788	1823,853	6004,396	241,989

Escala Karnofsky (KPS)								
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**	**Muerte**
6%	90%	90%	100%	100%	70%			20/07/2011

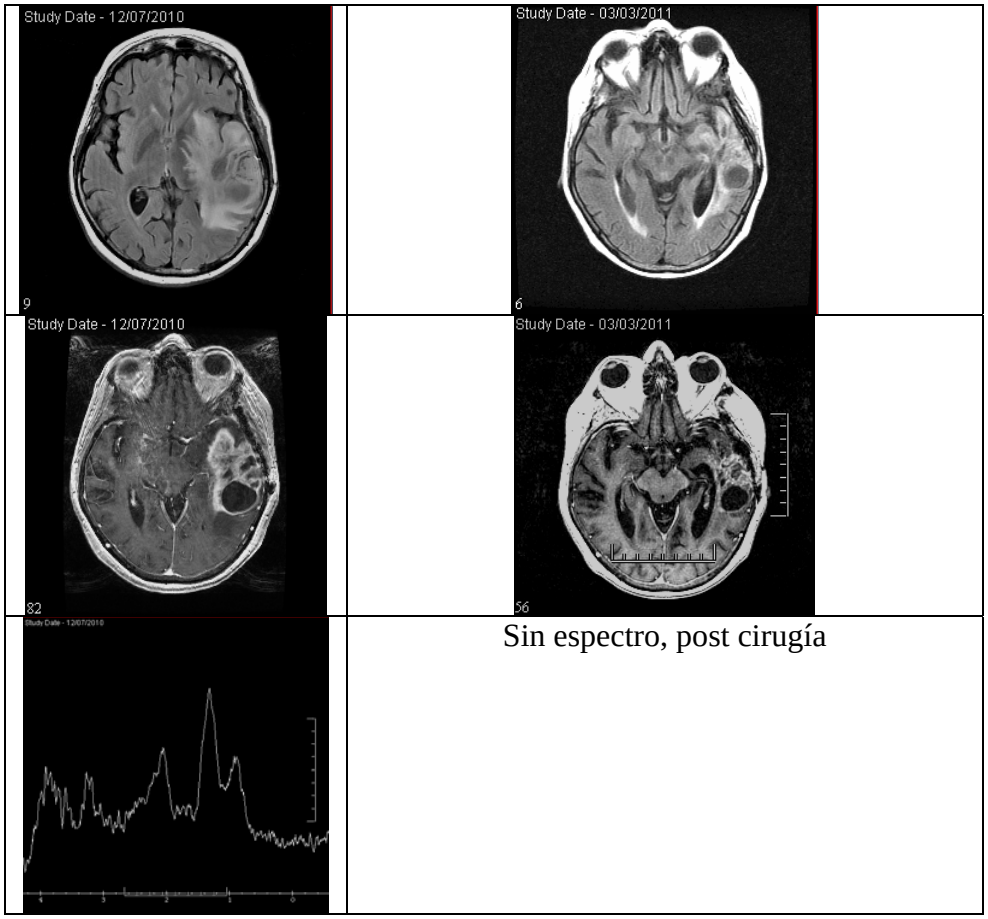
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
5	**63**	**30/08/2010**	**Temporal izquierdo**	**GB**	**IV**	**no del**	**parcial**	**ambas del**	**LOH**	**5 x amp.**	**normal**	**Metilado**	**wt**



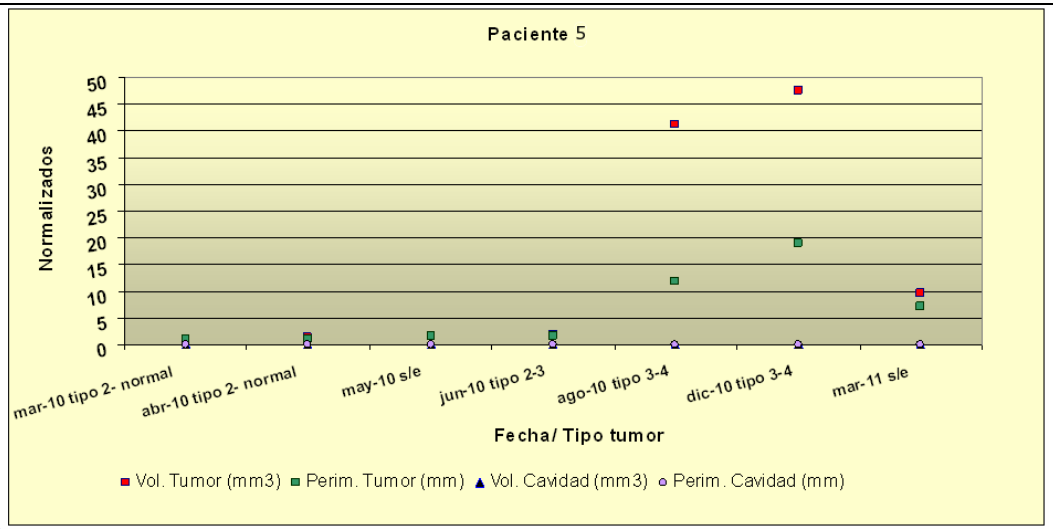
Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	
mar-10	tipo 2- normal	No se ve la lesión claramente	2859,925		183,480		no					Mio/Gly
abr-10	tipo 2- normal		3672,182	28,40%	226,788	23,60%	no					Mio/Gly
may-10	s/e	Se ve la lesión claramente	4939,820	34,52%	308,150	35,88%	no					
jun-10	tipo 2-3	Se ve la lesión claramente	5150,619	4,27%	298,924	-2,99%	si					Espectro 30 ms con artefacto- Cho Gly?
ago-10	tipo 3-4	Imagen GB	117818,4	2187,46%	2151,129	619,62%	si. Mucho					

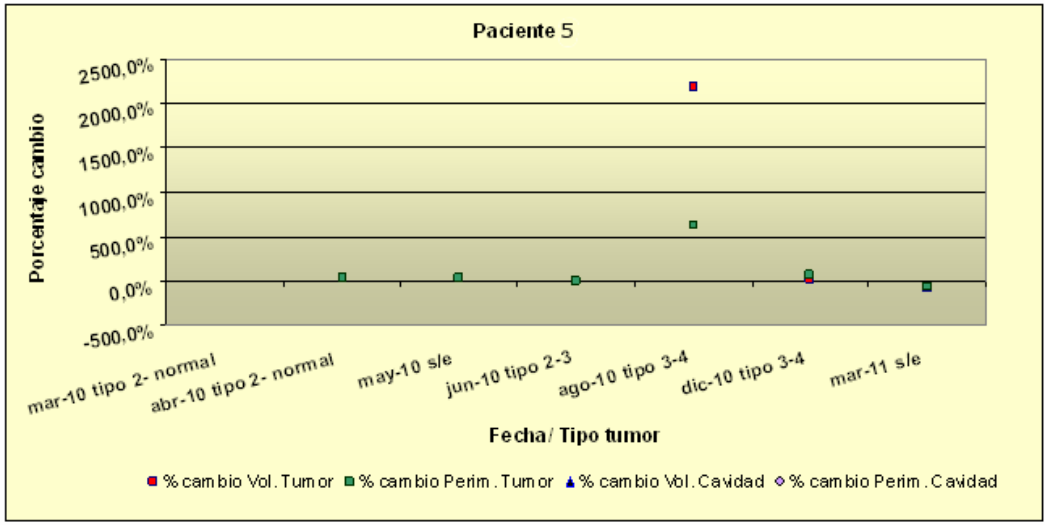
Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
5	**63**	**30/08/2010**	**Temporal izquierdo**	**Glioblastoma**	**IV**	**no del**	**parcial**	**ambas del**	**LOH**	**5 x amp.**	**normal**	**Metilado**	**wt**



Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio
dic-10	tipo 3-4		135829,428	15,29%	3473,058	61,45%	si. Mucho				Lip-Cho
mar11	s/e	post-cirugía	27120,962	-80,03%	1285,916	-62,97%	si. Mucho				

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
5	**63**	**30/08/2010**	**Temporal izquierdo**	**Glioblastoma**	**IV**	**no del**	**parcial**	**ambas del**	**LOH**	**5 x amp.**	**normal**	**Metilado**	**wt**

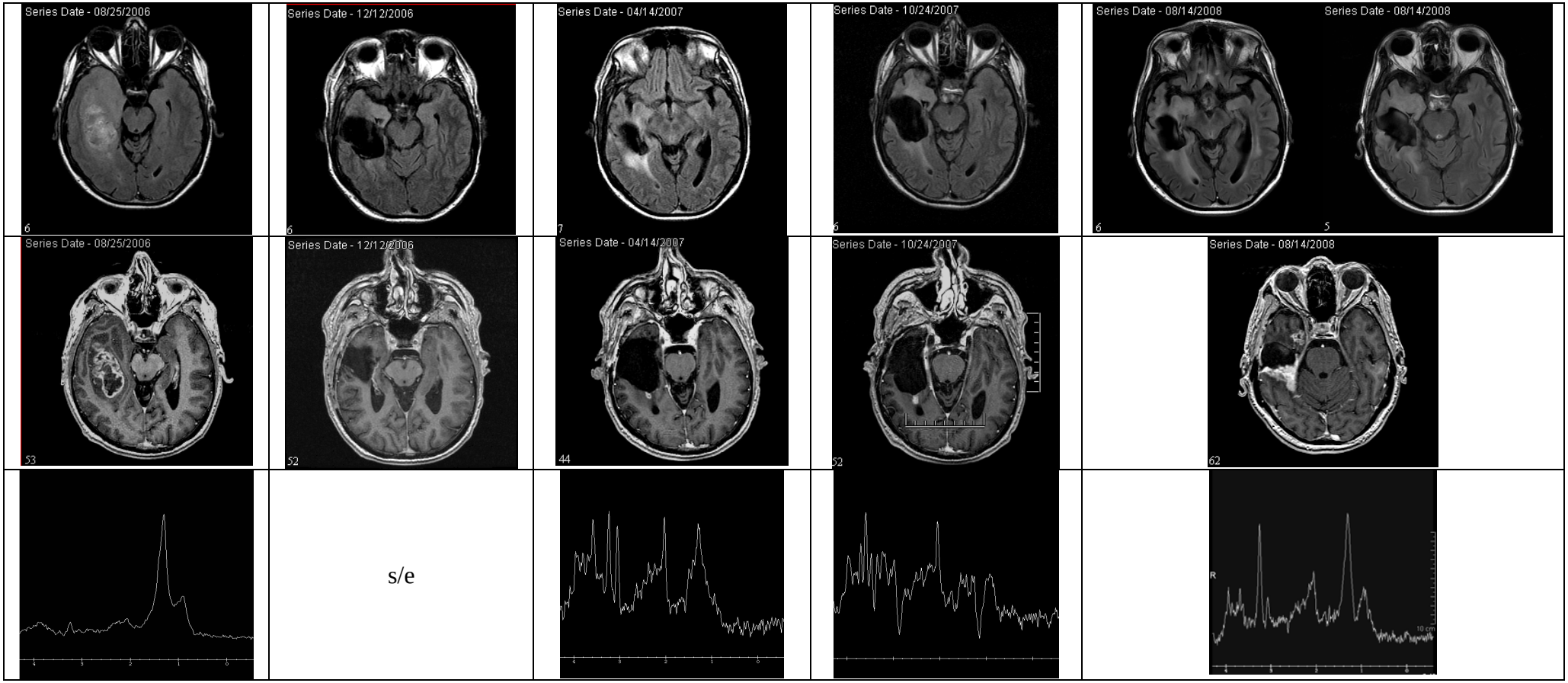




Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	Tumor Perímetro mm	Cavidad Volumen mm^3	Cavidad Perímetro mm
2859,925	183,480	-	-

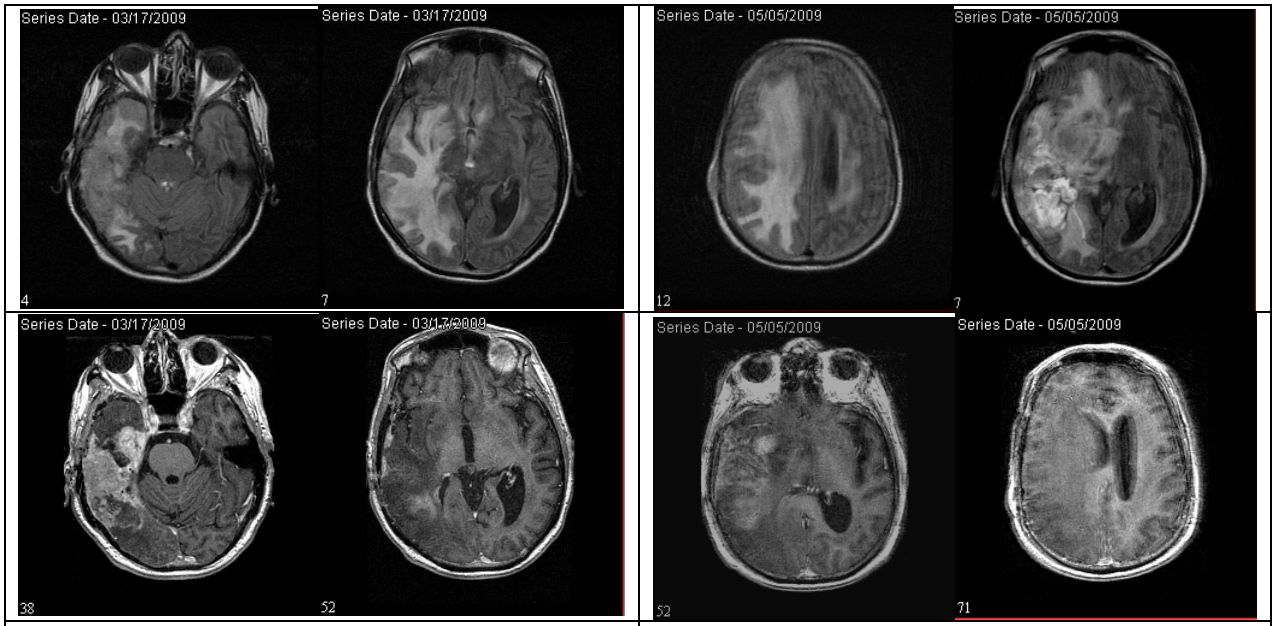
Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
6	**55**	**25/08/2006**	**Temporal derecho**	**Tu. Glioneuronal**	**IV**	**no del**	**no del**	**ambas del**	**LOH**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**



Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
ago-06	tipo 4		80911,285		2127,639		si. Mucho					Lip-Cho
dic-06	s/e	Post cirugía	30546,330	-62,25%	1545,346	-27,37%	no	23348,101		561,888		
abr-07	tipo 2-3		17643,888	-42,24%	777,716	-49,67%	un poco	20793,831	-10,94%	474,028	-15,64%	Gly/Mio-Lip?
jul-07	s/e		19689,3648	11,59%	798,289	2,65%	un poco	20407,833	-1,86%	412,555	-12,97%	
oct-07	Espectro con artefacto-voxel chico		20893,517	6,12%	852,257	6,76%	un poco	19967,001	-2,16%	406,018	-1,58%	Gly/Mio?
mar-08	tipo 3-4		22395,198	7,19%	958,127	12,42%	si	19014,925	-4,77%	392,247	-3,39%	↑↑Cho - ↑↑ Lip

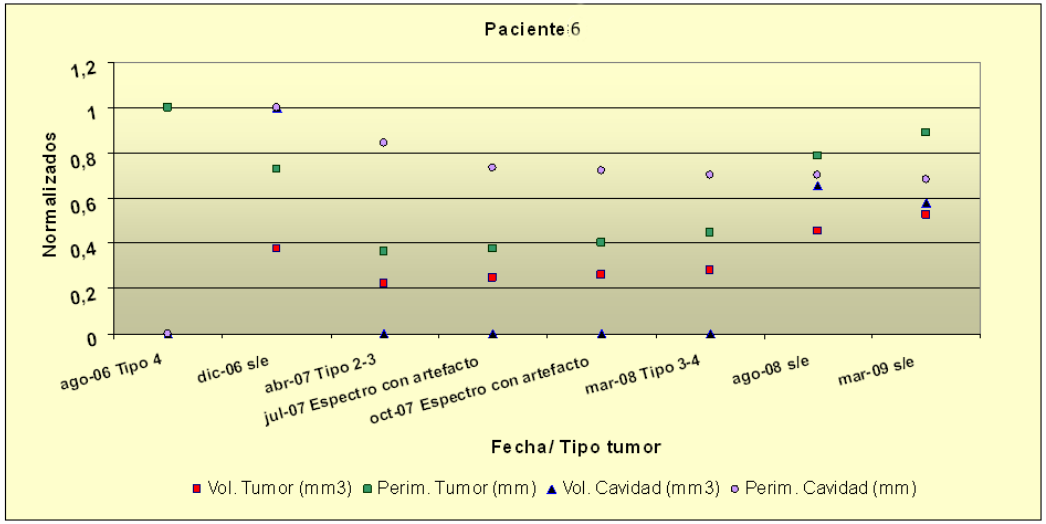
Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
6	**55**	**25/08/2006**	**Temporal derecho**	**Tu. Glioneuronal**	**IV**	**no del**	**no del**	**ambas del**	**LOH**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**

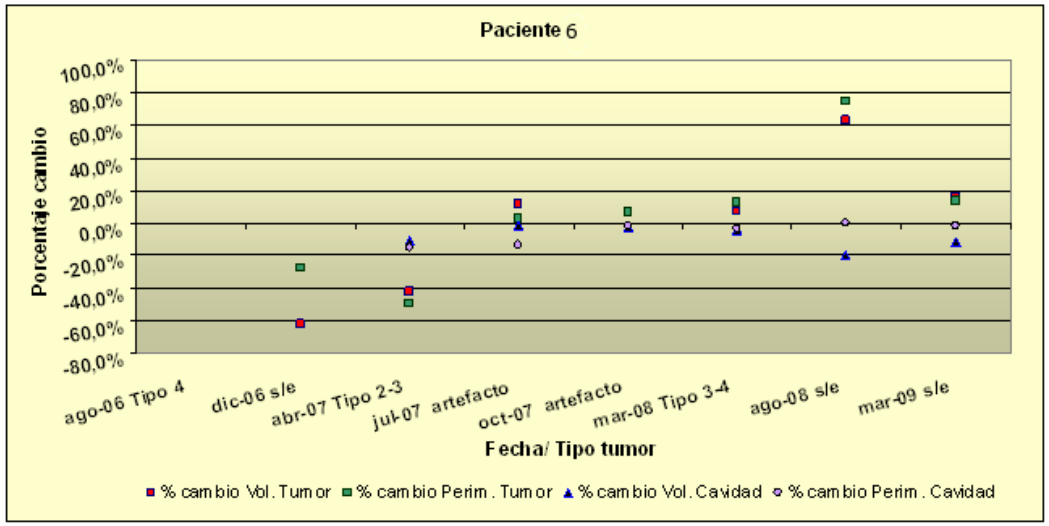


s/e	s/e

Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
ago-08	s/e	Aumenta el contraste	36502,667	62,99%	1671,855	74,49%	mucho	15303,799	-19,52%	392,247	0,00%	
mar-09	s/e	Ocupa casi todo hemisferio derecho-aumenta contraste	42569,289	16,62%	1897,1963	13,48%		13489,239	-11,86%	383,974	-2,11%	

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
6	**55**	**25/08/2006**	**Temporal derecho**	**Tu. Glioneuronal**	**IV**	**no del**	**no del**	**ambas del**	**LOH**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**

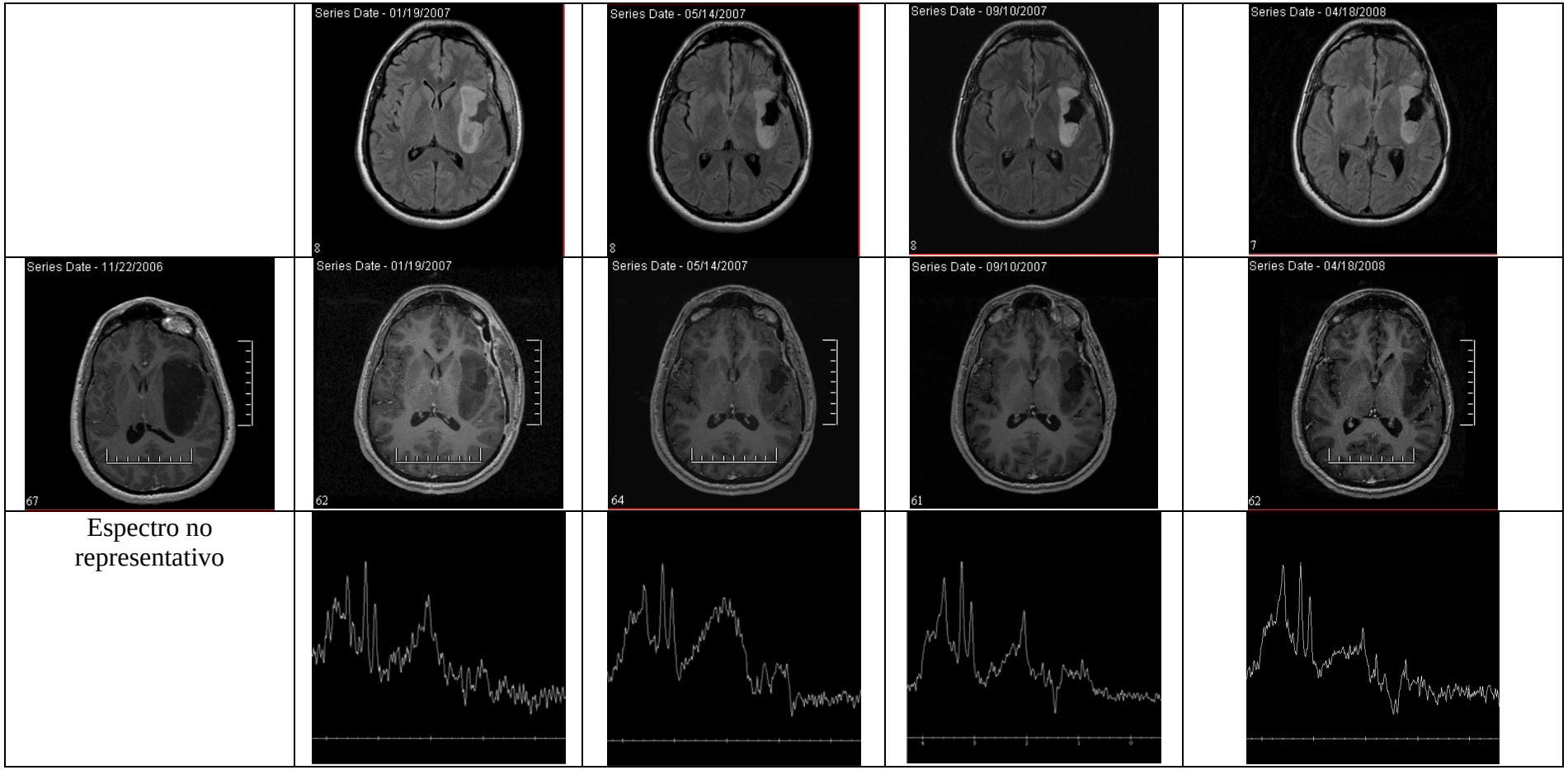




Escala Karnofsky (KPS)			
Tumor Volumen mm^3	Tumor Perímetro mm	Cavidad Volumen mm^3	Cavidad Perímetro mm
80911,285	2127,639	23348,101	561,888

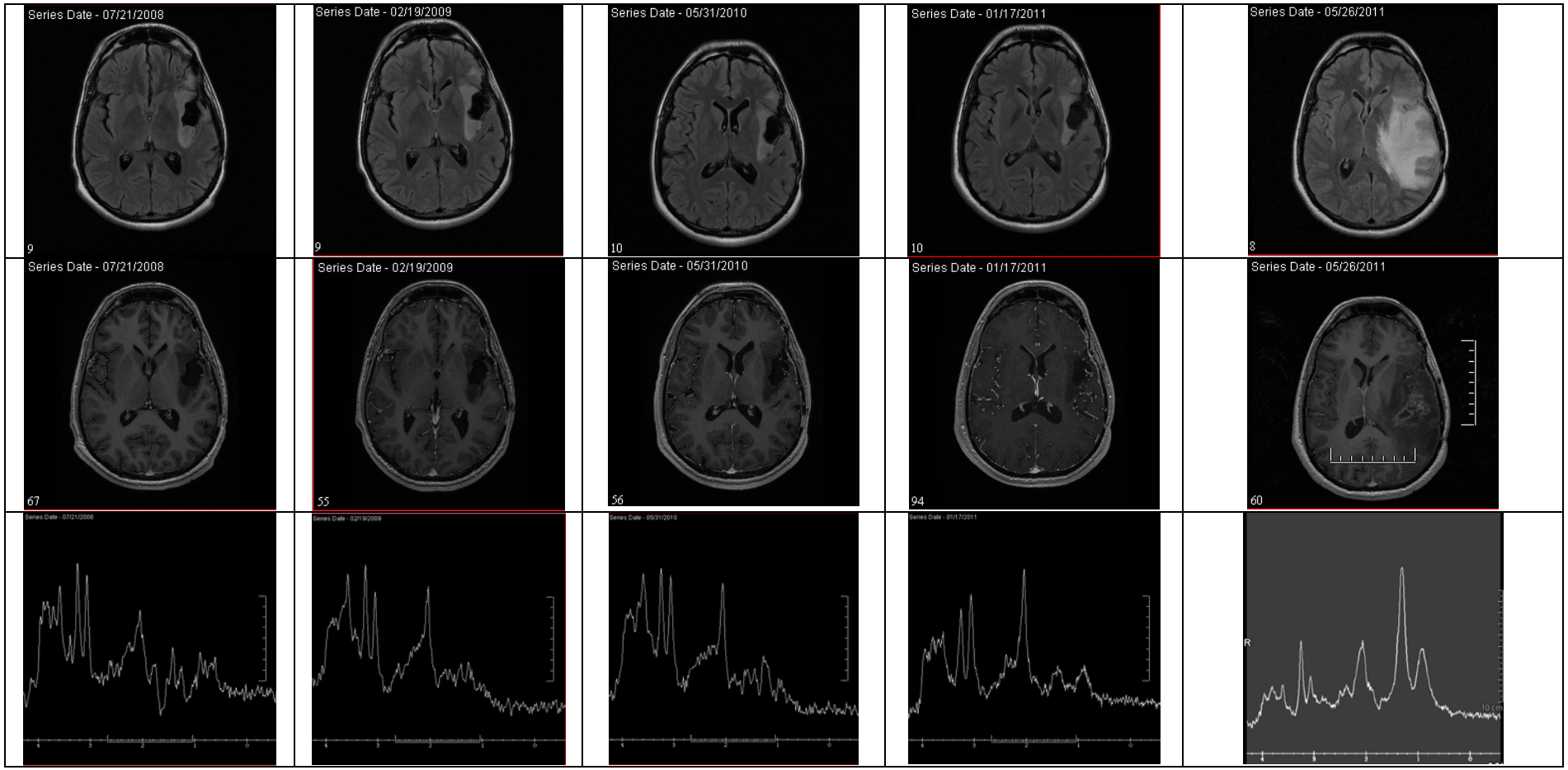
Escala Karnofsky (KPS)								
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**	**Muerte**
NA	100%	90%	100%	100%				28/05/2009
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años								

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
7	**27**	**22/11/2006**	**Temporo-insular izquierdo**	**Oligodendroglioma**	**II**	**del**	**no del**	**PTEN del**	**normal**	**normal**	**normal**	**No metilado**	**wt**



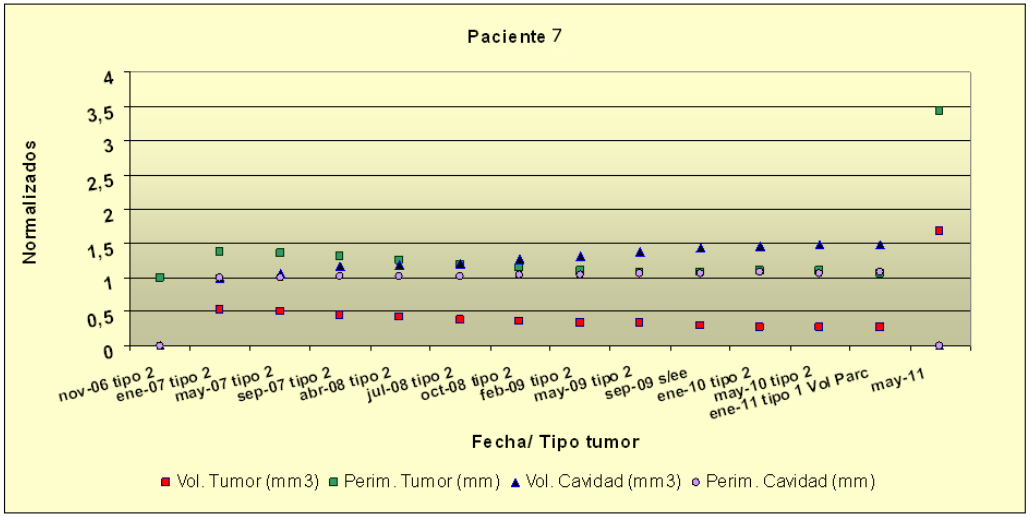
Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
nov-06		Neuronavegador	83193,025		1036,256							Mala ubicación voxel
ene-07	tipo 2		44819,567	-53,87 %	1423,535	37,37%	no	2770,077		207,332		Mio/Gly-Naa-Cho
may-07	tipo 2		41792,064	-6,75%	1396,888	-1,87%	no	2957,192	6,75%	208,302	0,47%	Mio Artefacto Naa
sep-07	tipo 2		37185,540	-11,02%	1363,197	-2,41%	no	3227,212	9,13%	209,558	0,60%	↑ Mio/Gly
abr-08	tipo 2		34673,706	-6,75%	1289,750	-5,39%	no	3309,581	2,55%	210,969	0,67%	Mio/Gly ↓ Naa

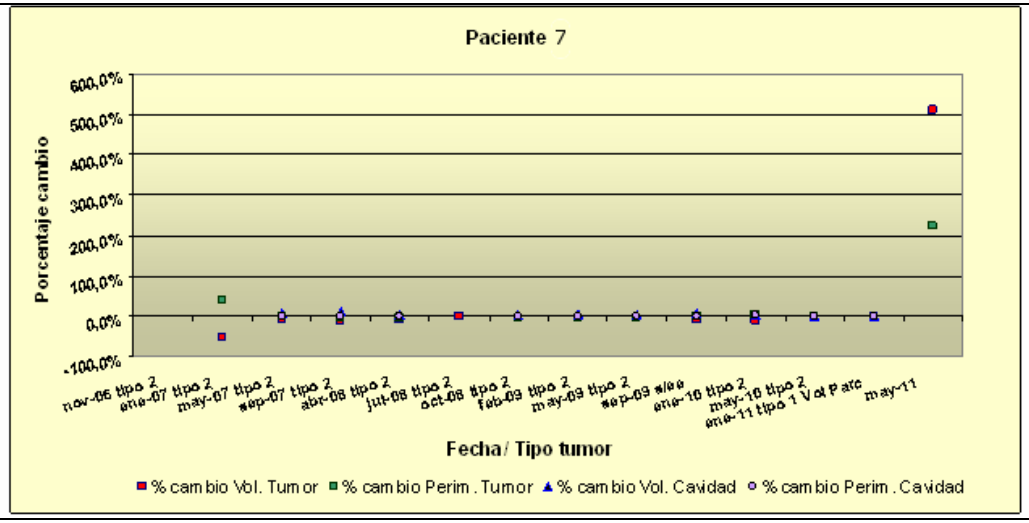
Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
7	**27**	**22/11/2006**	**Temporo-insular izquierdo**	**Oligodendroglioma**	**II**	**del**	**no del**	**PTEN del**	**normal**	**normal**	**normal**	**No metilado**	**wt**



Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
jul-08	tipo 2	Igual estudio anterior	31894,258	-0,10 %	1236,256			3359,569		211,569		Igual anterior
oct-08	tipo 2		29675,071	-2,55%	1193,823	-3,72%	no	3501,238	2,41%	214,987	0,93%	Igual anterior
feb-09	tipo 2		28694,295	-3,31%	1151,388	-3,55%	no	3655,243	4,40%	216,897	0,89%	Igual anterior
may-09	tipo 2		27313,296	-4,81%	1123,754	-2,40%	no	3795,237	3,83%	218,199	0,60%	
sep-09	s/es		25511,198	-6,60%	1108,624	-1,35%	no	4002,297	5,46%	218,933	0,34%	
ene-10	tipo 2	igual	22742,256	-10,85%	1138,971	2,74%	no	4056,777	1,36%	222,678	1,71%	Igual anterior
may-10	tipo 2	igual	22859,357	0,51%	1148,167	0,81%	no	4102,827	1,14%	221,548	-0,51%	Igual anterior
ene-11	tipo 1 Volumen parcial		22745,658	-0,50%	1098,257	-4,35%		4118.25	0,38%	223,457	0,86%	s/Mio
may-11		Malignizo!!!	138789,692	510,18%	3550.048	223,24%						↑↑↑ Naa Gly Lip

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
7	**27**	**22/11/2006**	**Temporo-insular izquierdo**	**Oligodendroglioma**	**II**	**del**	**no del**	**PTEN del**	**normal**	**normal**	**normal**	**No metilado**	**wt**

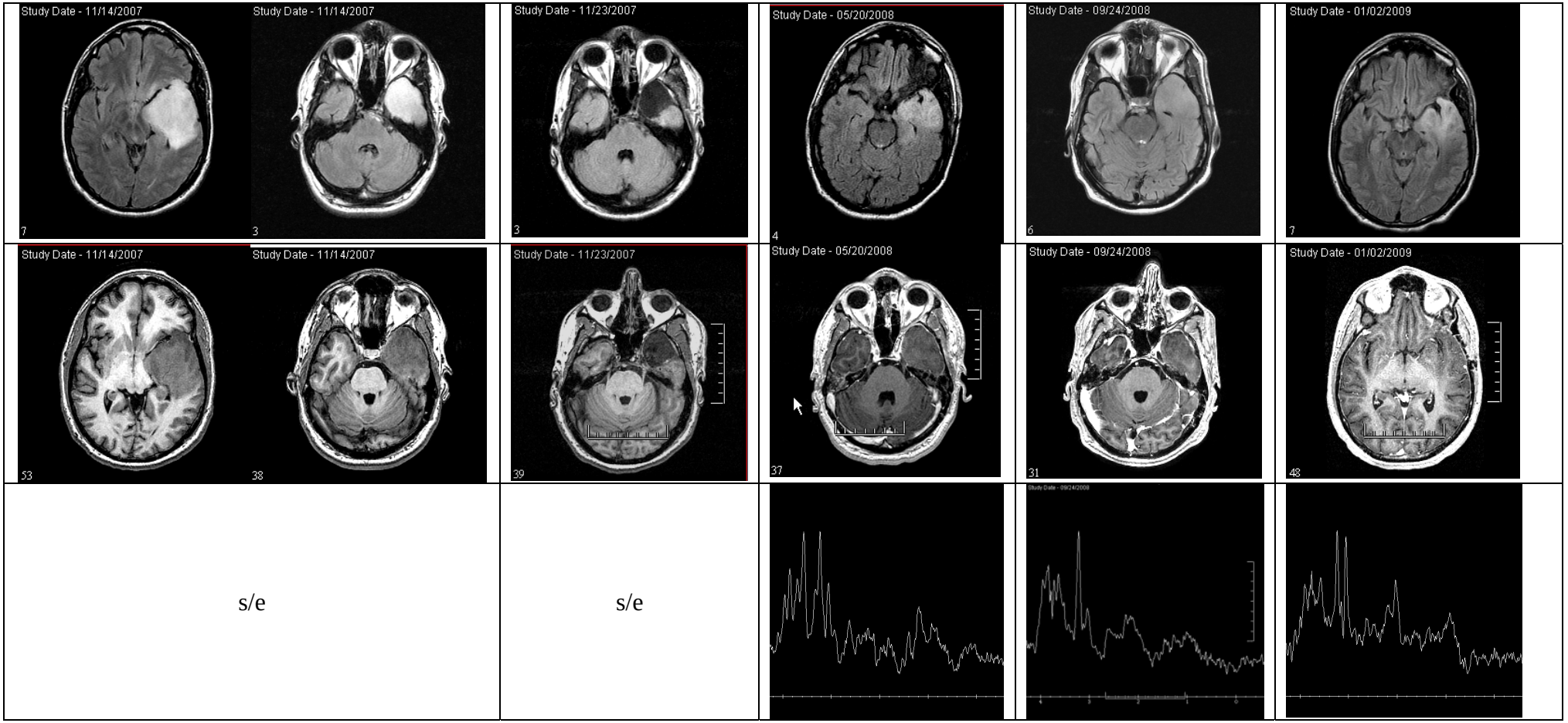




Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	**Tumor Perímetro mm**	**Cavidad Volumen mm^3**	**Cavidad Perímetro mm**
83193,025	1036,256	2770,077	207,332

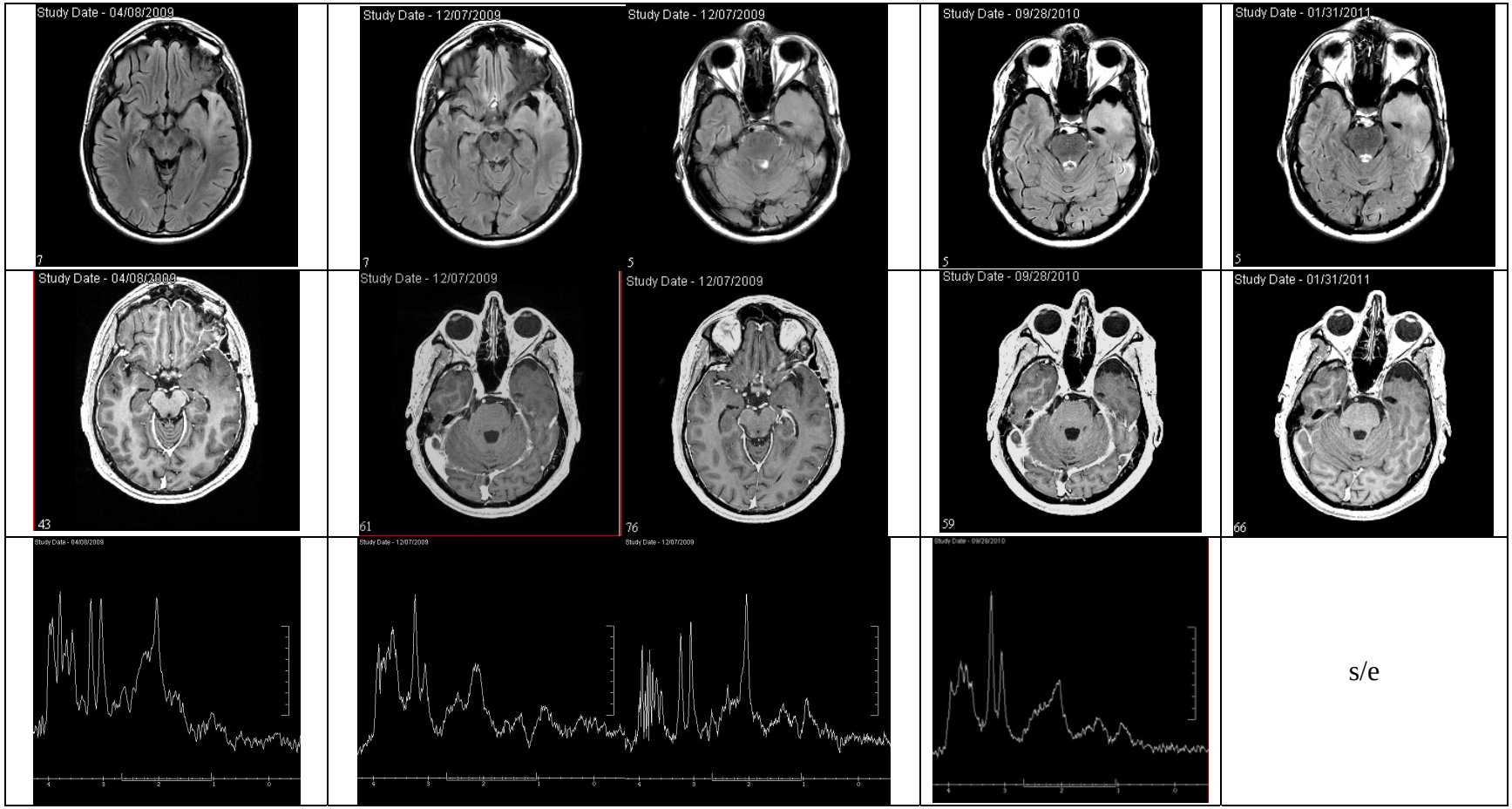
Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
5%	90%	80%	100%	80%	80%	90%	
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
8	**27**	**22/11/2007**	**Temporal izquierdo**	**Oligodendroglioma**	**II**	**no del**	**del**	**no del**	**normal**	**normal**	**normal**	**No metilado**	**R132H**



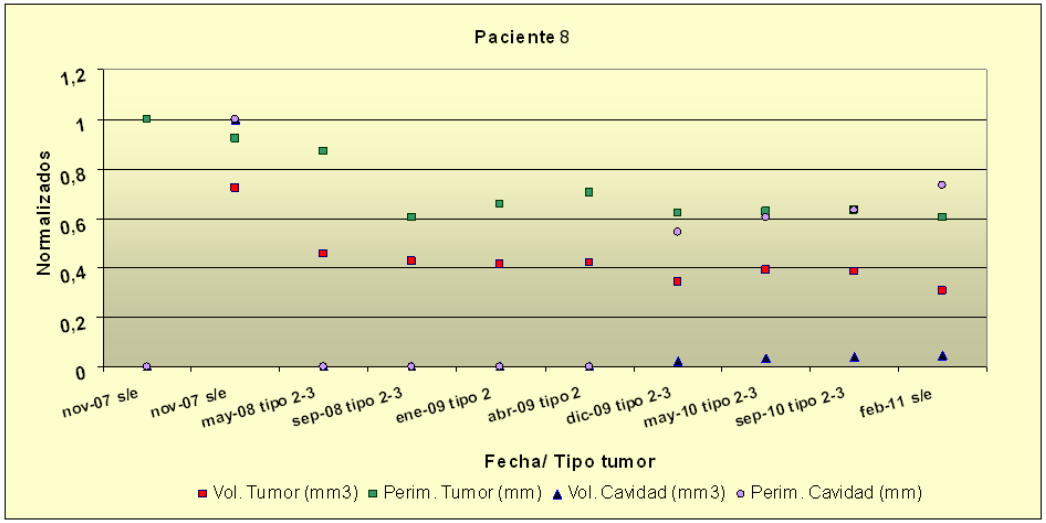
Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	
nov-07	s/e	Neuronavegador s/e	99465,057		1832,703		no				
nov-07	s/e	post cirugía s/e	71728,876	-27,89%	1689,233	-7,83%	no	13827,439		328,711	
may-08	tipo 2-3	Disminuye edema-tumor ocupa cavidad post cirugía Espectro en cavidad	45266,244	-36,89%	1592,288	-5,74%	no	no quedo espacio			Mio/Gly-Cho s/Naa
sep-08	tipo 2-3	Disminuye edema Espectro en cavidad	42240,714	-6,68%	1106,865	-30,49%	no	no quedo espacio			↑ Cho ↓ Mio/Gly
ene-09	tipo 2	Disminuye edema Espectro región no operada	40989,923	-2,96%	1202,139	8,61%	no	no quedo espacio			↓ Naa

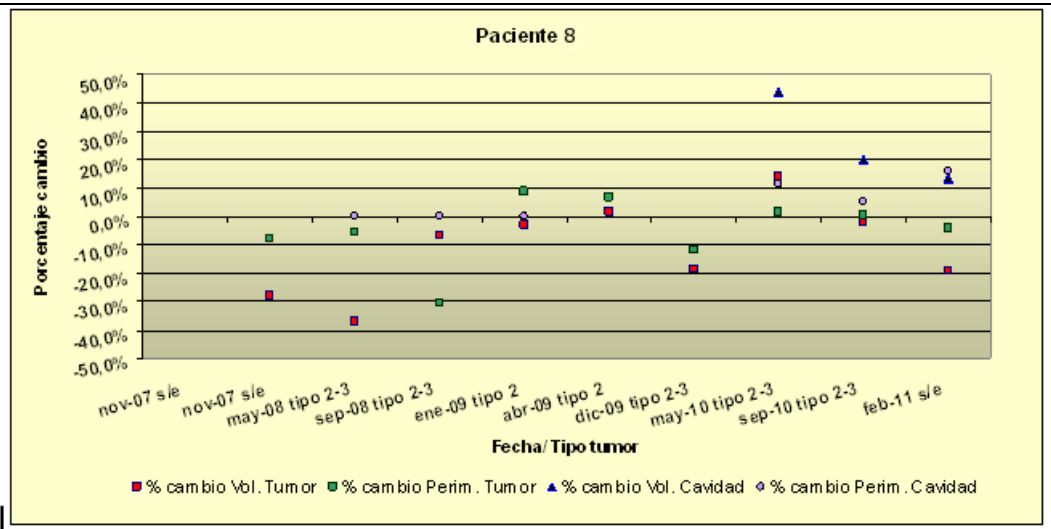
Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
8	**27**	**22/11/2007**	**Temporal izquierdo**	**Oligodendroglioma**	**II**	**no del**	**del**	**no del**	**normal**	**normal**	**normal**	**No metilado**	**R132H**



Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
abr-09	tipo 2	Espectro sobre la región no operada	41695,235	1,72%	1284,295	6,83%		no quedo espacio				↑ Naa
dic-09	tipo 2-3	Empieza a verse espacio en región post-cirugía. Dos espectros distintod	34051,416	-18,33%	1133,214	-11,76%		345,237		178,256		
may-10	tipo 2-3	s/e	38749,878	13,80%	1149,221	1,41%	no	496,237	43,74%	198,218	11,20%	s/e
sep-10	tipo 2-3		37951,186	-2,06%	1154,298	0,44%	no	596,126	20,13%	208,239	5,06%	
feb-11	s/e		30647,802	-19,24%	1105,980	-4,19%	no	675,815	13,37%	241,206	15,83%	Cho

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
8	**27**	**22/11/2007**	**Temporal izquierdo**	**Oligodendroglioma**	**II**	**no del**	**del**	**no del**	**normal**	**normal**	**normal**	**No metilado**	**R132H**

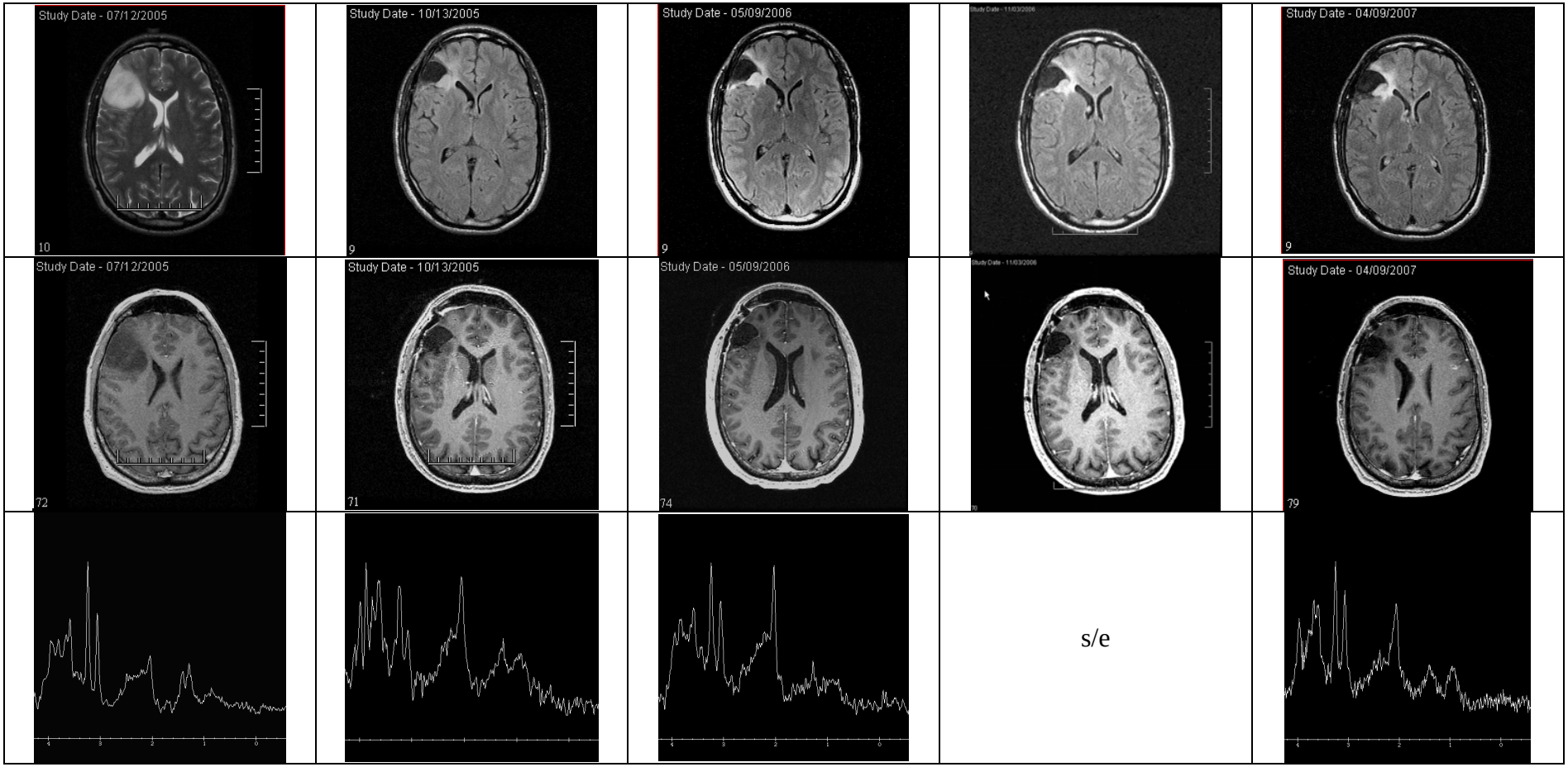




Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	Tumor Perímetro mm	Cavidad Volumen mm^3	Cavidad Perímetro mm
99465,057	1832,703	13827,439	328,711

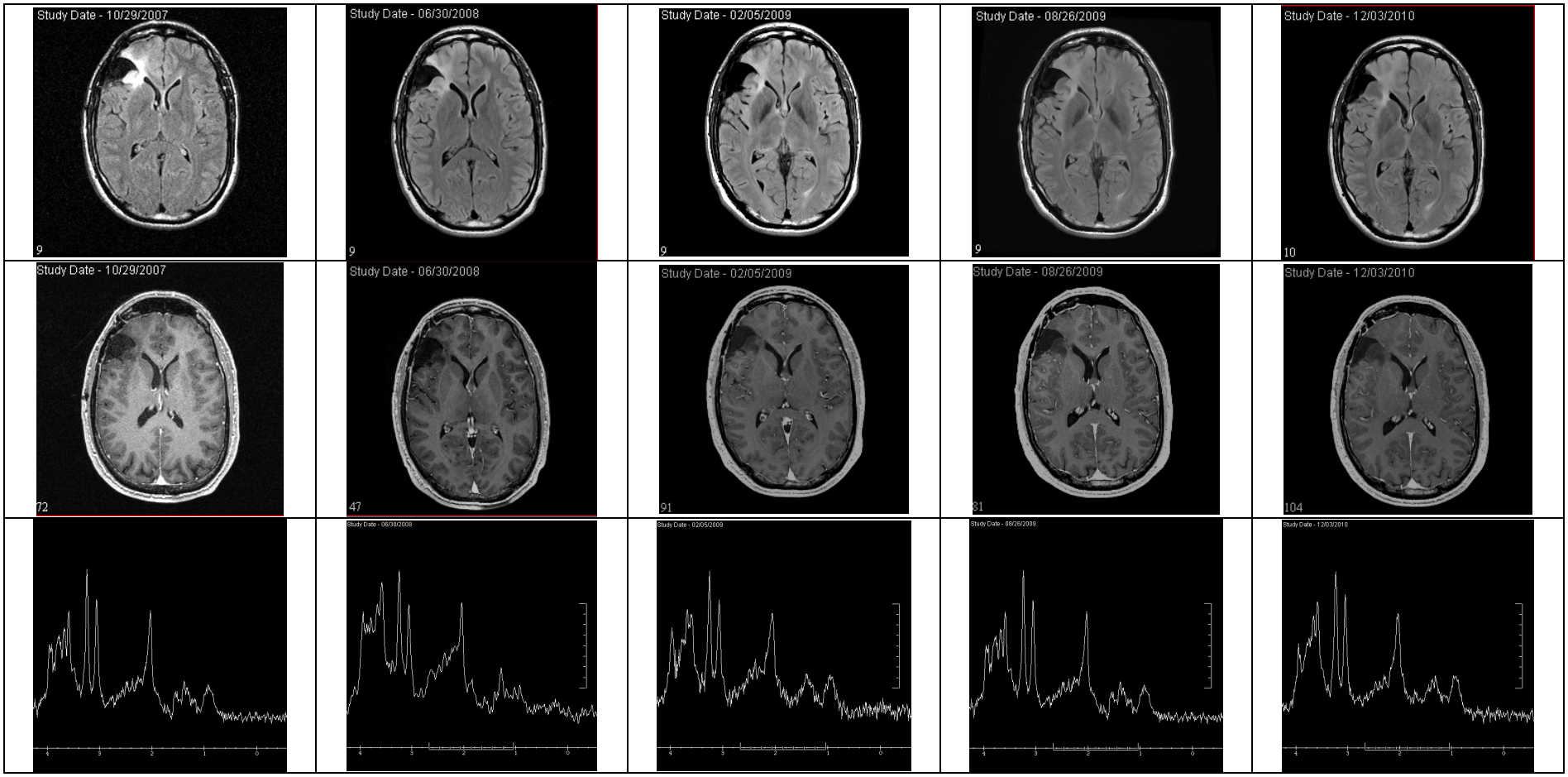
Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
14%	100%	90%	90%	90%	90%		
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
9	**30**	**12/07/2005**	**Frontal der.**	**Oligodendroglioma**	**II**	**no del**	**no del**	**no del**	**normal**	**normal**	**normal**	**No metilado**	**R132H**



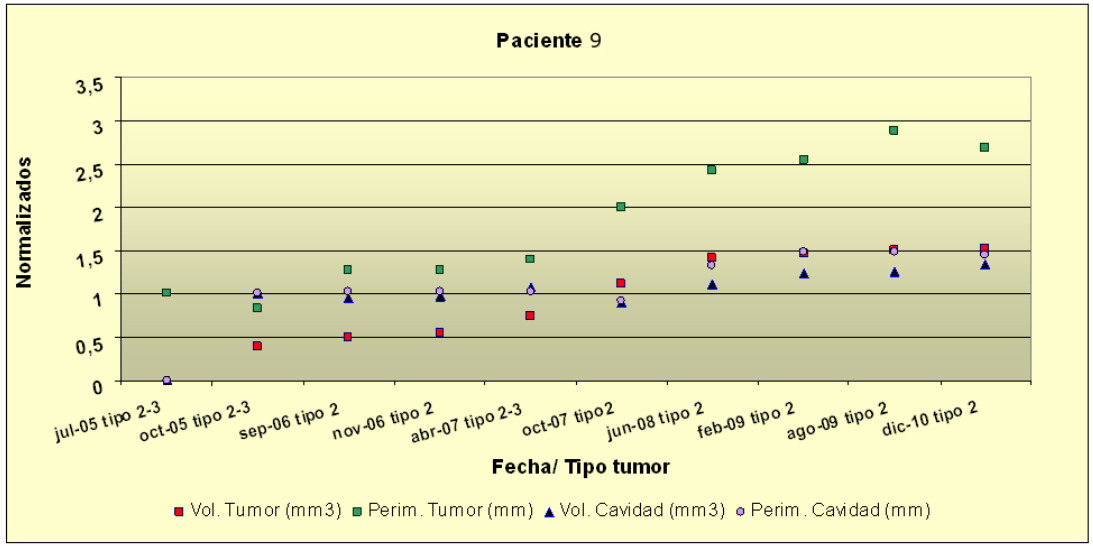
Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
jul-05	tipo 2-3	Neuronavegador	22990,676		624,870		No					Cho-Lac-Glux
oct-05	tipo 2-3		9014,809	-60,79%	521,591	-16,53%	No	10068,408		385,049		Mi/Gly-↑ Naa
sep-06	tipo 2		11390,918	26,36%	790,027	51,46%	no	9683,665	-3,82%	397,899	3,34%	Cho -↑ Naa
nov-06	s/e		12698,236	11,48%	796,236	0,79%	no	9758,188	0,77%	397,370	-0,13%	s/e
abr-07	tipo 2-3	crece edema	17052,820	34,29%	876,429	10,07%	no	10928,140	11,99%	393,431	-0,99%	↓ Cho

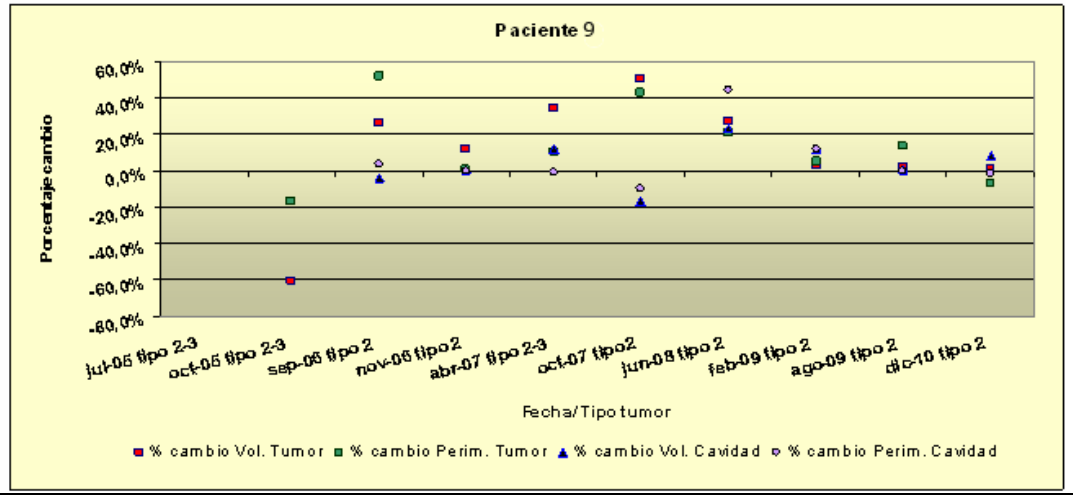
Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
9	**30**	**12/07/2005**	**Frontal der.**	**Oligodendroglioma**	**II**	**no del**	**no del**	**no del**	**normal**	**normal**	**normal**	**No metilado**	**R132H**



Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
oct-07	tipo2		25657,400	50,46%	1251,678	42,82%	no	9059,534	-17,10%	353,592	-10,13%	
jun-08	tipo 2	crece imagen hipodensa en cavidad	32602,206	27,07%	1513,381	20,91%	no	11164,317	23,23%	509,251	44,02%	Mio-Lac
feb-09	tipo 2		33568,569	2,96%	1589,589	5,04%	no	12456,569	11,57%	569,158	11,76%	
ago-09	tipo 2		34369,289	2,39%	1798,326	13,13%	no	12569,128	0,90%	568,924	-0,04%	↓ Glux
dic-10	tipo 2		34924,574	1,62%	1673,796	-6,92%	no	13569,127	7,96%	557,197	-2,06%	Mio-↓ Glux

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
9	**30**	**12/07/2005**	**Frontal der.**	**Oligodendroglioma**	**II**	**no del**	**no del**	**no del**	**normal**	**normal**	**normal**	**No metilado**	**R132H**



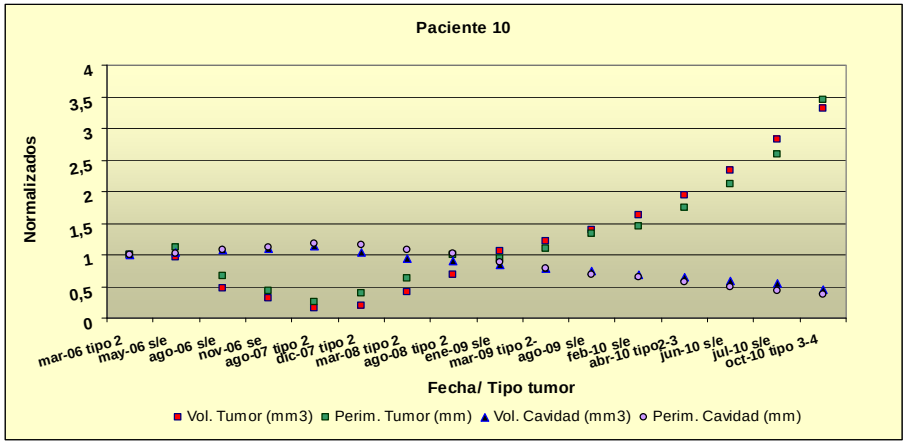


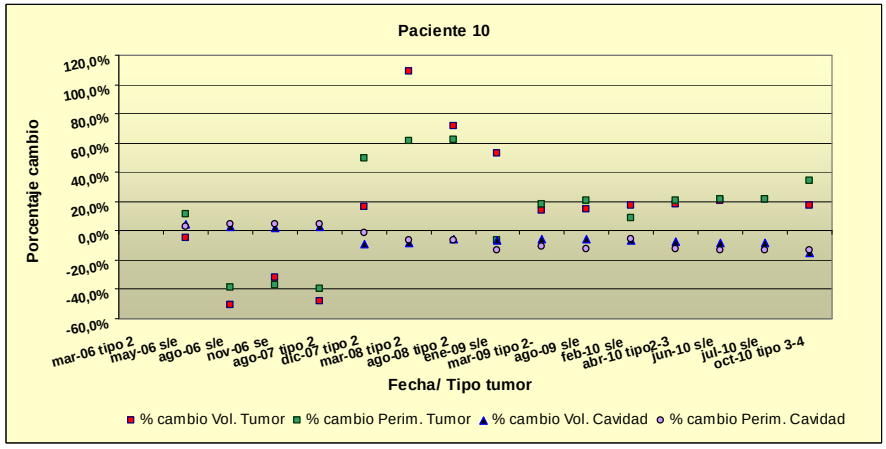
Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	Tumor Perímetro mm	Cavidad Volumen mm^3	Cavidad Perímetro mm
22990,676	624,870	10068,408	385,049

Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
6%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
10	**48**	**13/02/2006**	**Fronto-temp izq.**	**Oligodendroglioma**	**II**	**no del**	**no del**	**no del**	**del**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**

Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
mar-06	tipo 2	post-cirugía	50182,593		1603,432		si	3279,164		240,767		
may-06	s/e		47909,765	-4,5%	1779,321	11,0%	no	3439,247	4,9%	247,239	2,7%	
ago-06	s/e		23828,951	-50,3%	1084,390	-39,1%	no	3547,288	3,1%	259,309	4,9%	
nov-06	se		16098,958	-32,4%	679,406	-37,3%	no	3619,208	2,0%	271,415	4,7%	
ago-07	tipo 2		8354,965	-48,1%	410,633	-39,6%	no	3728,016	3,0%	284,836	4,9%	
dic-07	tipo 2		9705,361	16,2%	613,914	49,5%	no	3386,879	-9,2%	280,270	-1,6%	
mar-08	tipo 2	empiezan a empeorar,	20288,711	109,0%	991,471	61,5%	no	3113,303	-8,1%	261,118	-6,8%	lac
ago-08	tipo 2	empiezan a empeorar	34894,002	72,0%	1604,987	61,9%	no	2947,290	-5,3%	243,165	-6,9%	lac
ene-09	s/e		53371,793	53,0%	1497,122	-6,7%	si	2755,113	-6,5%	211,137	-13,2%	
mar-09	tipo 2-	sigue a empeorando	60850,327	14,0%	1763,495	17,8%	si	2600,693	-5,6%	188,597	-10,7%	↑ cho-lac
ago-09	s/e		69892,676	14,9%	2134,099	21,0%	si-difuso	2446,108	-5,9%	164,816	-12,6%	
feb-10	s/e	empieza a cruzar CC	81909,292	17,2%	2327,422	9,1%	si-difuso mas	2277,884	-6,9%	155,858	-5,4%	
abr-10	tipo2-3		96935,831	18,3%	2801,921	20,4%	si-mucho	2110,730	-7,3%	136,793	-12,2%	↓ Naa. ↑ Lac lip cho
jun-10	s/e		116657,238	20,3%	3405,666	21,5%	si-mucho	1938,960	-8,1%	119,108	-12,9%	
jul-10	s/e		141755,234	21,5%	4142,707	21,6%	si-mucho	1772,099	-8,6%	103,642	-13,0%	
oct-10	tipo 3-4	casi los dos hemisferios, radioterapia	166229,849	17,3%	5548,690	33,9%	si-mucho	1502,237	-15,2%	89,462	-13,7%	↑↑ cho lípidos



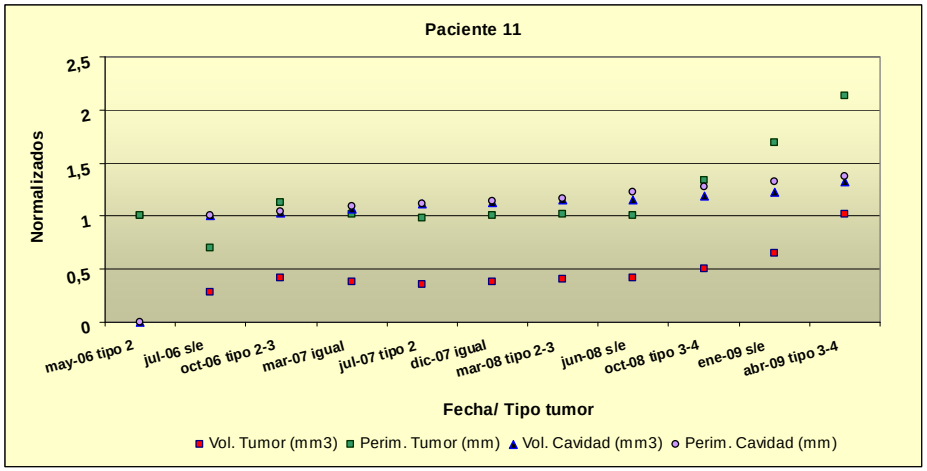


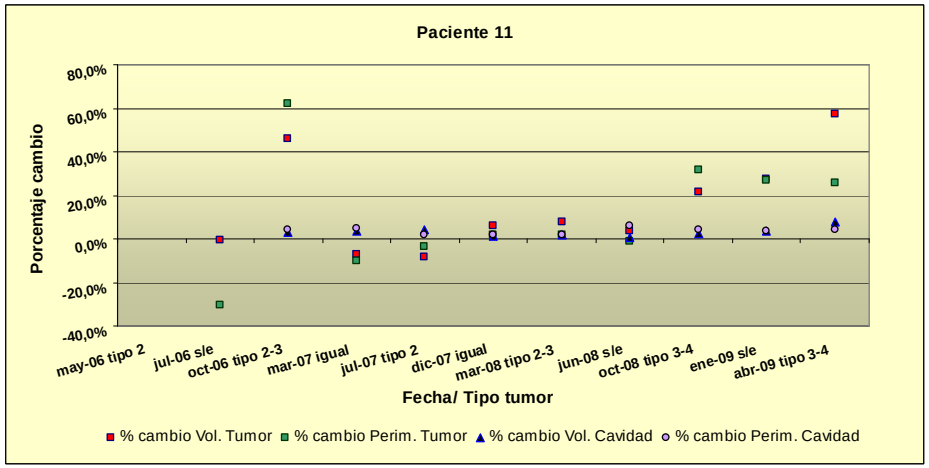
Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	**Tumor Perímetro mm**	**Cavidad Volumen mm^3**	**Cavidad Perímetro mm**
50182,593	1603,432	3279,164	240,767

Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
3%	100%	100%	100%	100%	90%	60%	
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
11	**39**	**11/05/2006**	**Frontal derecho**	**Oligodendroglioma**	**II**	**no del**	**no del**	**DMBT1 del**	**normal**	**normal**	**normal**	**No metilado**	**R132H**

Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
may-06	tipo 2	Nueronavegador	141665,174		2325,329		si					cruza CC-gly Lac
jul-06	s/e		40324,980	-0,71%	1619,885	-30,34%	no	35719,839		792,568		
oct-06	tipo 2-3		58848,214	45,93%	2628,422	62,26%	no	36808,241	3,05%	826,221	4,25%	↑ colina-gly-lactato, ↓ Cr
mar-07	igual		54635,846	-7,16%	2366,838	-9,95%	no	38125,612	3,58%	867,334	4,98%	
jul-07	tipo 2	se achica	50010,427	-8,47%	2279,630	-3,68%	no	39739,451	4,23%	883,313	1,84%	↓ gly-cho
dic-07	igual	empieza a crecer CC para atrás	52996,756	5,97%	2323,492	1,92%	no	40332,703	1,49%	900,309	1,92%	
mar-08	tipo 2-3		57245,493	8,02%	2371,854	2,08%	no	41141,069	2,00%	919,048	2,08%	↑ Cho
jun-08	s/e		59175,913	3,37%	2347,239	-1,04%	si	41355,142	0,52%	975,599	6,15%	
oct-08	tipo 3-4		71883,843	21,47%	3095,588	31,88%	si	42465,261	2,68%	1014,479	3,99%	lípidos-↑↑↑ colina
ene-09	s/e	mucho refuerzo	91718,015	27,59%	3936,054	27,15%		43929,886	3,45%	1048,908	3,39%	
abr-09	tipo 3-4		144225,989	57,25%	4950,625	25,78%		47335,402	7,75%	1092,109	4,12%	↑ lípidos-↑↑ colina



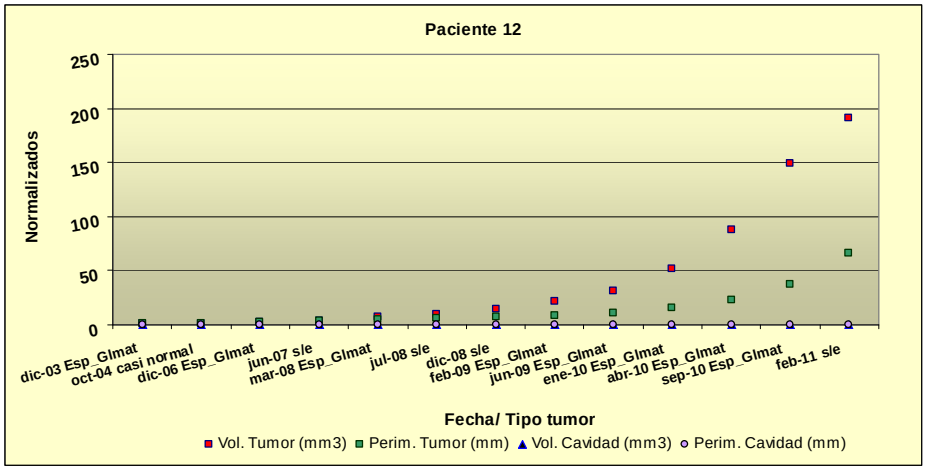


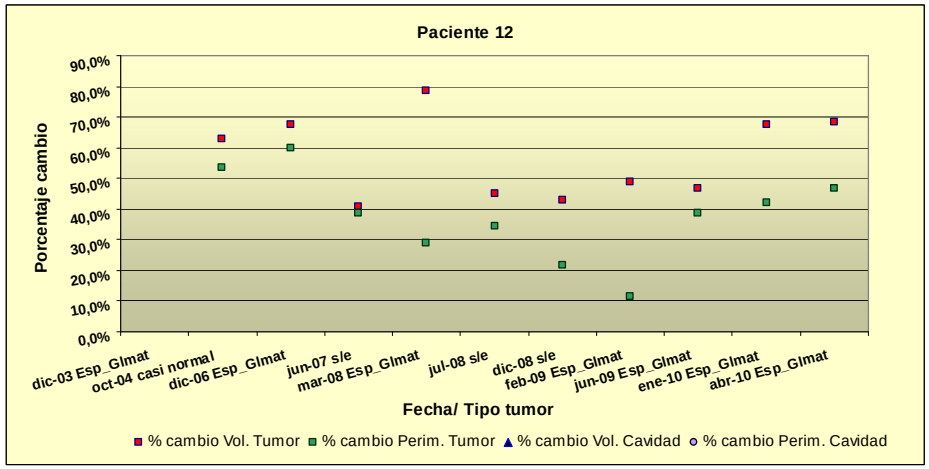
Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	**Tumor Perímetro mm**	**Cavidad Volumen mm^3**	**Cavidad Perímetro mm**
141665,174	2325,329	35719,839	792,568

Escala Karnofsky (KPS)								
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**	**Muerte**
7%	90%	90%	100%	90%	50%			15/11/2009
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años								

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
12	**47**	**01/02/2006**	**Parieto occip. Izq.**	**Oligodendroglioma**	**II**	**no del**	**no del**	**no del**	**normal**	**normal**	**normal**	**N/D**	**N/D**

Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
dic-03	espec gliomatosis		1008,973		87,936		no					
oct-04	casi normal		1641,867	62,73%	135,106	53,64%	no	punción				
dic-06	espec gliomatosis		2752,543	67,65%	215,869	59,78%	no					↑↑ Mio/gly
jun-07	s/e		3876,413	40,83%	298,848	38,44%	no					
mar-08	espec gliomatosis		6928,738	78,74%	384,887	28,79%	no					
jul-08	s/e		10042,115	44,93%	516,751	34,26%	no					
dic-08	s/e		14330,215	42,70%	629,553	21,83%	no					
feb-09	espec gliomatosis		21325,429	48,81%	700,785	11,31%	no					
jun-09	espec gliomatosis		31291,166	46,73%	972,290	38,74%	no					↓ Mio/Gly
ene-10	espec gliomatosis		52456,991	67,64%	1382,145	42,15%	si					
abr-10	espec gliomatosis		88300,393	68,33%	2025,548	46,55%	si					
sep-10	spec gliomatosis		150491,213	70,43%	3236,492	59,78%	si					
feb-11	s/e	casi todo hemisferio izq	192417,030	27,86%	5763,738	78,09%	si					



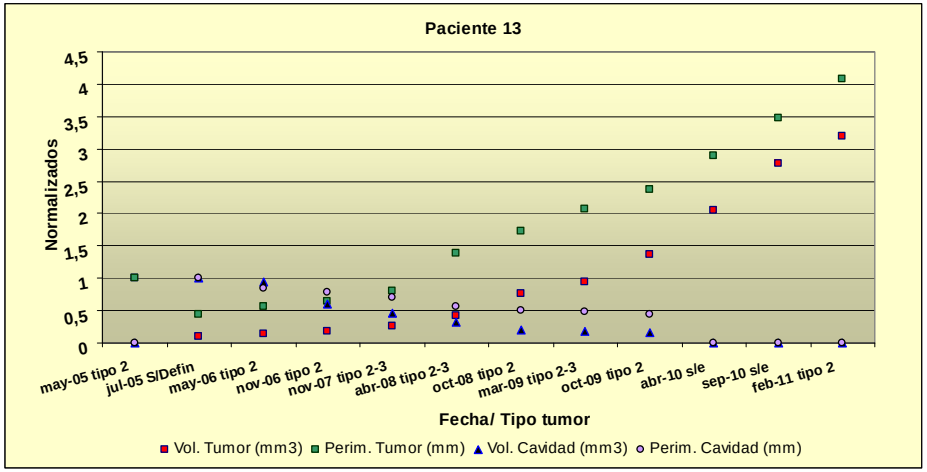


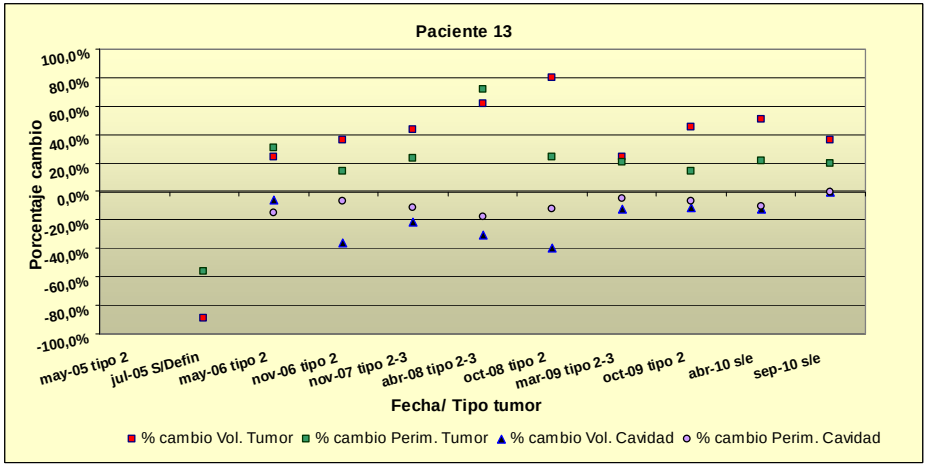
Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	**Tumor Perímetro mm**	**Cavidad Volumen mm^3**	**Cavidad Perímetro mm**
1008,973	87,936		

Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
2%	100%	100%	100%	100%	100%	80%	80%
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
13	**21**	**05/05/2005**	**Frontal der.**	**Oligodendroglioma**	**II**	**no del**	**no del**	**no del**	**normal**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**

Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
may-05	tipo 2	Neuronavegador	16838,849		300,716		no					
jul-05	no se puede definir	post cirugía	1811,796	-89,24%	132,053	-56,09%	no	961,267		88,469		
may-06	tipo 2		2243,509	23,83%	171,920	30,19%	no	904,005	-5,96%	75,115	-15,09%	gly-lac
nov-06	tipo 2		3050,703	35,98%	196,335	14,20%	no	578,752	-35,98%	69,781	-7,10%	
nov-07	tipo 2-3		4385,712	43,76%	242,311	23,42%	no	452,119	-21,88%	61,611	-11,71%	gly-lac-cho
abr-08	tipo 2-3		7088,385	61,62%	417,026	72,10%	no	312,811	-30,81%	50,505	-18,03%	gly-lac-cho
oct-08	tipo 2		12721,896	79,48%	516,911	23,95%	no	188,507	-39,74%	44,456	-11,98%	↓ gly-lac-cho
mar-09	tipo 2-3		15798,269	24,18%	625,181	20,95%	no	165,715	-12,09%	42,129	-5,24%	gly-lac-cho
oct-09	tipo 2		22909,144	45,01%	713,079	14,06%	no	147,068	-11,25%	39,167	-7,03%	lac-cho
abr-10	s/e		34528,653	50,72%	868,560	21,80%	no	128,420	-12,68%	34,897	-10,90%	
sep-10	s/e		46842,435	35,66%	1042,650	20,04%	no	no se resuelve		no se resuelve		
feb-11	tipo 2		53775,078	14,80%	1224,988	17,49%	no	no se resuelve		no se resuelve		



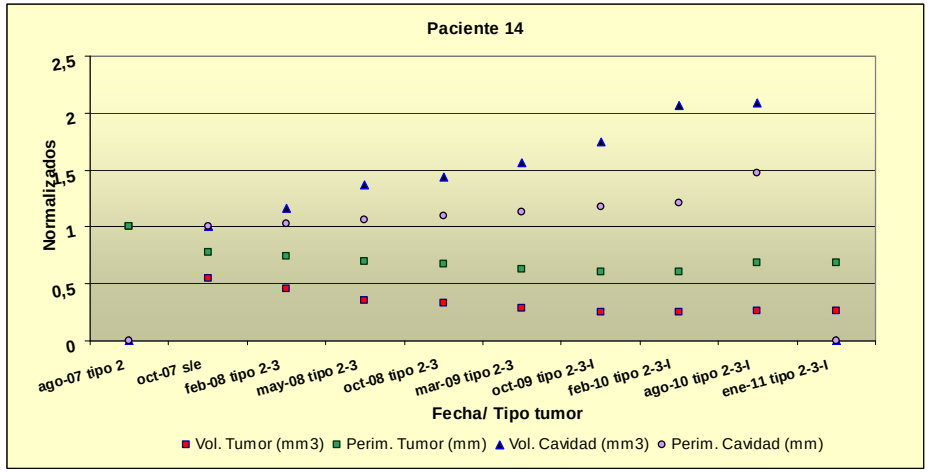


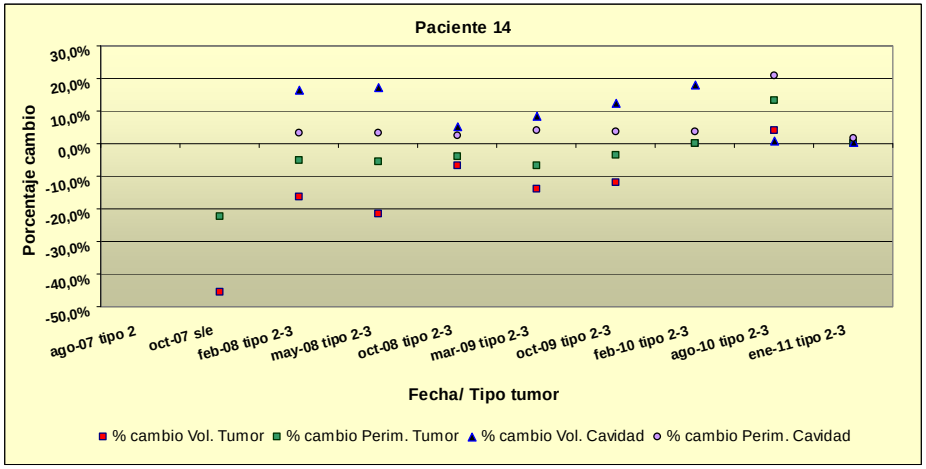
Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	**Tumor Perímetro mm**	**Cavidad Volumen mm^3**	**Cavidad Perímetro mm**
1811,796	132,053	961,267	88,469

Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
10%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
14	**38**	**22/08/2007**	**Frontal derecho**	**Oligodendroglioma**	**II**	**parcial**	**parcial**	**no del**	**normal**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**

Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
ago-07	tipo 2	neuronavegor	69061,559		1329,260		si, chico					
oct-07	s/e		37477,374	-45,73%	1034,026	-22,21%	si, chico	3632,995		156,366		
feb-08	tipo 2-3		31353,531	-16,34%	982,204	-5,01%	si, chico	4226,630	16,34%	161,067	3,01%	doble pico Lid
may-08	tipo 2-3		24580,912	-21,60%	927,267	-5,59%	si, chico	4957,020	17,28%	166,473	3,36%	doble pico Lid-cho elevada
oct-08	tipo 2-3		22920,765	-6,75%	890,073	-4,01%		5224,850	5,40%	170,479	2,41%	↓ cho-doble pico lip
mar-09	tipo 2-3		19703,930	-14,03%	830,898	-6,65%		5664,821	8,42%	177,280	3,99%	↓cho-doble pico lip
oct-09	tipo 2-3-igual		17319,537	-12,10%	800,347	-3,68%		6362,016	12,31%	183,425	3,47%	↓ cho-doble pico lip
feb-10	tipo 2-3-igual		17354,176	0,20%	801,947	0,20%		7508,141	18,02%	189,795	3,47%	↓ cho-doble pico lip_Mio
ago-10	tipo 2-3-igual		18080,824	4,19%	907,694	13,19%		7573,547	0,87%	229,628	20,99%	↓ cho-doble pico lip_Mio
ene-11	tipo 2-3-igual		18116,986	0,20%	909,056	0,15%		7590,209	0,22%	233,761	1,80%	↓-doble pico lip_Mio



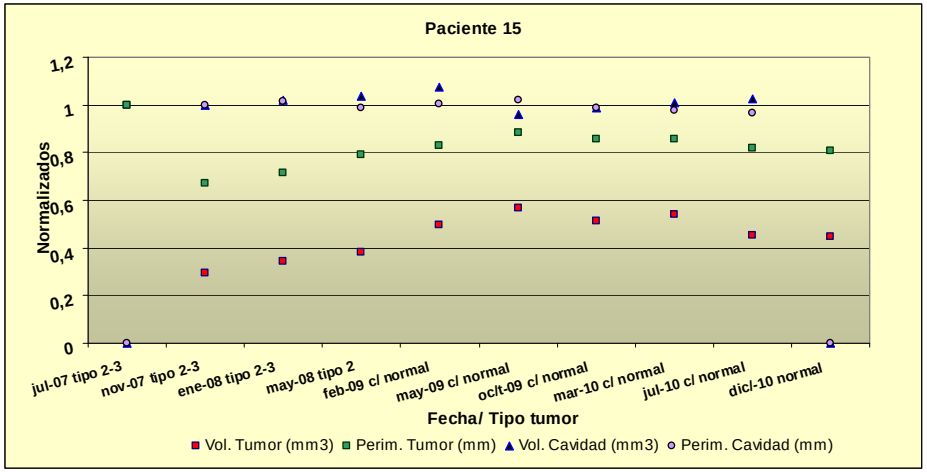


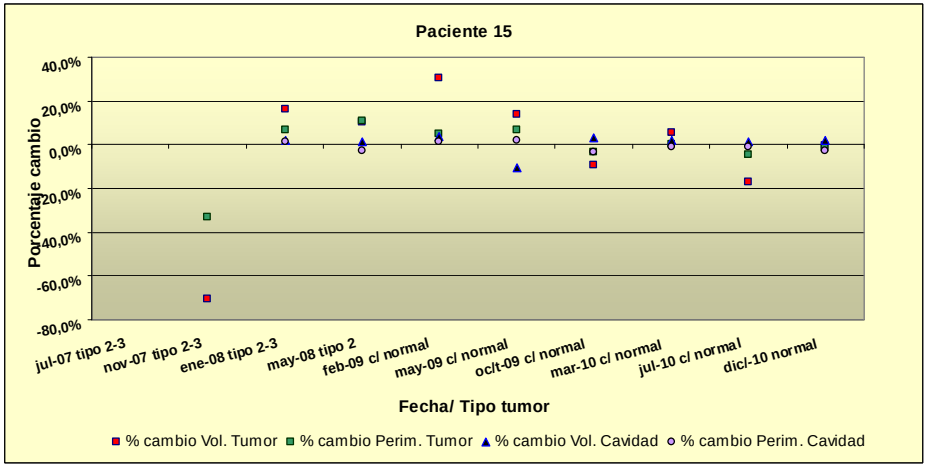
Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	**Tumor Perímetro mm**	**Cavidad Volumen mm^3**	**Cavidad Perímetro mm**
69061,559	1329,26	3632,995	156,366

Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
2%	70%	90%	100%	100%	100%		
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
15	**40**	**04/07/2007**	**Frontal derecho.**	**Mixto**	**II**	**no del**	**parcial**	**DMBT1 del**	**LOH**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**

Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
jul-07	tipo 2-3		37964,622		1013,758		no					colina-gly
nov-07	tipo 2-3	post-cirugía	11260,172	-70,34%	678,296	-33,09%	no	6010,757		191,319		
ene-08	tipo 2-3		13114,957	16,47%	722,314	6,49%	no	6134,519	2,06%	194,423	1,62%	colina-gly
may-08	tipo 2		14482,872	10,43%	799,496	10,69%	no	6214,499	1,30%	189,229	-2,67%	
feb-09	casi normal		18857,947	30,21%	839,353	4,99%	no	6449,164	3,78%	191,588	1,25%	
may-09	casi normal		21443,983	13,71%	897,819	6,97%	no	5773,676	-10,47%	195,401	1,99%	gly
oct-09	casi normal		19441,228	-9,34%	866,478	-3,49%	no	5944,008	2,95%	188,920	-3,32%	
mar-10	casi normal		20563,240	5,77%	869,236	0,32%	no	6074,772	2,20%	187,105	-0,96%	
jul-10	casi normal		17108,635	-16,80%	831,876	-4,30%	no	6164,464	1,48%	184,839	-1,21%	
dic-10	normal		17047,294	-0,36%	817,125	-1,77%	no	6298,571	2,18%	179,751	-2,75%	



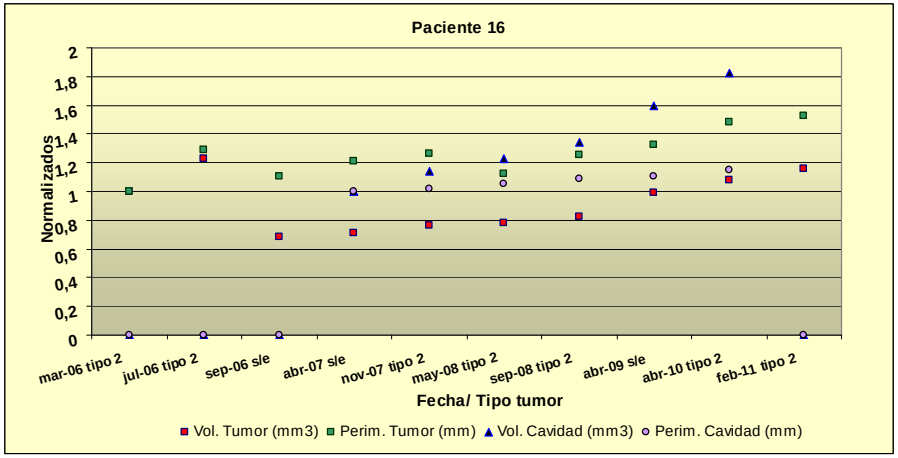


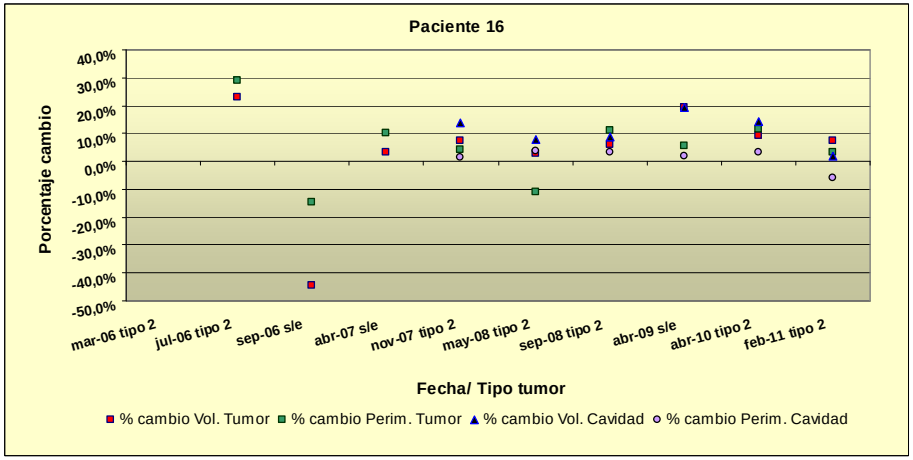
Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	**Tumor Perímetro mm**	**Cavidad Volumen mm^3**	**Cavidad Perímetro mm**
37477,374	1034,026	6010,757	191,319

Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
4%	80%	90%	90%	100%	100%		
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
16	**40**	**03/07/2006**	**Frontal Izquierda**	**Oligodendroglioma**	**II**	**del**	**no del**	**no del**	**normal**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**

Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
mar-06	tipo 2		19998,206		716,412		no					
jul-06	tipo 2	neuronavegor	24617,544	23,10%	923,905	28,96%	no					
sep-06	s/e		13681,331	-44,42%	789,887	-14,51%	no	no se llega a distinguir				
abr-07	s/e		14145,268	3,39%	869,574	10,09%	no	1556,530		92,112		
nov-07	tipo 2		15189,030	7,38%	906,511	4,25%	no	1774,753	14,02%	93,599	1,61%	lac
may-08	tipo 2		15639,760	2,97%	807,064	-10,97%	no	1916,476	7,99%	97,033	3,67%	
sep-08	tipo 2	mejoran	16551,386	5,83%	898,253	11,30%	no	2084,040	8,74%	100,322	3,39%	
abr-09	s/e		19750,841	19,33%	949,978	5,76%	no	2486,894	19,33%	102,055	1,73%	
abr-10	tipo 2		21617,506	9,45%	1059,673	11,55%	no	2839,451	14,18%	105,590	3,46%	
feb-11	tipo 2	empeora x la posición, crece sus gris super	23176,087	7,21%	1094,370	3,27%	no	2889,127	1,75%	99,329	-5,93%	↑cho-↓mio



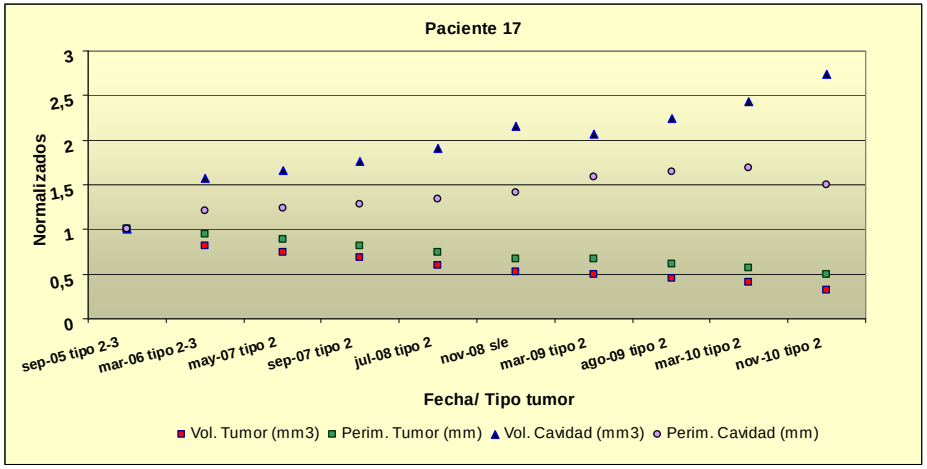


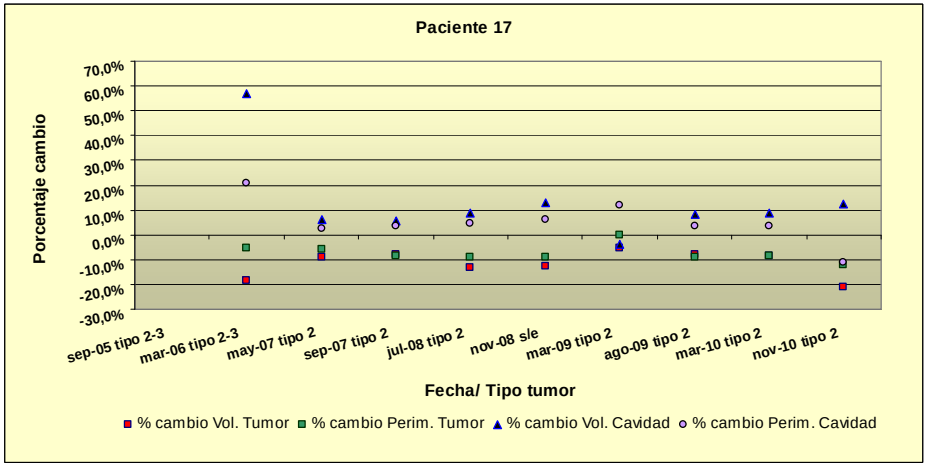
Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	**Tumor Perímetro mm**	**Cavidad Volumen mm^3**	**Cavidad Perímetro mm**
19998,206	716,412	1556,530	92,112

Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
2%	100%	100%	100%	100%	100%	90%	
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
17	**68**	**07/11/2005**	**Temporal izquierdo.**	**GBM 2rio. Oligo**	**IV**	**no del**	**no del**	**no del**	**normal**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**

Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
jul-03	tipo 2-3	post cirugía muy difuso-mala calidad imagen					no	44296,4905		872,2601		
may-04		imágenes perdidas					no					
abr-05		imágenes perdidas					no					
sep-05	tipo 2-3		88961,608		4058,450		no	11607,968		571,755		tiene gly-glux_cho
mar-06	tipo 2-3		72732,110	-18,24%	3836,941	-5,46%	no	18233,260	57,08%	689,159	20,53%	
may-07	tipo 2		66219,454	-8,95%	3618,421	-5,70%	no	19321,701	5,97%	704,858	2,28%	Gly/Mio
sep-07	tipo 2		60820,301	-8,15%	3308,759	-8,56%	no	20371,955	5,44%	728,987	3,42%	
jul-08	tipo 2		52749,792	-13,27%	3004,441	-9,20%	no	22174,116	8,85%	762,510	4,60%	Gly/Mio
nov-08	s/e		46039,721	-12,72%	2738,705	-8,84%	no	24994,789	12,72%	807,472	5,90%	
mar-09	tipo 2		43489,210	-5,54%	2741,562	0,10%	no	24077,598	-3,67%	903,903	11,94%	
ago-09	tipo 2		40016,386	-7,99%	2490,115	-9,17%		26000,311	7,99%	937,064	3,67%	
mar-10	tipo 2		36517,615	-8,74%	2279,098	-8,47%		28273,608	8,74%	968,828	3,39%	
nov-10	tipo 2		28770,157	-21,22%	1997,760	-12,34%		31711,524	12,16%	861,246	-11,10%	



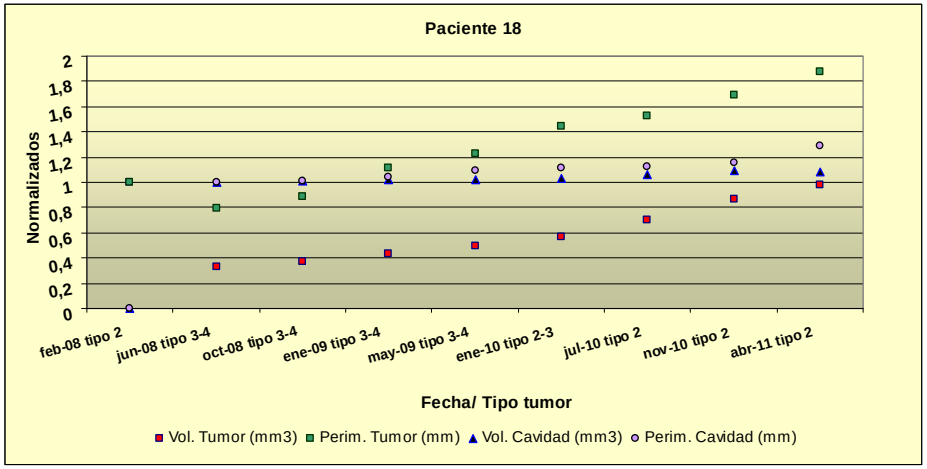


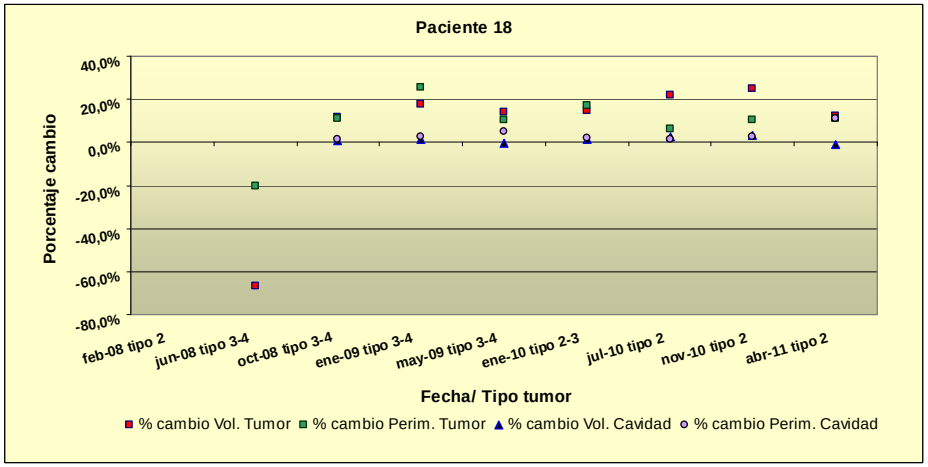
Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	**Tumor Perímetro mm**	**Cavidad Volumen mm^3**	**Cavidad Perímetro mm**
88961,608	4058,45	11607,968	571,755

Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
2%	60%	80%	80%	70%	80%	90%	80%
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
18	**52**	**12/02/2008**	**Frontal derecho**	**Oligodendroglioma**	**II**	**no del**	**no del**	**no del**	**LOH**	**normal**	**E5**	**Metilado**	**mut**

Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
feb-08	tipo 2		21573,879		590,967							gly-lac
jun-08	tipo 3-4	post	7187,593	-66,68%	471,236	-20,26%	si	2870,712		161,017		muchos lípidos
oct-08	tipo 3-4		8036,566	11,81%	523,930	11,18%	si-igual	2898,968	0,98%	162,968	1,21%	doble pico MM-lípidos
ene-09	tipo 3-4		9435,247	17,40%	657,042	25,41%	si-igual	2941,013	1,45%	167,453	2,75%	aumenta Cho
may-09	tipo 3-4		10757,552	14,01%	727,423	10,71%	si-igual	2929,182	-0,40%	175,638	4,89%	↓-doble pico MM
ene-10	tipo 2-3		12322,281	14,55%	852,108	17,14%	si-igual	2964,687	1,21%	178,900	1,86%	↓-doble pico MM
jul-10	tipo 2		15026,816	21,95%	902,598	5,93%		3046,024	2,74%	181,550	1,48%	
nov-10	tipo 2		18740,150	24,71%	996,689	10,42%		3140,114	3,09%	186,281	2,61%	
abr-11	tipo 2		21062,614	12,39%	1108,009	11,17%	no	3106,086	-1,08%	207,031	11,14%	



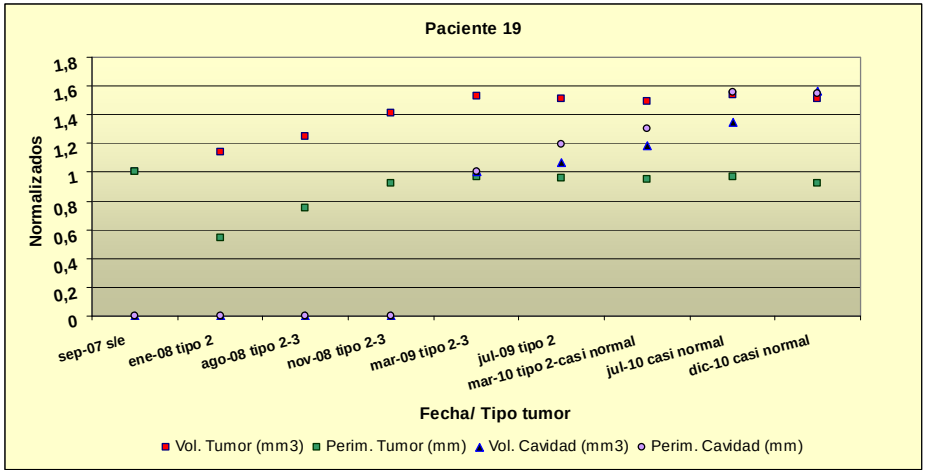


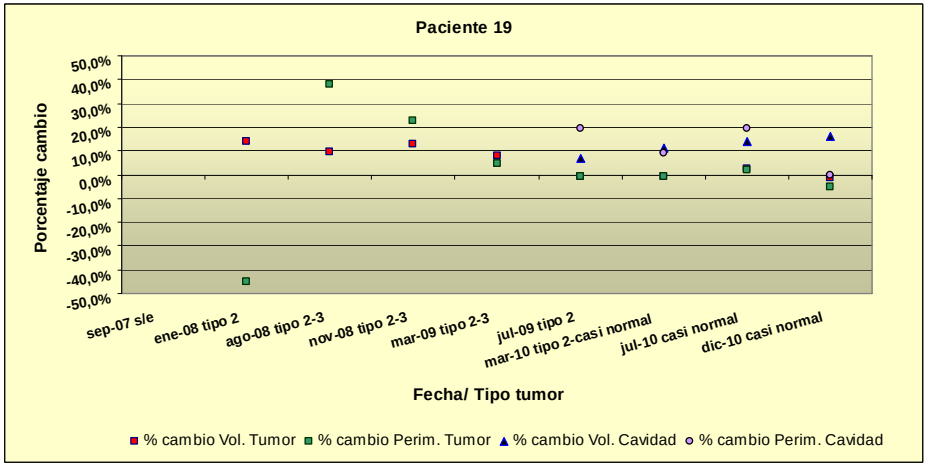
Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	**Tumor Perímetro mm**	**Cavidad Volumen mm^3**	**Cavidad Perímetro mm**
21573,879	590,967	2870,712	161,017

Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
4%	100%	90%	80%	90%			
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
19	**36**	**17/09/2007**	**Pre-rolándico izquierdo**	**Oligodendroglioma**	**II**	**no del**	**no del**	**ambas del**	**normal**	**normal**	**normal**	**Metilado**	**R132H**

Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
sep-07	s/e		11387,476		824,213		si					
ene-08	tipo 2		12971,772	13,91%	450,609	-45,33%	no	nada		nada		tiene lactato
ago-08	tipo 2-3		14217,158	9,60%	621,155	37,85%		nada		nada		doble pico lip-lactato
nov-08	tipo 2-3		16078,615	13,09%	762,907	22,82%		nada		nada		↑Naa--doble pico lip
mar-09	tipo 2-3		17385,711	8,13%	799,693	4,82%	no	1550,730		100,571		igual
jul-09	tipo 2		17211,854	-1,00%	791,696	-1,00%		1655,838	6,78%	120,045	19,36%	↓ cho,, ↑ Naa
mar-10	tipo 2-casi normal		17039,735	-1,00%	783,779	-1,00%		1837,502	10,97%	130,882	9,03%	↓cho, MM
jul-10	casi normal		17463,717	2,49%	799,693	2,03%		2094,557	13,99%	156,167	19,32%	igual
dic-10	casi normal		17224,183	-1,37%	757,860	-5,23%		2432,247	16,12%	155,325	-0,54%	MM -↓ Naa



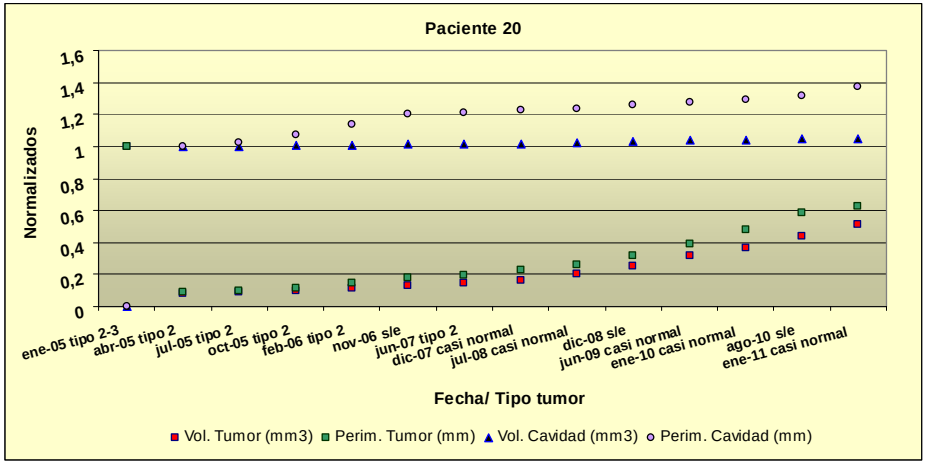


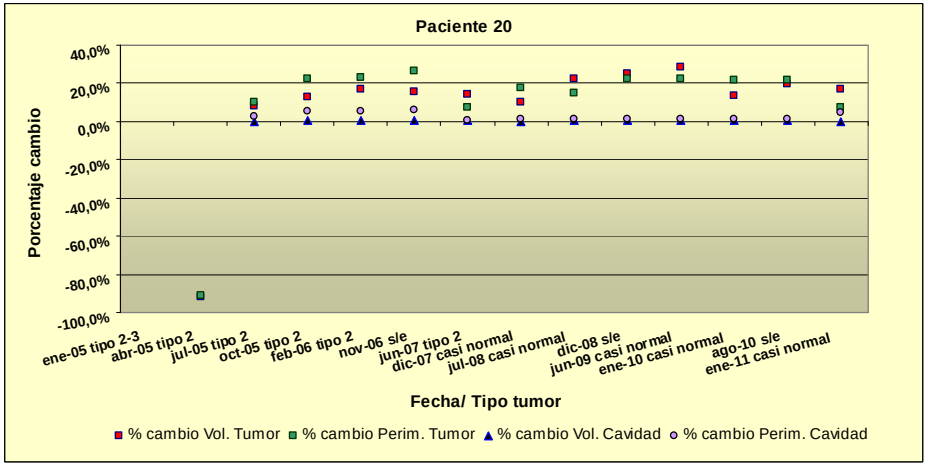
Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	**Tumor Perímetro mm**	**Cavidad Volumen mm^3**	**Cavidad Perímetro mm**
11387,476	824,213	1550,730	100,571

Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
2%	100%	90%	90%	90%	90%		
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

Paciente	edad	Fecha cirugía	Ubicación tumor	Anatomía Patológica	Grado	1p	19q	10q	CDKN2A	EGFR	p53	MGMT	IDH1
20	**42**	**06/01/2005**	**Frontal derecho.**	**Oligodendroglioma**	**II**	**no del**	**no del**	**no del**	**normal**	**normal**	**E5**	**Metilado**	**R132G**

Fecha	Espectro	Imagen	Tumor Volumen mm^3	% cambio	Tumor Perímetro mm	% cambio	Contraste	Cavidad Volumen mm^3	% cambio	Cavidad Perímetro mm	% cambio	Espectro
ene-05	tipo 2-3		32418,457		1527,754		no					pico alto colina
abr-05	tipo 2	post	2565,576	-92,09%	132,681	-91,32%	no	18023,629		387,509		
jul-05	tipo 2		2773,508	8,10%	145,738	9,84%	no	18057,714	0,19%	396,407	2,30%	**Mio**
oct-05	tipo 2		3122,750	12,59%	178,143	22,23%	no	18110,770	0,29%	416,973	5,19%	
feb-06	tipo 2		3649,335	16,86%	218,783	22,81%	no	18182,030	0,39%	439,169	5,32%	
nov-06	s/e		4208,378	15,32%	276,094	26,20%	no	18247,020	0,36%	466,012	6,11%	
jun-07	tipo 2		4817,502	14,47%	296,795	7,50%		18308,646	0,34%	468,458	0,52%	Mio
dic-07	casi normal		5299,719	10,01%	349,234	17,67%		18351,407	0,23%	474,252	1,24%	
jul-08	casi normal		6472,778	22,13%	400,021	14,54%		18446,186	0,52%	479,080	1,02%	
dic-08	s/e		8111,821	25,32%	488,046	22,01%		18576,973	0,71%	486,459	1,54%	
jun-09	casi normal		10398,039	28,18%	598,058	22,54%		18723,573	0,79%	494,135	1,58%	
ene-10	casi normal		11835,608	13,83%	728,215	21,76%		18796,054	0,39%	501,663	1,52%	
ago-10	s/e		14172,339	19,74%	887,279	21,84%	no	18899,960	0,55%	509,333	1,53%	
ene-11	casi normal		16561,133	16,86%	952,878	7,39%	no	18922,614	0,12%	532,993	4,65%	espectro casi normal





Valores de normalización			
Tumor Volumen mm^3	**Tumor Perímetro mm**	**Cavidad Volumen mm^3**	**Cavidad Perímetro mm**
12971,772	450,609	18023,629	387,509

Escala Karnofsky (KPS)							
Ki 67	**KFS Dx.**	**KFS 3m**	**KFS 1a.**	**KFS 2a.**	**KFS 3a.**	**KFS 4a.**	**KFS 5a.**
2%	100%	80%	100%	100%	100%	100%	100%
Dx: Diagnostico, **m**: meses, **a**:años							

VII.4 Análisis

Actualmente la caracterización anátomo patológica y genética de los tumores gliales que se realiza permite tipificar el tipo (y subtipo) del tumor, que está muy asociado con la evolución del mismo y la sobrevida del paciente. Sin embargo, esta categorización no es rigurosamente fiel en lo que respecta a la evolución del tumor.

En este marco es donde se asienta la idea de este trabajo, esto es, determinar si la ERM clínica brinda información adicional sobre la evolución de los tumores gliales.

En este trabajo se utilizaron solo dos parámetros para tipificar la evolución de los tumores, cambios en las imágenes como un parámetro del crecimiento (o disminución) del tumor, y la presencia de alguna región que contrasta, como parámetro de agresividad del tumor por rompimiento de la barrera hematoencefálica. Se consideró también el perfil genético del tumor siguiendo el modelo de agresividad elaborado por el Dpto. de Biología Molecular de Fleni[23].

No se consideraron otras técnicas de imágenes como las secuencias de perfusión y difusión. Los estudios de perfusión basados en imágenes T_2 que se realizan en tumores permiten estimar el volumen sanguíneo del tejido tumoral, que se relaciona directamente con la tasa de crecimiento y agresividad del mismo. Esta secuencia mostró ser muy importante en el estudio de la respuesta al tratamiento de tumores de alto grado (tipo III-IV)[24]. El estudio de difusión permite estimar la densidad celular de los tejidos. En tumores gliales, mayor densidad celular es un índice también de mayor agresividad[25-26].

En este análisis tampoco se considero el tratamiento farmacológico o de radioterapia al que fue sometido el paciente.

De los casos analizados y desde la perspectiva del paciente con un tumor glial, el comportamiento de los tumores individuales muestra una conducta que algunas veces no coincide con el comportamiento esperado que surge del análisis grupal de tumores (Cap III). Este hecho habilita a pensar en técnicas de imágenes y espectroscopia que permitan seguir y predecir la evolución de los mismos.

Así por ejemplo, el caso del paciente 1 (pag. 151 a 153), con un Oligodendroglioma (O) de grado II con un perfil genético de deleción 1p-19q, MGMT metilado, IDH1 mutado y bajo K-67, todos factores indicativos de un buen pronóstico, muestra un comportamiento agresivo, con espectros con un doble pico de MM que en ningún momento remite, con un descenso marcado del índice KFS. Luego el tumor empieza a crecer cruzando el cuerpo calloso con

espectros con alto nivel de Cho, MM y refuerzo. Comparado con un conjunto de tumores O de este trabajo (pacientes 9 (pag. 174 a 176), 13 al 20 (pag. 180 a 187), con no tan buenos perfiles genéticos donde existe un moderado aumento (a veces disminución) del volumen tumoral, sin refuerzo y con espectros que se mantienen estables, este tumor muestra un comportamiento inusual.

Del mismo modo otros tumores que no siguen la evolución que se esperaría por su perfil anátomo-genético son los pacientes 2 (pag. 154 a 156) y 3 (pag. 157 a 158), dos tumores mixtos (OA, grado III). En el caso de los pacientes 2 (Ki-67=2%) y 3 (Ki-67=10%) se observa que las imágenes se estabilizan en tamaño, no refuerzan y los espectros pasan de tener un patrón agresivo con Lip y Cho muy altos, a espectros tipo 2. Comparado con el paciente 4 (pag. 159 a 161) un OA grado III (Ki-67=2%), con un aparente mejor perfil molecular al tener la deleción 1p-19q y mutación IDH1, se ve claramente lo diferente del comportamiento ya que tiene un crecimiento muy rápido con aumento del refuerzo y espectros con un perfil tipo 2-3 con picos altos de Cho y Lip. Sin embargo no es posible definir por los espectros de feb-09 y jul-09 que en el próximo estudio el tumor iba a cambiar radicalmente su comportamiento, salvo por la aparente disminución del pico de Mio/Gly y el aumento del volumen de la lesión.

Dos casos interesantes de resaltar, porque muestran crudamente la evolución de un tumor de alto grado, así como la utilidad y limitación de la ERM clínica son los pacientes 5 (pag. 162 a 164) y 6 (pag. 165-167), que presentan dos tumores grado IV. En el caso del paciente 5 se observa una lesión temporal derecha que crece muy rápido, con los primeros espectros casi normales por efecto del volumen parcial. Sin embargo, en 4 meses, cuando la imagen todavía no define claramente la lesión del paciente y aun cuando el espectro de 30 ms tiene mucho artefacto (imposible de utilizar en una cuantificación, aún cualitativa) debido a la ubicación del voxel, se distingue la caída del Naa y el aumento de la Cho. Los espectros de 30 y 136 ms ya indican una posible lesión tumoral de alto grado por el tamaño del pico de Cho. En el siguiente estudio, la imagen y espectro claramente indican que la lesión es un tumor de grado IV. En este caso de un tumor de crecimiento rápido, el espectro de 30 ms, si bien de muy mala calidad e imposible de usar en una cuantificación de los metabolitos, fue predictivo cualitativamente de la evolución de la lesión. En el caso del paciente 6 se tiene un comportamiento similar, con espectros post-cirugía casi normales en imágenes que no muestran un gran tamaño de resto tumoral, pero el espectro del 03/2008 indica la presencia de tumor por los picos de Cho y Lip, que después se corroboró en las imágenes de los siguientes estudios. Estos dos estudios exponen también una limitación de la espectroscopia monovoxel,

la imposibilidad de poder medir en regiones muy corticales o con poco tejido, donde los espectros salen distorsionados y con artefactos.

El paciente 7 (pag. 168 a 170) es un caso relevante de la posible utilidad de la ERM en el seguimiento de los tumores gliales. Un O con un perfil genético no muy bueno, ya que solo tiene alterado el gen 10q, marcador de proliferación, pero en las imágenes y los espectros es un tumor estable. Por imágenes el tamaño de la lesión parecía desminuir un poco en cada estudio y los espectros son tipo 2, sin Cho ni Lip, moderada caída del Naa y un importante pico de Mio. Sin embargo, en el estudio de 01/2010, con una imagen similar a la de los estudios anteriores, el espectro muestra una clara disminución de Mio/Gly y en el estudio siguiente la imagen y el espectro mostró un cambio total en el perfil de agresividad del tumor. En el Capítulo VI el Mio elevado mostró ser un marcador de tumores de bajo grado. En la misma línea con los resultados del Capítulo VI, en el estudio del 05/2011 de este paciente en otro espectro es posible inferir la presencia de Gly (no se realizó el espectro con TE de 136 ms para confirmarlo) un marcador de tumores gliales de alto grado y Gluc/Tau (Fig. VII.3).

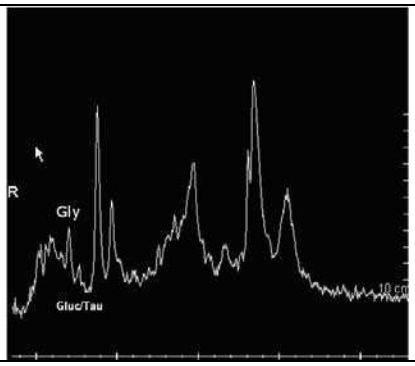


Figura VII.3: Espectro del paciente 7 del 06/2011 donde se observan dos picos, presumiblemente Gly y Gluc/Tau que no se observaban en los estudios previos.

Un patrón interesante de crecimiento del tumor, donde el tumor ocupa en la cavidad creada por la cirugía, se tiene con el paciente 8 (pag. 171 a 173) donde no existe un aumento importante del tejido tumoral no removido por la cirugía. En este paciente coexisten dos tipos de espectros distintos, tipo 2-3 del tejido tumoral ocupante de la cavidad con un elevado pico de Cho y un espectro tipo 1-2 en la región de tejido no operado. En los últimos estudios de este paciente, el tejido ocupante disminuye y el pico de Cho se reduce respecto a los estudios anteriores. Un comportamiento similar de crecimiento de tejido tumoral es el del paciente 13 (pag. 180), que muestra un patrón de crecimiento rápido, con espectros estables tipo 2-3 que se estabiliza en tipo 2 en los últimos estudios, donde el tumor ocupa la cavidad creada por la remoción del tumor, aunque es un O grado II. Quizás los altos valores de Ki-67=10% del paciente 13 y 14% del paciente 8 sea el origen de este comportamiento tan particular.

Claramente, donde resulta más trascendente predecir la evolución de un tumor, es en los tumores grado II-III, que son los que pueden malignizarse a grado IV. Es el caso de los pacientes 10 y 11 (pag. 177 y 178) que presentan tumores O grado II, ambos con deleción IDH1, con MGMT metilado y deleciones CDK2N (paciente 10) y 10q (paciente 11). En el caso del paciente 10 después de un período en que el tumor disminuye de tamaño y los espectros son tipo 2 el tumor comienza a crecer, aunque los espectros no reflejan en ese período una malignización del tumor, salvo por la presencia de anormal de Lac. Después los espectros cambian hasta llegar a ser del tipo 4, mientras el tumor sigue creciendo entre estudios. Sin embargo, con el paciente 11, el aumento del tamaño de la lesión, el refuerzo del tejido tumoral y la agresividad del espectro coinciden temporalmente. Estos dos casos de progresión no parecen mostrar un mismo patrón de comportamiento, imágenes y espectros pueden evolucionar de modo independientes.

Un caso de un tumor glial muy bien tipificado por imágenes y espectros es el del paciente 12 (pag 179) con una gliomatosis cerebri, con una tasa de crecimiento muy grande (entre 45% y 70%) entre estudios sucesivos (menos de 6 meses) y un espectro con disminución del pico de Cho y Naa, pero con un aumento en el pico de Cr que muestran un patrón que se podría confundir con un espectro normal por el bajo pico de Cho. En este caso las imágenes, junto con un espectro tan característico ayudan al diagnostico (Fig. VII.4).

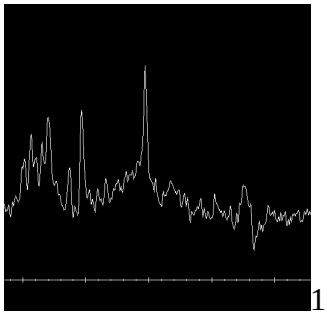
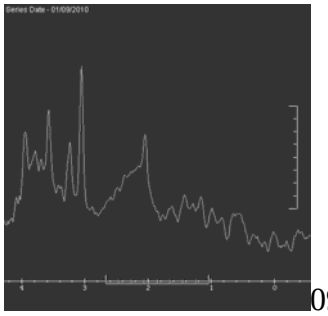

12/05/2003

09/01/2010

Figura VII.4. Espectros característicos de Gliomatosis Cerebri del paciente 12 con aumento de la Cr y Mio y disminución de Cho.

El resto de los tumores 14-20 (pag 181 a 187), todos Oligodendrogliomas con distintos perfiles genéticos, tienen un comportamiento estable, con espectros similares o mejorando entre estudios sucesivos, y con volúmenes de tumores aumentando con tasas bajas (menos de 20%) o en algunos casos disminuyendo, dos parámetros que resaltan su baja agresividad.

De estos estudios se puede inferir que el comportamiento de los tumores es bastante heterogéneo, no parece haber un parámetro definido en las imágenes o del espectro que notoriamente permita definir como va a evolucionar un tumor de grado II-III en el corto plazo y cuando va a empezar a tener un comportamiento agresivo post-cirugía. En el caso de los

tumores grado IV la evolución de los mismos siempre es muy agresiva en el corto plazo, siendo la etapa más temprana del tumor donde la ERM tiene mayor utilidad para remarcar la agresividad, antes de que se manifieste e invada el resto del tejido.

Sin embargo es posible afirmar, que se tiene un grupo con una evolución muy clara a la progresión, con aumento de la masa tumoral, aumento de la región que contrasta y/o espectros con un patrón de Cho y Lip altos, y por otro lado un grupo de tumores que crece más lentamente o se achica, con un patrón de espectro con una Cho no tan elevada o normal, una caída del Naa, sin Lip y un moderado aumento de MM y posiblemente Lac.

VII.5 Discusión

El primer tratamiento de la mayoría de los tumores gliales es la cirugía. El propósito es remover la máxima cantidad posible sin afectar regiones que discapaciten seriamente la calidad de vida del paciente. Sin embargo, por la característica difusa de estos tumores, la mayoría de las veces quedan restos de células tumorales imposibles de remover. Como se vio en el punto anterior de este capítulo, si bien no fue posible obtener claramente algún parámetro relevante de un espectro monovoxel de 30 ms que prediga la malignización de un tumor, hay patrones de espectros y metabolitos que ayudan a definir el estado de un tumor glial operado y su posible evolución. En el caso de los tumores gliales de grado II-III, donde la evolución de estos tumores puede ser larga, los espectros clínicos en un estudio longitudinal post-cirugía podrían ser de mucha utilidad. Sin embargo, la técnica de adquisición de espectros de tumores gliales post-cirugía en un estudio de este tipo cuenta actualmente con algunos problemas importantes a solucionar:

1- *Problema*: Poder realizar todos los estudios con los voxels en la misma ubicación anatómica sobre el tumor y con los mismos parámetros de adquisición..

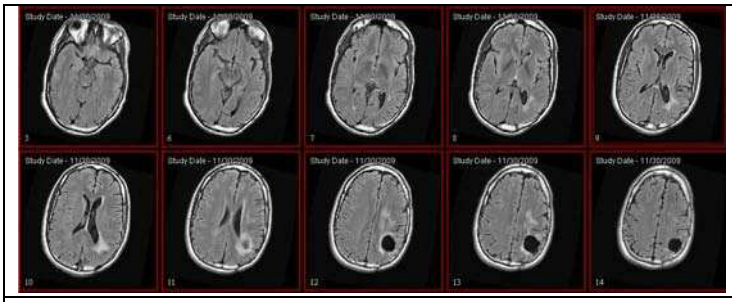
Esto permitiría hacer una comparación real de los espectros ya que los espectros serian reproducibles y los cambios serían realmente cambios metabólicos y no por cambios en la posición del voxel y/o homogeneización.

El realizar espectros longitudinales en un mismo paciente en exactamente la misma ubicación es el principal problema para realizar una comparación cuantitativa de los espectros. En la adquisición de los espectros en los resonadores GE usados en este trabajo, no es posible angular el voxel del espectro independientemente de la angulación de la imagen de referencia donde se ubica el voxel. Esto impone un límite muy grosero al posicionamiento del voxel sobre la lesión. Y si bien en los sucesivos estudios se busca siempre tener la misma

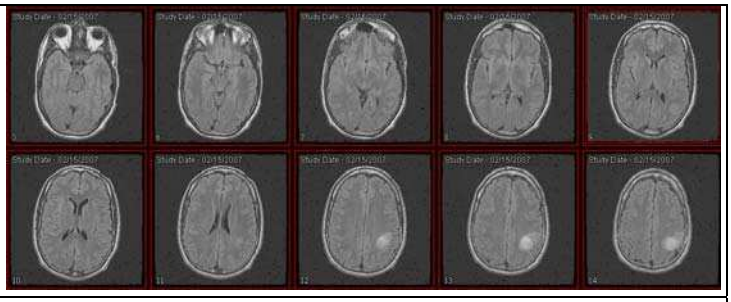
angulación en las imágenes anatómicas, este posicionamiento es manual y operador dependiente.

Así, modificaciones en la ubicación del voxel entre diferentes estudios implica, en el peor de los casos que se puede estar evaluando espectros con diferentes proporciones de tejido tumoral y “no tumoral” (volumen parcial), y aun sí el tumor es muy grande y el voxel abarca todo el tumor, la heterogeneidad de los tumores pueden mostrar un patrón de tumor distinto si los voxels están en distintas posiciones. Una complicación adicional es que la calibración del espectro puede variar por la cercanía a regiones que dificultan la homogeneidad del voxel, dando espectros que son difíciles de comparar (paciente 3-estudios feb-2011, paciente 7 jun-2010), aun de voxels en posiciones muy parecidas.

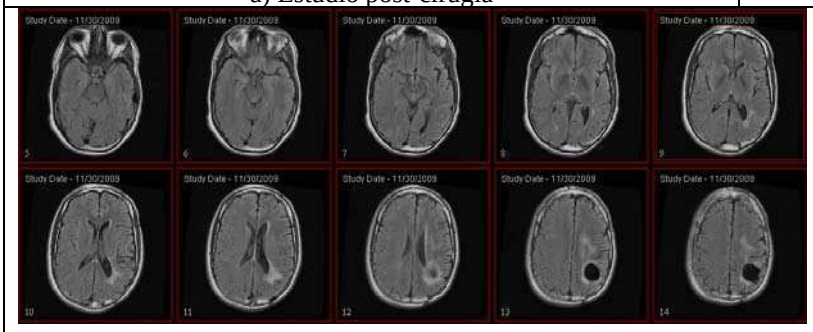
Es posible, en principio, repetir espectros en la misma ubicación en un estudio longitudinal con las actuales técnicas de corregistración de imágenes que se utilizan en algunos equipos de MRI. Por medio de la corregistración de imágenes, se consigue rotar y trasladar (y a veces deformar) una imagen o grupo de imágenes para que coincida anatómicamente con una imagen de referencia o patrón. Son varias las técnicas de corregistración utilizadas, algunas dependen de la región de cuerpo que se quiere corregistrar.



a) Estudio post-cirugía



b) Imágenes pre-cirugía



c) Imágenes post-cirugía corregistradas

Figura VII.4: Ejemplo de corregistración de a) un estudio de un paciente con tumor en parietal derecho operado con b) la imagen del mismo paciente previo a la cirugía. Se ve en c) como cambia la rotación de las imágenes y coinciden las orbitas oculares. La diferencia en los ventrículos se debe a una dilatación de los mismos por la cirugía y el tratamiento del tumor.

En el caso de cerebro y en particular sí se va a corregistrar a un paciente con él mismo en un estudio longitudinal, una corregistración con 6 grados de libertad es suficiente. La corregistración genera una matriz de rotación y traslación (matriz de 4x4, matriz de coregistración) de la imagen (Fig. VII.4).

En un estudio de espectroscopia monovoxel, el voxel queda identificado por el centro del voxel (3 coordenadas) y el tamaño del voxel (3 parámetros). Así, para repetir un espectro en la misma ubicación anatómica en estudios sucesivos, después de la corregistración de las imágenes con el estudio anterior, es posible inferir las nuevas coordenadas de la ubicación del voxel con la misma matriz de corregistración que se generó. En este caso solo se necesita las dos imágenes del paciente, la del estudio previo y la que se está adquiriendo y las coordenadas del voxel del espectro del estudio previo (Fig. VII.5).

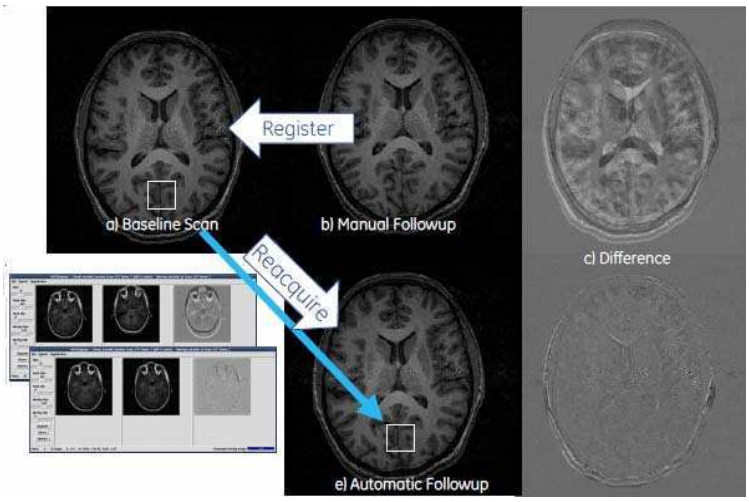


Figura VII.5: Diagrama de reubicación de un voxel después de la corregistración de las imágenes[27].

Solución: Se deben integrar programas de corregistración de imágenes y de ubicación de los voxel de espectroscopia en el resonador para realizar el espectro en exactamente la misma ubicación que los anteriores. Esto solo lo pueden hacer las empresas proveedoras los equipos de resonancia clínicos.

2- *Problema*: reconocer cual es la región mas agresiva del tumor, dada la heterogeneidad de algunos tumores gliales y tener en cuenta el problema de volumen parcial.

Claramente, cuando menos tumor se puede remover en una cirugía, es más probable que alguna de las células tumorales malignice y un tumor de grado II-III se transforme en un grado IV. Cuando más grande es el tumor se hace más difícil determinar la región más agresiva para ubicar el voxel del espectro. En los tumores más agresivos, el conjunto de imágenes anatómicas (T_1 con y sin Gd, T_2, FLAIR, GRE) y funcionales (difusión y perfusión) ayudan a definir la región mas representativa de la lesión. La captación de gadolinio y/o la perfusión aumentada o cambios de contraste que se ven en la secuencia

FLAIR o restricción de la difusión en el tumor son buenos marcadores de cambios celulares y por lo tanto de mayor agresividad.

Aun así, usando el conjunto de imágenes que se adquieren en un estudio de MRI en tumores, no siempre es posible asegurar que el voxel se posiciona en la región más representativa de la agresividad del tumor, y qué si progresa, lo hará allí. Entonces, en tumores agresivos donde la imagen cambia mucho entre estudios, el problema puede no ser el repetir el espectro en la misma ubicación, sino definir cual es la región mas agresiva del tumor que dará el espectro mas representativo del grado del tumor y que será la región que más cambiara entre estudios. En tumores de baja tasa de crecimiento, esta región suele mantenerse sin cambios importantes de las imágenes y espectros (paciente 2).

Solución: Es posible inferir en la mayoría de los tumores la región mas agresiva del mismo a partir de las imágenes anatómicas y funcionales. El mejor modo de estudiar en estos casos el tumor es realizar varios espectros cubriendo toda la lesión. El problema es que la duración del estudio se alarga 5-7 minutos por espectro adicional.

3- *Problema*: lograr la misma calidad (SNR y FWHW) de espectro en todos los estudios para poder comparar espectros y realizar cuantificaciones de concentración de metabolitos.

El querer realizar un análisis cuantitativo[28-29-30] de los espectros tiene un problema adicional que es el de comparar cuantificaciones de espectros de calidad similares. Aun espectros con el voxel en ubicaciones idénticas, pueden tener distinta calidad por el proceso de homogeneización y cancelación del agua que el resonador realiza automáticamente previo a una adquisición. Como la calidad del espectro depende marcadamente de la homogeneización de campo magnético dentro del voxel (ancho de los picos), aun “voxels” en la misma posición anatómica pueden tener distinta homogeneización debido a la distinta angulación del voxel respecto a los gradientes del resonador.

Solución: Una posible solución a este problema es ver el espectro al mismo tiempo que se lo está adquiriendo. Esto permitiría evaluar la calidad del mismo antes de completar toda la adquisición (5-7 minutos) y cancelarlo si no es buena. Por otro lado es posible y existen técnicas para intentar posicionar al paciente con la cabeza en la misma posición en el resonador para intentar reproducir la misma homogeneización[31]. Al igual que con la registración de imágenes, depende el proveedor de los equipos el poder ir viendo el espectro al mismo tiempo que se adquiere. De no ser buena la homogeneización (y la SNR) del espectro, se podría realizar un homogeneización más fina o manual.

Del análisis realizado en este trabajo con tumores gliales, es claro que no es posible inferir precisamente como evolucionará (como individuo) un tumor glial de grado II-III caracterizado anátomo-genéticamente y seguido por imágenes y espectros, si bien analizados por grupos tienen un comportamiento estadístico diferenciado. Sin embargo, resulta evidente que la ERM, junto con las imágenes definen cuando estas lesiones mejoran o empeoran por el tratamiento. Es claro que quizás falta considerar algunos parámetros importantes para caracterizar completamente la evolución de estos tumores. De estos resultados también es posible inferir que poder repetir la misma ubicación y homogeneidad en un estudio de espectros monovoxel longitudinal es el paso previo fundamental para realizar un análisis cuantitativo de ERM en tumores y tener certeza de las conclusiones que se obtengan.

Desde el punto de vista de las imágenes, análisis más detallados y cuantitativos (no solo cualitativos) de imágenes convencionales midiendo parámetros de relajación de tejidos[32], comparación de mediciones funcionales como la perfusion y difusión mejorarían esta estimación. Sin embargo, implementar estas comparaciones implica una complejidad importante, ya que se debe conseguir tener calibraciones constantes del resonador y las bobinas, repetitividad en las adquisiciones, corregistración de imágenes, cuantificación de parámetros con programas especiales y comparación voxel a voxel de todas estas adquisiciones.

También es importante resaltar que un análisis completo de la evolución por MRI y espectroscopia de un grupo de tumores gliales debería tener en cuenta el tratamiento al que estuvo sometido el paciente. En particular sería relevante conocer bien el tratamiento de radioterapia[33] que se les realiza a los tumores mas agresivos, ya que es un tratamiento localizado sobre el tumor y la dosis de radiación recibida depende de la planificación y de la ubicación del tumor y no suele ser homogénea sobre el todo el tumor, a diferencia de la quimioterapia que al ser inyectable en el organismo es sistémica. El porque un tumor crece o no y por donde crece, y los cambios en el espectro deben estar relacionados con la citogenética del tumor y con el tratamiento[34-35]. Es posible realizar un seguimiento de este tipo fusionando las curvas de isodosis con las imágenes de resonancia[36-37] (Fig. VII.6), lo que junto con técnicas de corregistración de imágenes permitirían hacer un seguimiento relacionado la evolución del tumor con el tratamiento.

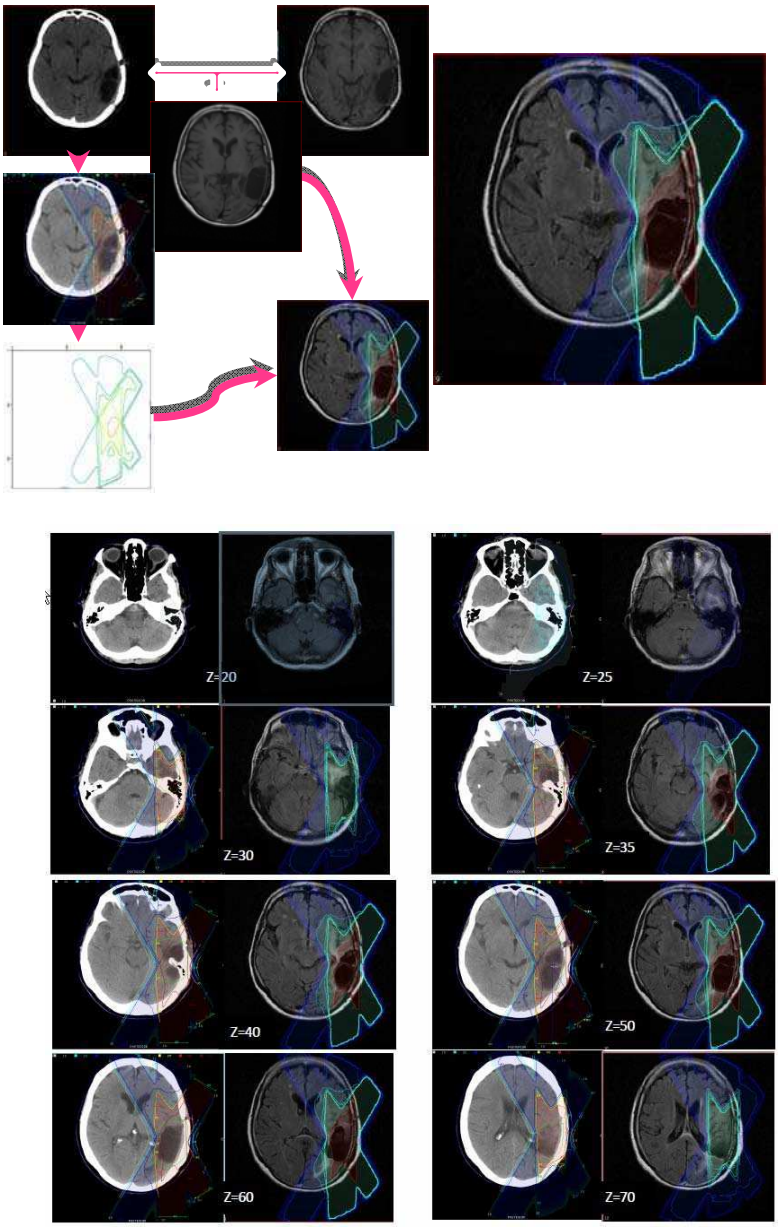


Figura VII.6: Arriba) Pasos sucesivos de registración de imágenes y curvas de isodosis para llegar a la registración MRI/Isodosis. Las imágenes de tomografía son las usadas para planear el tratamiento de radioterapia. Abajo) Curvas de isodosis de radioterapia planificadas en las imágenes de tomografía computada de un tumor post-cirugía (izq) y las mismas curvas en imágenes de MRI después de corregistrar las mismas a las imágenes tomográficas (de ref 43).

VII.6 Conclusiones

Las imágenes de MRI en tumores cerebrales son una herramienta imprescindible en el seguimiento de los mismos post-cirugía. Dado que la remoción total de los mismos es, la mayoría de las veces difícil, conocer el tamaño y la evolución post-cirugía es relevante para conocer su progreso y respuesta al tratamiento. Esto es casi axiomático para los tumores gliales, donde la clasificación anátomo-molecular permite definir grupos tumorales con comportamientos claros de respuesta al tratamiento y evolución. Sin embargo, visto cada

paciente individualmente, independientemente del grupo tumoral al que pertenecen, el comportamiento de estos tumores no es siempre el mismo, en particular en el caso de los tumores grado II-III[38]. Es así entonces que la MRI de tumores gliales post-cirugía es quizás la mejor técnica no invasiva para conocer la evolución de esta patología.

En este marco, este trabajo muestra que la ERM de ^{1}H es una secuencia mas dentro del conjunto de secuencias que se realizan en un estudio de MRI, que agrega información adicional a las imágenes anatómicas, las más de las veces coherentes con lo que se ve en las imágenes, pero no forzosamente predictivas de posibles cambios que ocurrirán en las lesiones. Crecimiento lento o disminución de la lesión y espectros con bajo niveles de Cho y Lip son un buena indicación de una lesión “estable”, pero no es posible predecir si en el próximo estudio el tumor mostrara signos de malignización. Claramente, si un espectro empieza a mostrar un patrón normal, es un buen indicador de un tumor que responde al tratamiento. Como se ve en este trabajo, espectros con niveles altos de Cho y Lip y caída de Naa, indicativo de un tumor agresivo modifican este patrón de espectro por uno menos agresivo.

Al analizarse los espectros de TE de 30 ms de un modo cualitativo, los parámetros de comparación son pocos, donde los picos mas fáciles de detectar a primera vista como la Cho, MM, Lip y Naa, y Cr son los referentes. Picos como Glux, Gly y Mio son más difíciles de estimar y comparar porque cambios en la calidad del espectro los modifican marcadamente, perdiéndose información que podría ayudar en predecir evolución.

Mejoras en la adquisición de los espectros como corregistración de imágenes para adquirir espectros de la misma ubicación y por lo tanto comparables, adquirir dos TE distintos para caracterizar Mio y Gly, así como ver los espectros “en línea” en el momento de la adquisición para asegurar una buena calidad, permitiría con los programas de cuantificación existentes mejorar la utilidad de la ERM en el estudio de la evolución de tumores gliales. Son los estudios funcionales como la espectroscopia, los distintos estudios de perfusion y difusión los que aplicados de un modo repetitivo y confiable, ayudarán al seguimiento en los futuros tratamientos de estos tumores.

Referencias

[1] Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K. **WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System**, Fourth Edition

[2] Robertson, Thomas; Koszyca, Barbara, Gonzales, Michae **Overview and recent advances in neuropathology. Part 1: Central nervous system tumours** *Pathology*: Feb Volume 43 - Issue 2 - p 88–92 2011

[3.] van den Bent MJ. **Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective**. *Acta Neuropathol.* Sep;120(3):297-304. 2010

[4] Mark Bernstein Mitchell Berger **Neuro-oncology: The Essentials** Thieme 2da ed 2008

[5] Nicholas A. Butowski, Patricia K. Sneed, Susan M. Chang **Diagnosis and Treatment of Recurrent High-Grade Astrocytoma** *Journal of clinical oncology* March 10 1273-80 (2006)

[6] Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. **Grading of astrocytomas: a simple and reproducible method**. *Cancer.* 1988;62:2152–2165.

[7] Martin-Villalba A, Okuducu AF, von Deimling A. **The evolution of our understanding on glioma.** Brain Pathol. Jul;18(3):455-63 2008

[8] Erridge SC, Hart MG, Kerr GR, Smith C, McNamara S, Grant R, Gregor A, Whittle IR **l. Trends in classification, referral and treatment and the effect on outcome of patients with glioma: a 20 year cohort** *J Neuroonco* Mar 8. 2011

[9] Matsusue E, Fink JR, Rockhill JK, Ogawa T, Maravilla KR **Distinction between glioma progression and post-radiation change by combined physiologic MR imaging** . *Neuroradiology*. Apr 52(4):297-306; (2010).

[10] T Nakajima, T Kumabe, M Kanamori, R Saito, M Tsshiro, M Watanabe, T Tominaga **Differential Diagnosis Between Radiation Necrosis and Glioma Progression Using Sequential Proton Magnetic Resonance Spectroscopy and Methionine Positron Emission Tomography** *Neurologia medico-chirurgica*, Vol. 49 No. 9 394-401 (2009)

[11] Tsien C, Galbán CJ, Chenevert TL, Johnson TD, Hamstra DA, Sundgren PC, Junck L, Meyer CR, Rehemtulla A, Lawrence T, Ross BD. **Parametric response map as an imaging biomarker to distinguish progression from pseudoprogression in high-grade glioma**. *J Clin Oncol*. May 1;28(13):2293-9 (2010)

[12] Hamstra DA, Chenevert TL, Moffat BA, Johnson TD, Meyer CR, Mukherji SK, Quint DJ, Gebarski SS, Fan X, Tsien CI, Lawrence TS, Junck L, Rehemtulla A, Ross BD. **Evaluation of the functional diffusion map as an early biomarker of time-to-progression and overall survival in high-grade glioma** *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 15;102(46):16759-64 (2005).

[13] Guilloton L, Cotton F, Cartalat-Carel S, Jouanneau E, Frappaz D, Honnorat J, Guyotat J..**Supervision of low-grade gliomas with multiparametric MR imaging: research of radiologic indicators of malignancy transformation**. *Neurochirurgie* Aug;54(4):517-28 (2008)

[14] Jenkinson MD, Du Plessis DG, Walker C, Smith TS. Advanced **MRI in the management of adult gliomas**. Br *J Neurosurg.* Dec;21(6):550-61 (2007)

[15] 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, Cabañas ME, Simonetti AW, Gajewicz W, **Calvar J**, Capdevila A, Wilkins PR, Bell BA, Rémy C, Heerschap A, Watson D, Griffiths JR, Arús C **Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra**.. *NMR Biomed.* Jun;19(4):411-34 (2006)

[16] F A. Howe, K S. Opstad **^{1}H MR spectroscopy of brain tumours and masses** *NMR Biomed.*;**16**:123–131 (2003)

[17] K. S. Opstad **Quantification and Pattern Recognition of 1H Magnetic Resonance Brain Tumour Spectra for Automated Classification** Capítulo 6 PhD Thesis Department of Basic Medical Sciences St. George's Hospital Medical School University of London April 2004

[18] Howe FA, Barton SJ, Cudlip SA, Stubbs M, Saunders DE, Murphy M, et al. **Metabolic profiles of human brain tumors using quantitative in vivo 1H magnetic resonancespectroscopy**. Magn Reson Med 2003;49:223–32

[19] Fuster-Garcia E, Navarro C, Vicente J, Tortajada S, García-Gómez JM, Sáez C, **Calvar J**, Griffiths J, Julià-Sapé M, Howe FA, Pujol J, Peet AC, Heerschap A, Moreno-Torres A, Martínez-Bisbal MC, Martínez-Granados B, Wesseling P, Semmler W, Capellades J, Majós C, Alberich-Bayarri A, Capdevila A, Monleón D, Martí-Bonmatí L, Arús C, Celda B, Robles **Compatibility between 3T 1H SV-MRS data and automatic brain tumour diagnosis support systems based on databases of 1.5T 1H SV-MRS spectra**. *MAGMA*. Feb 24(1):35-42 (2011).

[20] http://mipav.cit.nih.gov/

[21] Minati L, Aquino D, Bruzzone MG, Erbetta A. **Quantitation of normal metabolite concentrations in six brain regions by in-vivoH-MR spectroscopy.***J Med Phys*. Jul;35(3):154-63. (2010)

[22] Preusser M, Hoeftberger R, Woehrer A, Gelpi E, Kouwenhoven M, Kros JM, Sanson M, Idbaih A, Brandes AA, Heinzl H, Gorlia T, Hainfellner JA, van den Bent M. **Prognostic value of Ki67 index in anaplastic oligodendroglial tumours - a translational study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group**. *Histopathology*. 2012 Feb 15. 2559.

[23] Ferrer-Luna R, Mata M, Núñez L, Calvar J, Dasí F, Arias E, Piquer J, Cerdá-Nicolás M, Taratuto AL, Sevlever G, Celda B, **Martinetto H**. **Loss of heterozygosity at 1p-19q induces a global change in oligodendroglial tumor gene expression**. *J Neurooncol*. 2009 Dec;95(3):343-54.

[24] Hirai T, Murakami R, Nakamura H, Kitajima M, Fukuoka H, Sasao A, Akter M, Hayashida Y, Toya R, Oya N, Awai K, Iyama K, Kuratsu JI, Yamashita Y. **Prognostic value of perfusion MR imaging of high-grade astrocytomas: long-term follow-up study**.*AJNR Am J Neuroradiol*. Sep;29(8):1505-10 (2008)

[25]. Al Sayyari A, Buckley R, McHenery C, Pannek K, Coulthard A, Rose S. **Distinguishing recurrent primary brain tumor from radiation injury: a preliminary study using a susceptibility-weighted MR imaging-guided apparent diffusion coefficient analysis strategy** *AJNR Am J Neuroradiol*. Jun;31(6):1049-54 (2010).

[26] Hu X, Wong KK, Young GS, Guo L, Wong ST. **J Support vector machine multiparametric MRI identification of pseudoprogression from tumor recurrence in patients with resected glioblastoma**. *Magn Reson Imaging.* Feb;33(2):296-305 (2011).

[27] Il. Hancu,* D. J. Blezek1, M.C Dumoulin **Automatic repositioning of single voxels in longitudinal 1H MRS studies**. *NMR Biomed*.;18:352–361 (2005)

[28] *www.mrui.uab.es/mrui/*

[29] AQSES http://homes.esat.kuleuven.be/~biomed/software.php

[30] *s-provencher.com/pages/**lcmodel**.shtml*

[31] Else Rubaek Danielsen, Brian Ross **Magnetic resonance spectroscopy diagnosis of neurological diseases** CRC Press 1999

[32] Paul Tofts **Quantitative MR I of the B r ain: Measuring Changes Caused by Disease**. John Wiley & Sons, 2003

[33] Nelson SJ, Graves E, Pirzkall A, Li X, Antiniw Chan A, Vigneron DB, McKnight TR **In vivo molecular imaging for planning radiation therapy of gliomas: an application of 1H MRSI**.. *J Magn Reson Imaging.* 2002 Oct;16(4):464-76.

[34] Brandsma D, van den Bent MJ **Pseudoprogression and pseudoresponse in the treatment of gliomas.** Curr Opin Neurol. 2009 Dec;22(6):633-8.

[35] Easaw JC, Mason WP, Perry J, Laperrière N, Eisenstat DD, Del Maestro R, Bélanger K, Fulton D, Macdonald D; for the Canadian Glioblastoma Recommendations Committee. **Canadian recommendations for the treatment of recurrent or progressive glioblastoma multiforme** Curr Oncol. 2011 Jun;18(3):e126-e136.

[36] Figueroa Daiana **Desarrollo de un protocolo de seguimiento de pacientes con tumores primarios y secundarios de cerebro: análisis de viabilidad utilizando imágenes de resonancia magnética luego de la radio y/o quimioterapia** Tesis de Licenciatura en Física Médica- *Universidad Nacional De San Martín Escuela De Ciencia Y Tecnología Septiembre 2011*

[37] Sarah J. Nelson **Assessment of therapeutic response and treatment planning for brain tumors using metabolic and physiological MRI** NMR in Biomedicine. Volume 24, Issue 6, 734–749, July 2011

[38] Frazier JL, Johnson MW, Burger PC, Weingart JD, Quinones-Hinojosa A **Rapid malignant transformation of low-grade astrocytomas: report of 2 cases and review of the literature**. World Neurosurg. 2010 Jan;73(1):53-62

Conclusiones

Este trabajo permitió estudiar, con una misma técnica de análisis como la espectroscopia por RMN, a dos “escalas” de resolución distintas (in-vivo e in-vitro) y con equipos de resonancia magnética accesibles en nuestra región, los distintos metabolitos presentes en los tumores de origen glial y relacionarlos con los diferentes grados de agresividad. Para esto en un principio se analizan las técnicas de adquisición y de procesamiento con el ánimo de realizar clasificadores para los distintos tipos/subtipos de tumores y efectuar comparaciones longitudinales para estudiar la evolución de los mismos.

Para el análisis de los datos se utilizó no solo la clasificación anátomo-patológica de los tumores sino que se agregaron distintos clasificadores genético-moleculares que permiten una mejor diferenciación de la lesión según su respuesta al tratamiento y sobrevida.

Las principales conclusiones que surgen de este trabajo son:

1- Al realizar espectros clínicos de ^{1}H de tumores cerebrales gliales, una de los lesiones cerebrales mas variable en ubicación y tamaño, es posible inferir, del espectro que se adquiere sin cancelar el agua, la cantidad mínima de adquisiciones necesarias para obtener un espectro de TE=30 ms. cuantificable cuantitativamente si se utiliza Quest como programa de cuantificación. Esto permite optimizar los tiempos de adquisición y obtener espectros clínicos comparables. Cualitativamente un espectro clínico de ^{1}H se define en las primeras 72-96 adquisiciones.

2- Si bien HR-MAS es actualmente la técnica mayoritariamente elegida para el estudio metabolómico de tejidos por RMN ya que no destruye la muestra y casi no requiere preparación y/o separación de material de la misma aquí demostramos que es posible obtener espectros de RMN de buena calidad de tumores gliales en equipos de alto campo de que no cuentan con la facilidad de HR-MAS. Esto a partir de un método simple de preparación de la muestra que consiste en una “homogeneización” manual y un centrifugado.

3- De los dos métodos de cuantificación cuantitativos de espectros de alto campo utilizados en esta tesis, Quest es el mejor ya que simplifica el análisis de los datos al dar resultados de metabolitos y no de picos, estima concentraciones separadas de

metabolitos que se superponen y logra estimar las concentraciones de resonancias “anchas” como Lípidos (Lip) y Macromoléculas (MM).

4- Los espectros de alto campo de las muestras “liquidas” de los tumores gliales permiten realizar clasificaciones que coinciden con resultados de HR-MAS de otros trabajos. En particular, concentraciones elevadas de Mio parecen ser un marcador de mutación IDH1 (por lo tanto menor agresividad) y la Gly elevada sería un predictor de mayor agresividad. También existe un patrón en el cual, al aumentar el grado de agresividad de un tumor, la concentración de H-Tau, Gly, PCho, Glu, Gln y distintos tipos de Lip`s aumenta y el Mio disminuye. Valores elevados de Lip_1.2 es un claro diferenciador de los GB de otros tumores gliales, como se observa fácilmente en la ERM clínica.

5- A la luz de los resultados del punto 4, es aconsejable en los espectros clínicos, realizar dos adquisiciones con TE de 30 ms y 136 ms para estimar la presencia o no de Gly en tumores gliales.

6- El seguimiento de tumores gliales por ERM por un análisis “clínico” de los espectros no brinda una información concluyente sobre la futura evolución del tumor, aunque parcialmente si muestran un comportamiento de mejoramiento o empeoramiento que se relaciona con las imágenes. Nuevamente concentraciones altas o aumentando entre estudios sucesivos de Cho y Lip son indicativos de progresión y concentraciones bajas o disminución de Cho, aumento de Naa y solo MM sin Lip es indicativo de un tumor estable de bajo grado o de progresión lenta.

7- Actualmente realizar estudios longitudinales de espectroscopia es muy difícil por la imposibilidad de repetir la misma adquisición. Equipos con programas de coregistración de imágenes y evaluación de la calidad del espectro previo o al mismo momento que se adquiere el espectro permitirían realizar comparaciones cuantitativas de la evolución de las lesiones y obtener patrones de comportamiento más precisos que involucraría más sustancias que las aquí descriptas.

Anexo I

Características genéticas del tumor

Descripción genética de los tumores utilizados en el análisis del Capítulo VI, donde el valor "1" hace referencia a la "anormalidad", es decir a deleción (1p, 19q, 10q), mutación (IDH1), amplificación (EGFR), metilación (MGMT) o alteración del gen (CDK2N) de la variable genética y el valor "0" a normalidad genética.

Los espectros en rojo fueron descartados por baja SNR (bajo Cramer-Rao o por ser muy diferentes al general de los espectros)

Oligodendrogliomas (O)

Tumor	Características genéticas del tumor							
	1p	19q	1p-19q	10q	CDKN2A	EGFR	MGMT	IDH1
O_I_20562	1	1	1	1	0	0	1	1
O_I_20945	1	1	1	0	0	0	1	1
O_I_21397	1	1	1	0	0	0	1	1
O_I_21472	1	1	1	0	0	0	1	1
O_I_21232	0	0	0	0	0	0	1	1
O_I_21288	0	0	0	0	0	0	1	1
O_I_21439	0	0	0	0	0	0	1	1
O_I_21484	0	0	0	0	0	0	1	1
O_454	0	0	0	0	0	0	0	1
O_I_114	0	0	0	0	0	0	1	1
O_I_M22328	1	1	1	0	0	0	1	0
O_I_M22449	1	1	1	0	0	0	1	1
O_I_M22730	1	1	1	0	0	0	1	1
O_I_M21710	1	1	1	0	0	0	1	1
O_I_21736_xx	0	0	0	1	0	0	0	
O_I_192	1	0	1	1	1	0	1	
O_An_I_21774	1	1	1	0	0	0	1	

Oligoastrocitomas (OA)

Tumor	Características genéticas del tumor							
	1p	19q	1p-19q	10q	CDKN2A	EGFR	MGMT	IDH1
OA_I_20688	1	1	1	1	1	1	1	0
OA_I_21028	0	0	0	1	1	0	0	1
OA_I_20972	1	0	1	1	1	1	0	0
OA_I_21632	1	0	1	1	1	0	0	0
OA_I_21097	0	0	0	1	0	0	1	1
OA_I_453	1	1	1	1	0	0	1	1
OA_I_21798	0	0	0	1	1	0	1	0
OA_I_21065	1	1	1	1	1	1	1	0
OA_I_21608	0	0	0	1	1	1	0	0
OA_82	0	0	0	1	0	0	1	0
OA_M22713_a	1	1	1	0	0	0	0	0
OA:M22803	0	0	0	1	1	0	1	1
OA_I_20472	0	0	0	1	1	0	1	
OA_I_M22605	1	1	1	1	1	1	1	
OA_I_M22688	0	0	0	1	0	0	1	

Glioblastoma (GB)

Tumor	Características genéticas del tumor							
	1p	19q	1p-19q	10q	CDKN2A	EGFR	MGMT	IDH1
GB_I_M22118	0	0	0	1	0	1	0	0
GB_I_M22043	0	1	1	1	1	1	0	0
GB_I_M21918	1	0	1	1	1	1	1	0
GB_I_M21905	1	1	1	1	1	1	0	0
GB_I_M21489	0	0	0	1	1	1	1	0
GB_I_M20846	0	0	0	0	0	1	0	0
GB_I_M20680	1	0	0	0	1	1	0	0
GB_I_M20523	0	0	0	1	1	1	0	0
GB_I_M20518	1	0	0	1	1	1	0	0
GB_I_M374	0	1	1	1	1	0	0	0
GB_I_M356	0	0	0	1	0	1	1	0
GB_I_M316	0	0	0	1	1	1	1	0
GB_I_M208	0	0	0	0	0	1	0	0
GB_I_M189	0	0	0	1	1	1	0	0
GB_I_M127	0	0	0	1	0	0	1	0
GB_I_M125	0	0	0	1	1	1	0	0
GB_I_M22125	1	0	0	1	1	1	0	0
GB_I_M22171	0	0	0	1	1	1	1	0
GB_I_M120	1	0	1	1	1	1	1	0
GB_I_M21501	1	0	1	1	1	1	0	0
GB_I_M21821	0	0	0	1	1	1	0	0
GS_I_M21851	1	0	1	1	1	0	1	0
GS_I_M22723	1	1	1	1	1	1	0	0
GS_M22776	0	1	1	1	1	1	0	0
GS_M22811	0	1	1	1	1	0	1	0
GB_M22832	0	0	0	1	1	1	1	0
GB_M22781	0	0	0	1	0	1	0	0
GB_I_M20743	0	0	0	1	1	1	0	
GB_I_M22693	1	1	1	1	1	1	0	

Anexo II

Gráficos y resultados de la clasificación PLS-DA

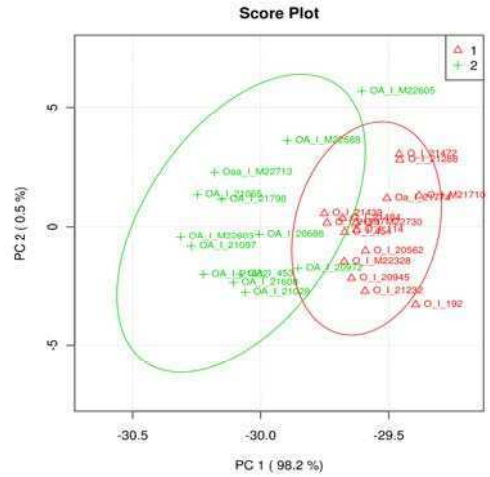
Gráficos y resultados de la clasificación PLS-DA de las alteraciones genéticas de los grupos O-OA y OA-GB definidas en **VI.3.3** para Quest y ACD/NMR**.**

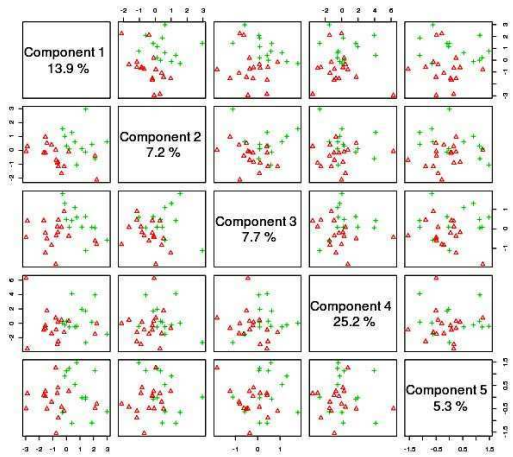
La distribución de los resultados sigue el patrón de la siguiente tabla y se presentan en hojas separadas por alteración genética y método de cuantificación

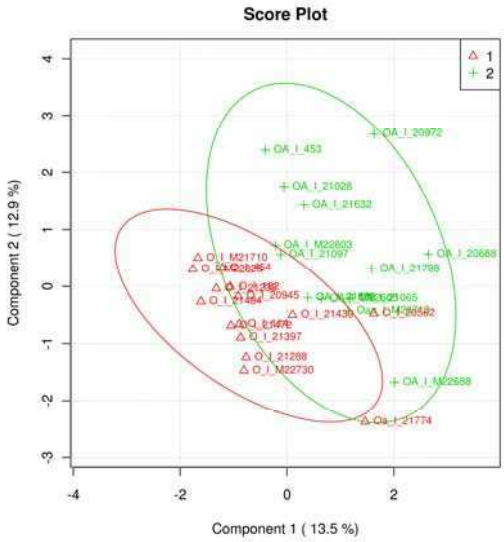
Grafico 2 D de Análisis por Componentes Principales (PCA). La importancia (varianza) de cada componente se indica entre paréntesis.	Representación de las 5 componentes más importantes de PLS-DA. La importancia (varianza) de cada componente se indica en el centro.
Grafico 2 D de PLS-DA de las 2 componentes principales. La importancia (varianza) de cada componente se indica entre paréntesis	Grafico 3 D de PLS-DA con las 3 componentes principales*.
Calidad de la clasificación PLS-DA medida por R^2 y Q^2 por número de componentes. La estrella roja indica el mejor clasificador	Metabolitos mas importantes en la clasificación PLS-DA
Gráficos de “cajas” de los metabolitos normalizados mas significativos en la clasificación PLS-DA	

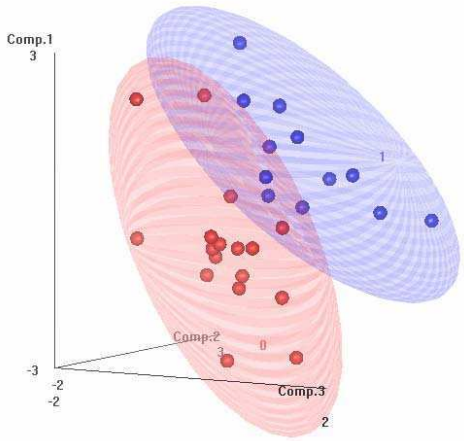
* Algunos gráficos 3D de ACD Labs fueron re-procesados (Programa R) a partir de los parámetros de clasificación calculados por PLS-DA para tener una mejor perspectiva de la ubicación de las distintas muestras en el espacio.

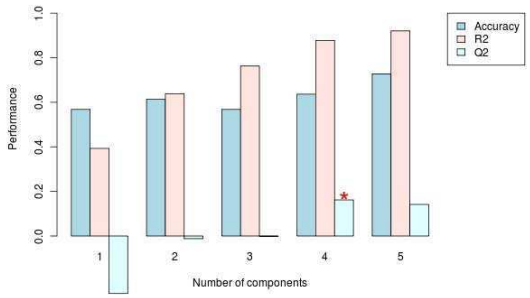
O_OA ACD/NMR



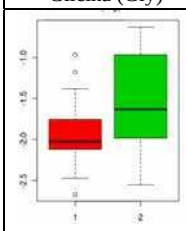
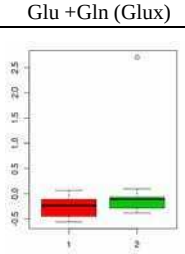
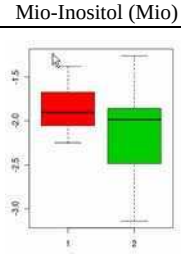
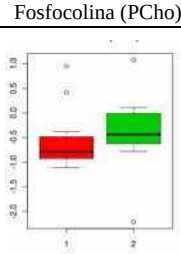
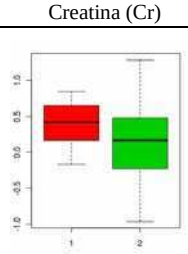






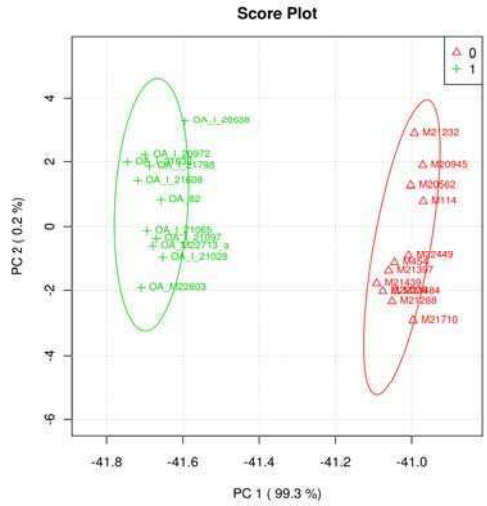


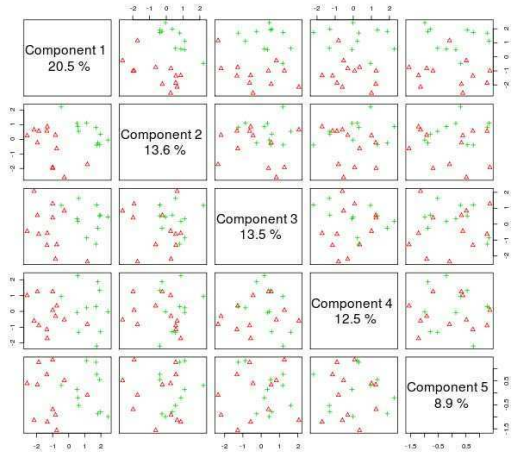
	Metabolito	Coef VIP
1	Glicina (Gly)	2,8206
2	Glutamato+Glutamina (Glux)	2,3835
3	[3.2793 .. 3.2828]	2,2088
4	[3.2391 .. 3.2486]	2,1549
5	Fosfocolina (PCho)	2,0991
6	Mio-Inositol (Mio)	1,9283
7	[4.6402 .. 4.6495]	1,8943
8	Creatina (Cr)	1,8182
9	[3.6875 .. 3.6995]	1,8018
10	[4.6261 .. 4.6402]	1,7467
11	Creatina (Cr)	1,742
12	[3.2828 .. 3.2993]	1,735
13	zona Tau-Mio	1,7251
14	Mio-Inositol (Mio)	1,7005
15	[3.6692 .. 3.6835]	1,6512

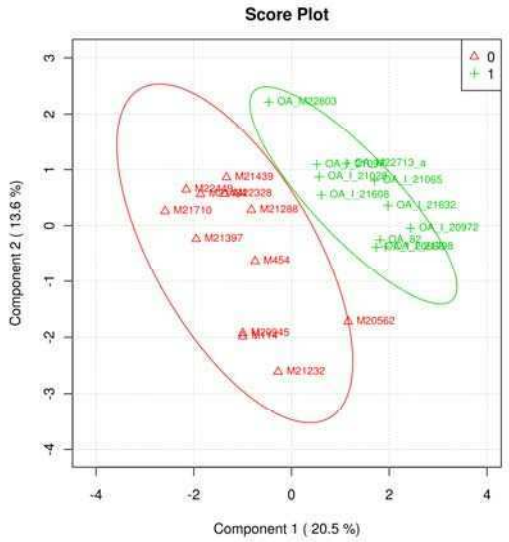
Glicina (Gly)	Glu +Gln (Glux)	Mio-Inositol (Mio)	Fosfocolina (PCho)	Creatina (Cr)	
					**ACD/NMR**

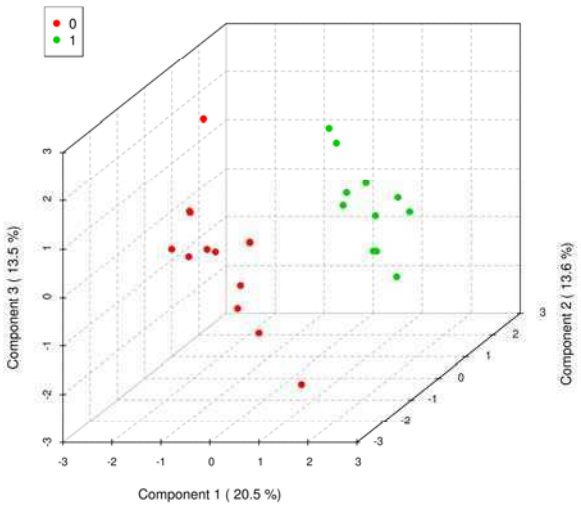
1=O, 2=OA

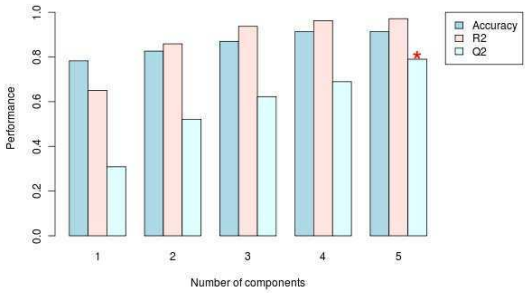
O_OA Quest



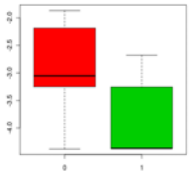
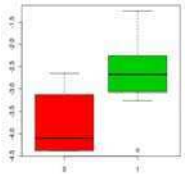
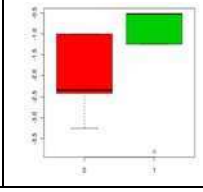
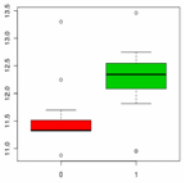
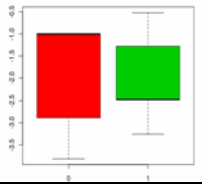






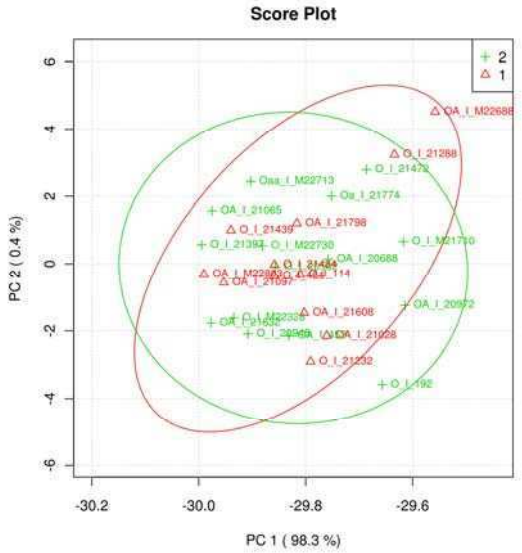


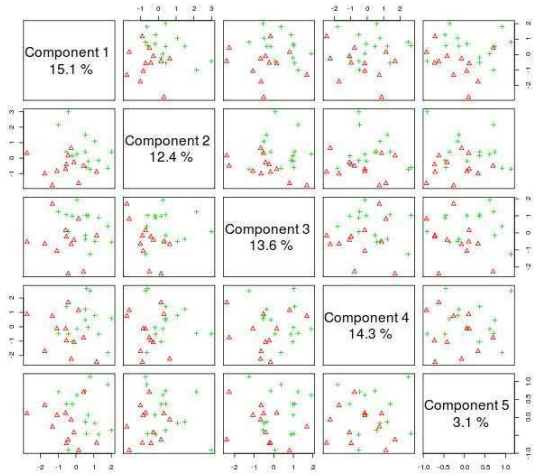
	Metabolito	Coef VIP
1	Mio-Inositol (Mio)	1,6444
2	Glicina (Gly)	1,6122
3	Alanina (Ala))	1,5456
4	Fosfocolina (PCho)	1,517
5	Glutamina (Gln)	1,316
6	Glicerocolina (GPCho)	1,0546
7	Desconocido	0,99857
8	Creatina (Cr)	0,87567
9	Valina (Val)	0,84493
10	Colina (Cho)	0,8369
11	Glutamato (Glu)	0,79068
12	Etanol	0,7687
13	Lipidos 1.17	0,6816
14	Lipidos 2.02	0,66993
15	Lipidos 0.9_1	0,66192

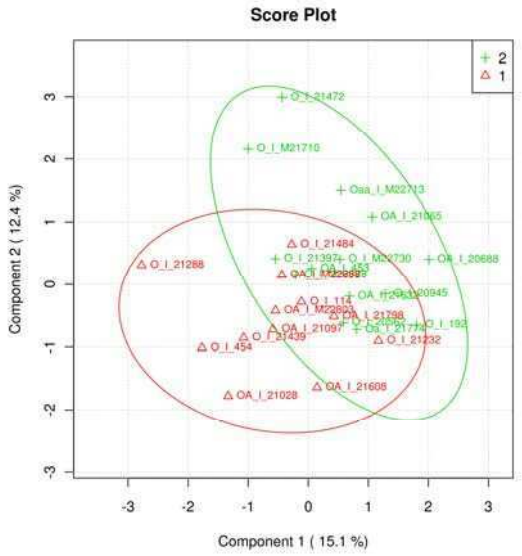
Mio-Inositol (Mio)	Glicina (Gly)	Fosfocolina (Pcho)	Glutamina (Gln)	Glicreofofocolina (GPCho)	
					**Quest**

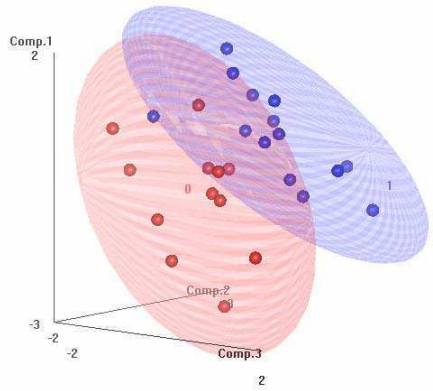
0=O, 1=OA

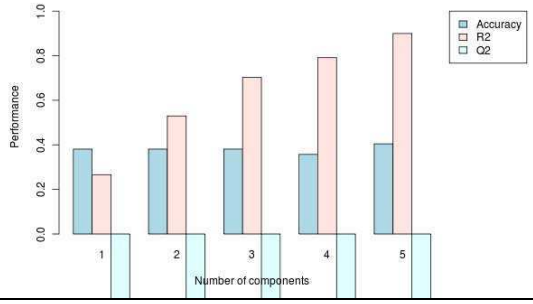
O_OA_1p_19q ACD/NMR





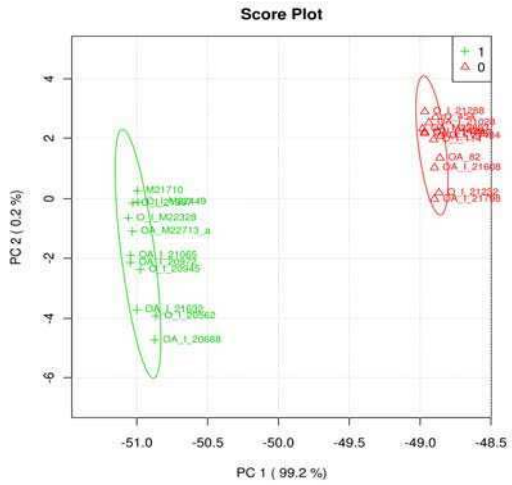


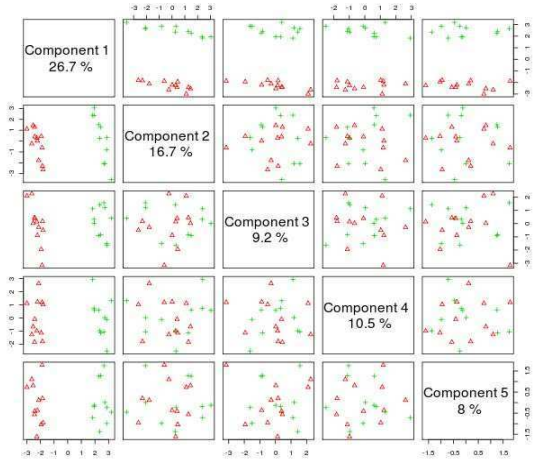


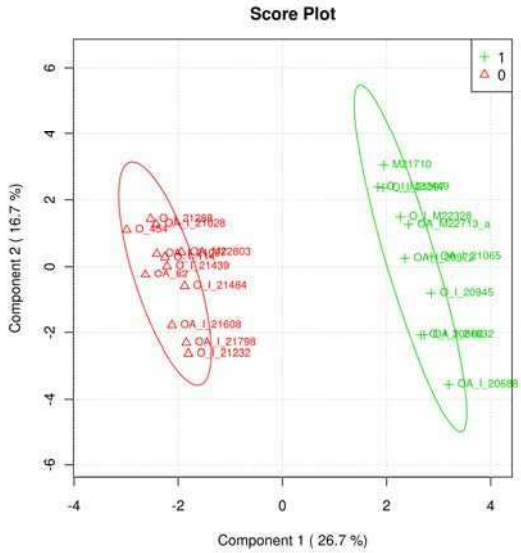


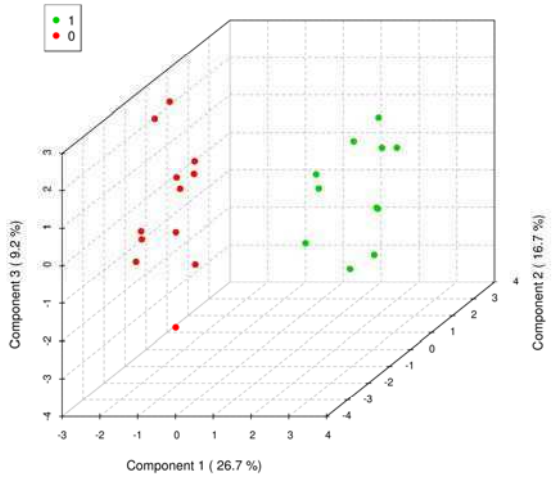
Mala estadística

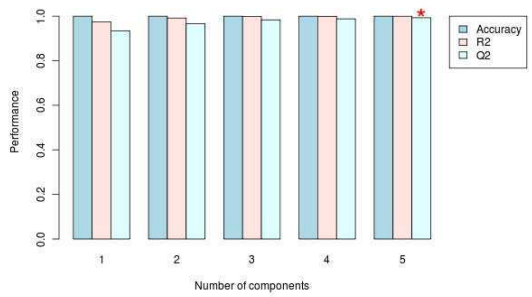
O_OA_1p_19q Quest



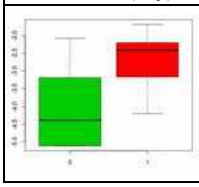
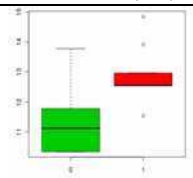
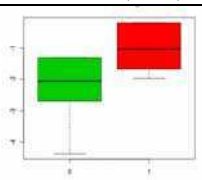
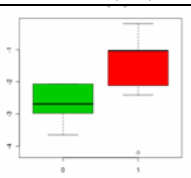
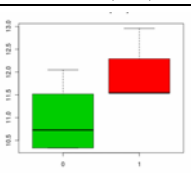






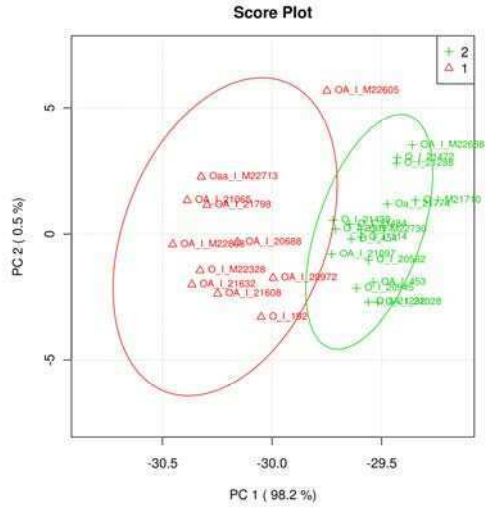


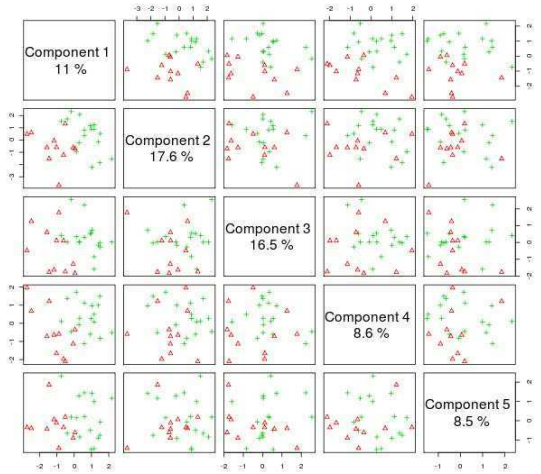
	Metabolito	Coef VIP
1	Glicina (Gly)	1.7498
2	Glutamato (Glu)	1.654
3	Desconocido	1.3336
4	Fosfocolina (PCho)	1.2845
5	GABA	1.2733
6	Alanina (Ala))	1.2599
7	Acetato (Ace)	1.0483
8	Colina (Cho)	0.98616
9	Lipidos 1.17	0.96416
10	Creatina (Cr)	0.94652
11	Valina (Val)	0.90461
12	Lipidos 2.02	0.82168
13	Glutamina (Gln)	0.82053
14	Lipidos 1.4	0.78279
15	Lactato1	0.7454

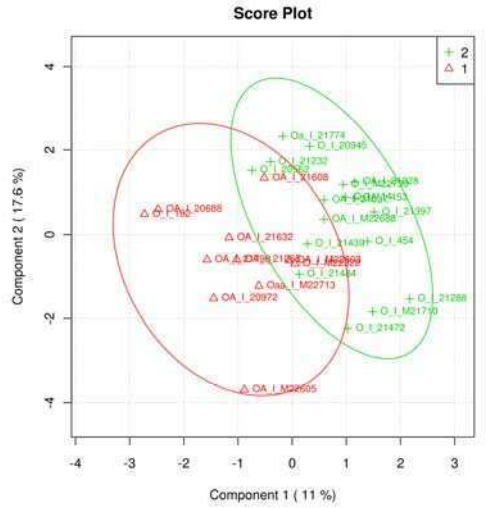
Glicina (Gly)	Glutamato (Glu)	Fosfocolina (PCho)	Alanina (Ala)	Acetato (Ace)	
					**Quest**

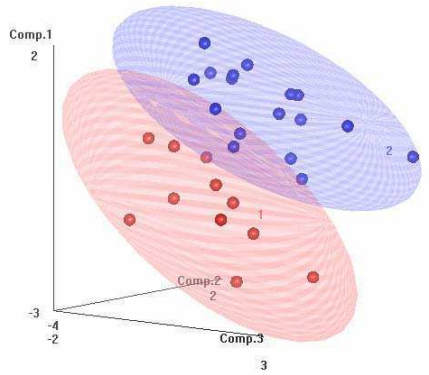
0= sin deleción, 1= con deleción

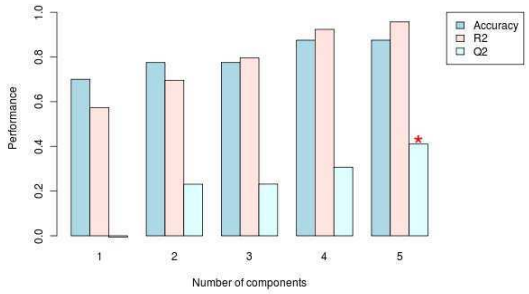
O_OA_IDH1 ACD/NMR



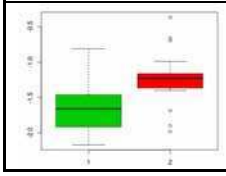
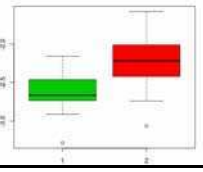
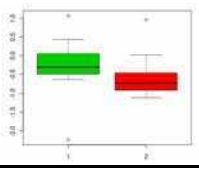
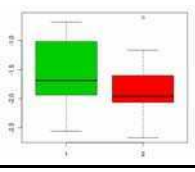
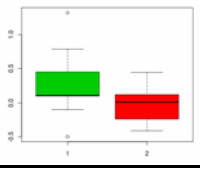






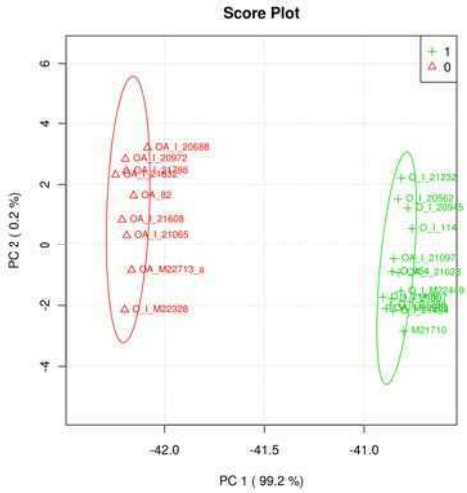


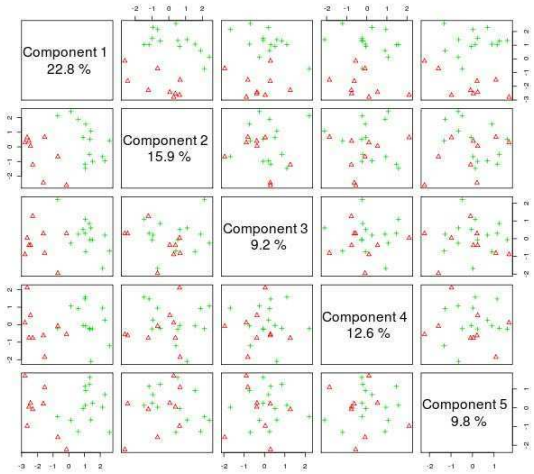
	Metabolito	Coef VIP
1	Mio-Inositol (Mio)	2,692
2	Mio-Inositol (Mio)	2,5699
3	[3.6692 .. 3.6835]	2,3023
4	etanol	2,275
5	pico 2d0 etanol	2,2658
6	Mio-Inositol (Mio)	2,2511
7	pico 3r0 etanol	2,2268
8	Fosfocolina (PCho)	2,1803
9	[3.6835 .. 3.6875]	2,1589
10	Glicina (Gly)	2,0332
11	pico principal etanol	1,9665
12	Gluta o glutamina?	1,933
13	[3.3881 .. 3.3974]	1,8416
14	Glutamato+Glutamina (Glux)	1,8353
15	[3.6438 .. 3.6538]	1,8299

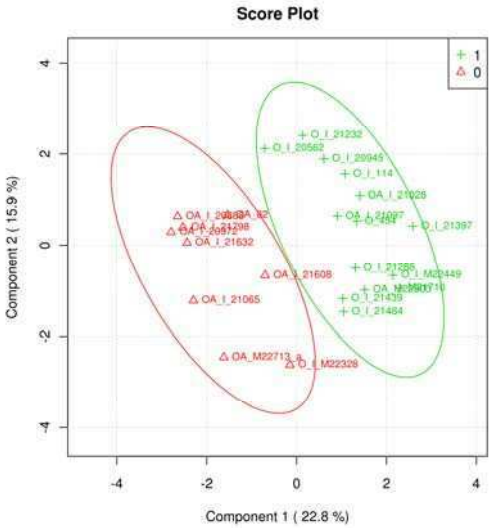
Mio-Inositol (Mio)	Mio-Inositol (Mio)	Fosfocolina (PCho)	Glicina (Gly)	Glutamato (Glu)	
					**ACD/NMR**

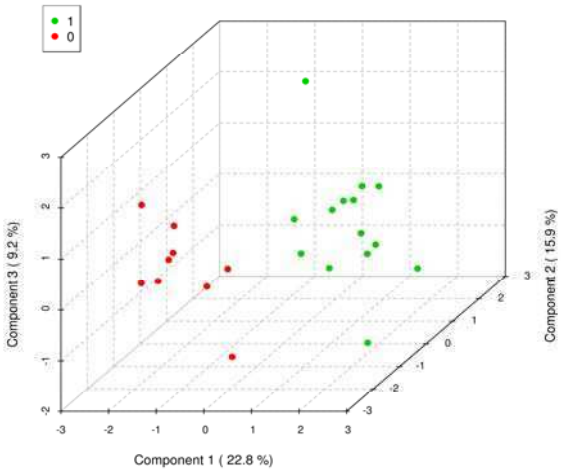
1= sin mutación, 2= mutado

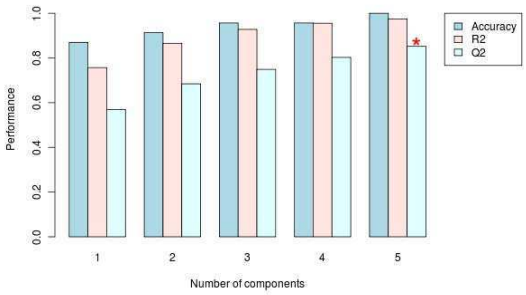
O_OA_HD1 Quest



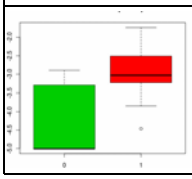
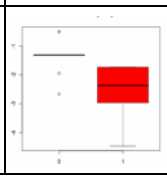
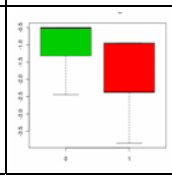
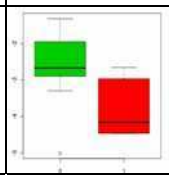
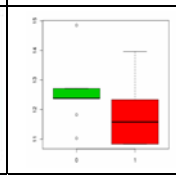
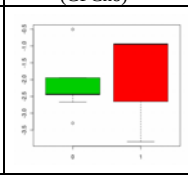






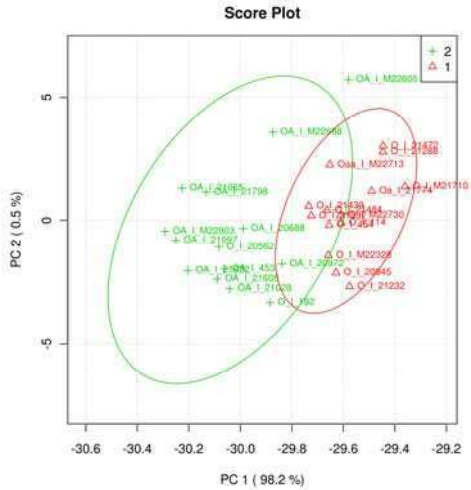


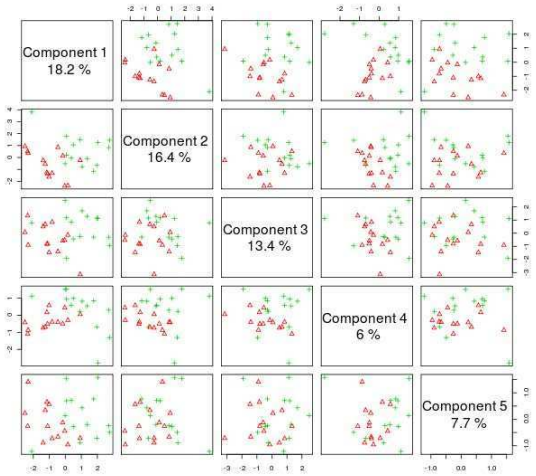
	Metabolito	Coef VIP
1	Mio-Inositol (Mio)	2,0826
2	Alanina (Ala))	1,5783
3	Fosfocolina (PCho)	1,5756
4	Glicina (Gly)	1,4346
5	Desconocido	1,089
6	Glutamato (Glu)	1,0827
7	Glicerocolina (G-cho)	1,0481
8	Lactato1	1,032
9	Lactato2	0,91728
10	Glutamina (Gln)	0,76665
11	Valina (Val)	0,663
12	Lipidos 2.02	0,62695
13	Etanol	0,61664
14	Lipidos 1.17	0,55563
15	Colina (Cho)	0,49179

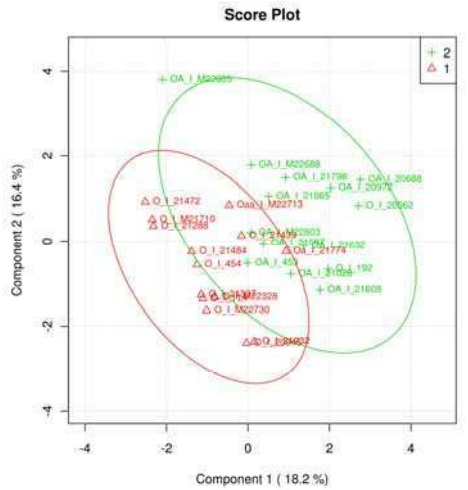
Mio-Inositol (Mio)	Alanina (Ala)	Fosfocolina (PCho)	Glicina (Gly)	Glutamato (Glu)	Glicreofofocolina (GPCho)	
						**Quest**

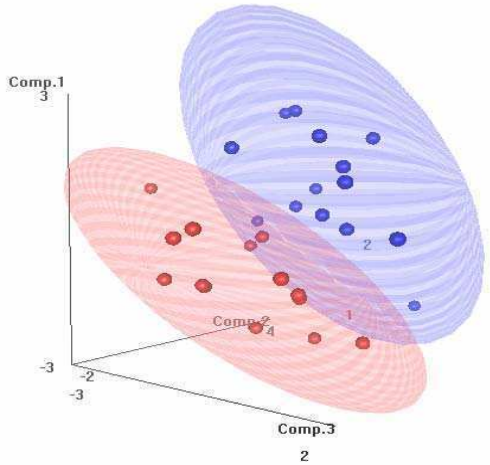
0= sin mutación, 1= mutado

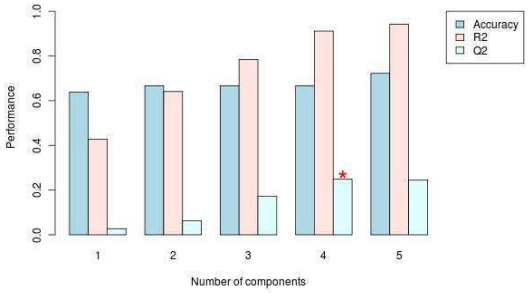
O_OA_10q ACD/NMR



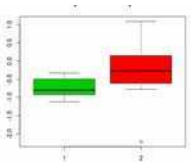
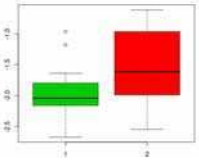
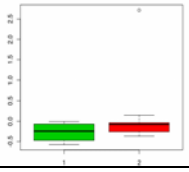
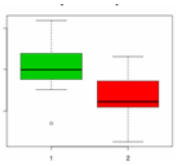






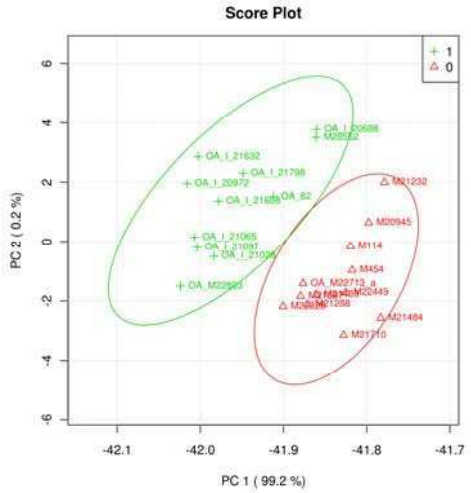


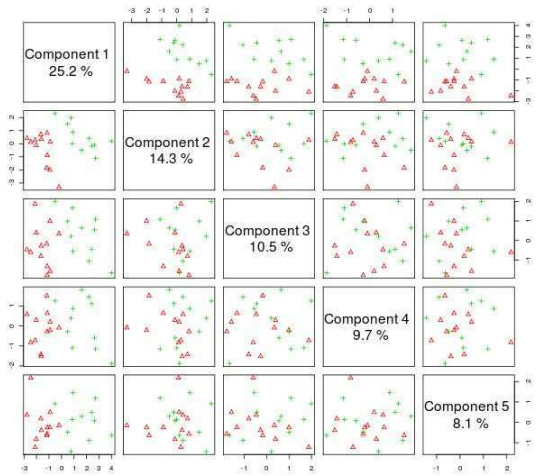
	Metabolito	Coef VIP
1	Fosfocolina (PCho)	3,0428
2	[3.6538 .. 3.6690]	2,5636
3	Desconocido 1	2,4372
4	Glicina (Gly)	2,374
5	pico 3r0 etanol	2,2505
6	[3.6692 .. 3.6835]	2,1931
7	[3.6438 .. 3.6538]--	2,1769
8	Glux	2,0865
9	pico principal etanol	2,0736
10	etanol	2,0379
11	[3.2828 .. 3.2993]	2,0349
12	pico 2d0 etanol	2,0108
13	Glutamato+Glutamina (Glux)	1,9151
14	Mio-Inositol (Mio)	1,8873
15	Colina	1,87

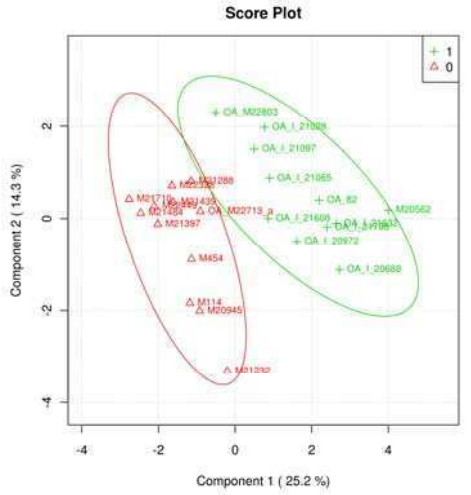
Fosfocolina (PCho)	Glicina (Gly)	Glux	Etanol		ACD/NMR
					

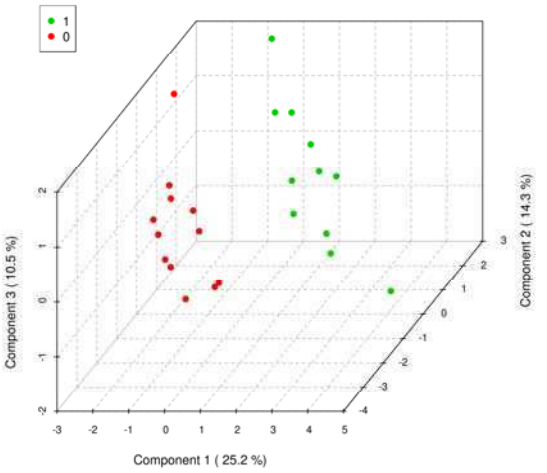
1= sin deleción 2= con deleción

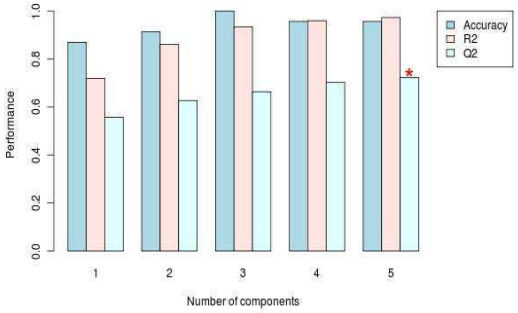
O_OA_10q Quest



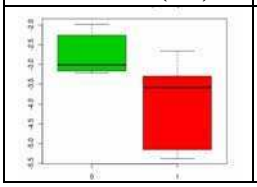
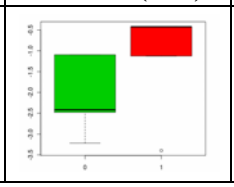
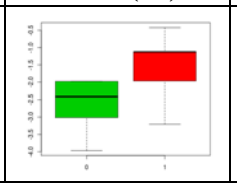
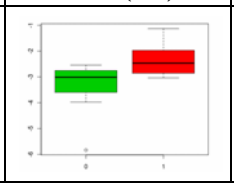
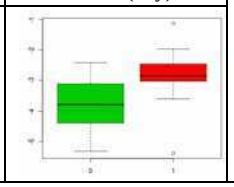






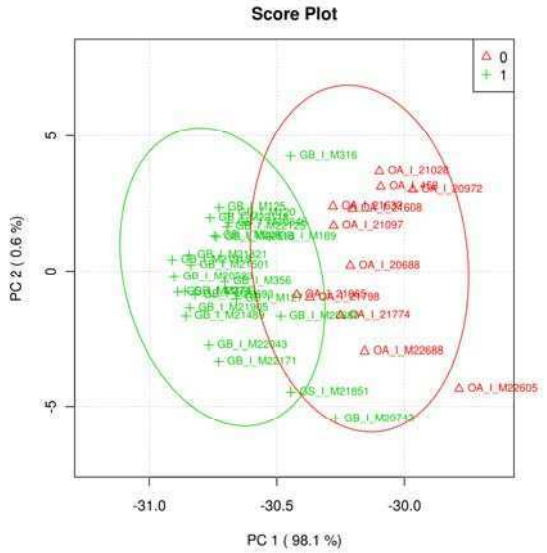


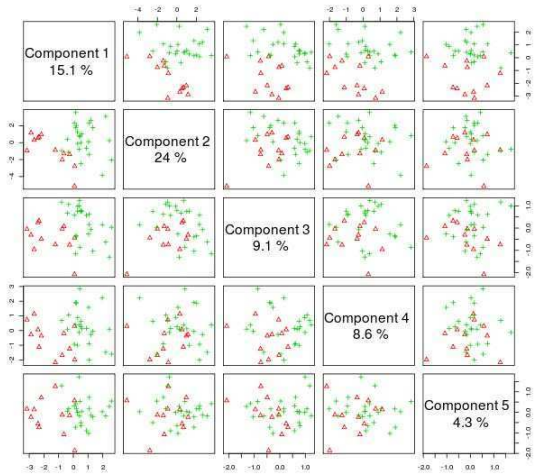
	Metabolito	Coef VIP
1	Mio-Inositol (Mio)	1,8623
2	Fosfocolina (PCho)	1,5307
3	Alanina (Ala))	1,4063
4	Colina (Cho)	1,341
5	Glicina (Gly)	1,2647
6	Taurina (Tau)	1,2173
7	Desconocido	1,2171
8	Glutamina (Gln)	1,0831
9	Valina (Val)	1,0714
10	Glicerocolina (G-cho)	0,89453
11	Creatina (Cr)	0,84102
12	GABA	0,76983
13	Lactato2	0,71699
14	Glutamato (Glu)	0,66023

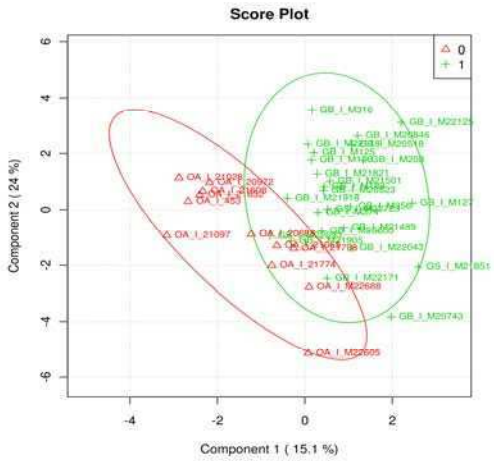
Mio-Inositol (Mio)	Fosfocolina (PCho)	Alanina (Ala)	Colina (Cho)	Glicina (Gly)	
					**Quest**

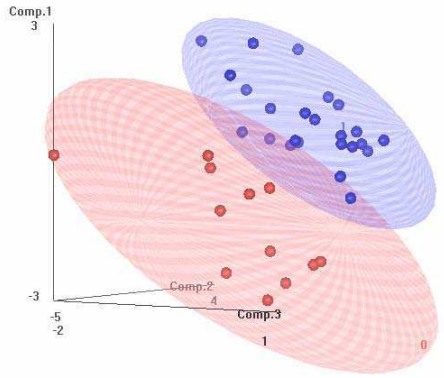
0= sin deleción, 1= con deleción

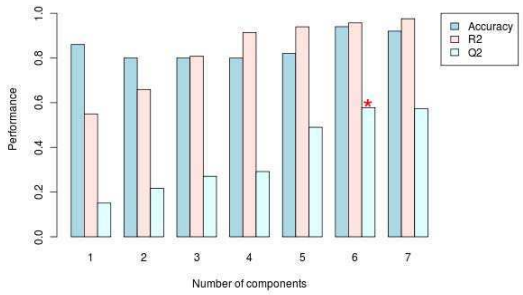
OA_GB ACD/NMR



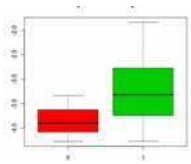
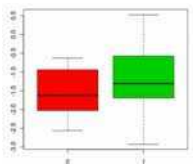
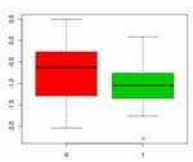
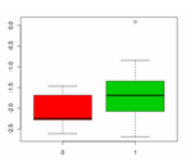
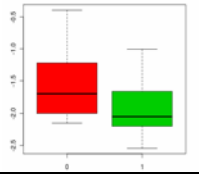






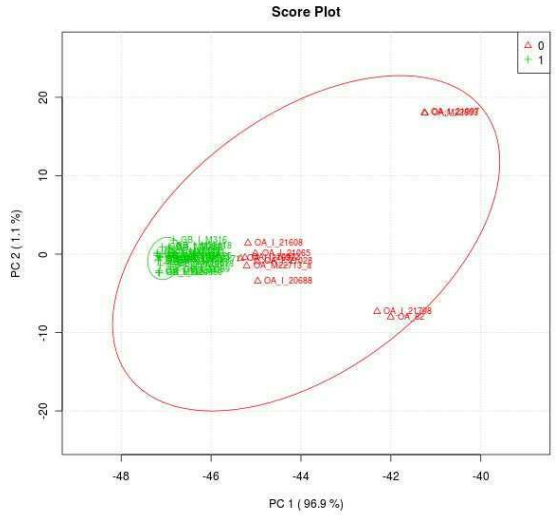


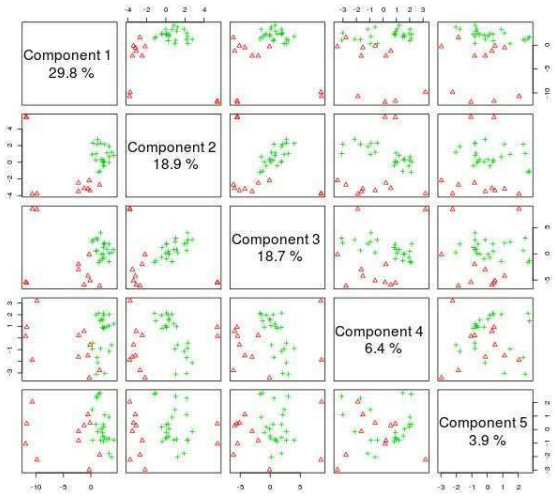
	Metabolito	Coef VIP
1	Hipotaurina (H-Tau)	4,6225
2	Hipotaurina (H-Tau)	3,3142
3	Desconocido 1	2,6018
4	[3.6875 .. 3.6995]	2,3049
5	Glicina (Gly)	2,1878
6	Glicerocolina	2,1088
7	[3.2793 .. 3.2828]	2,0654
8	[3.6835 .. 3.6875]	2,0026
9	Lipidos 1.2	2
10	Mio-Inositol (Mio)	1,9636
11	Lipidos 0.9_1	1,9489
12	ultimo pico Mio-Inositol (Mio)	1,8691
13	Mio-Inositol (Mio)	1,8527
14	[3.2828 .. 3.2993]	1,8393
15	[3.6538 .. 3.6690]	1,625

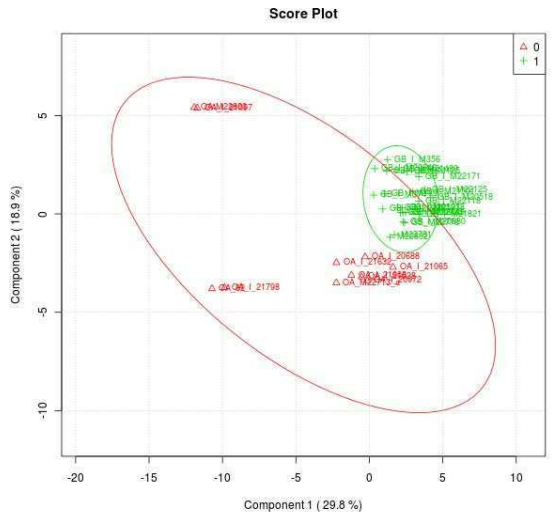
Hipotaurina (H-Tau)	Glicina (Gly)	Glicerocolina (GPCho)	Lip_1.2	Mio-Inositol (Mio)	ACD/NMR
					

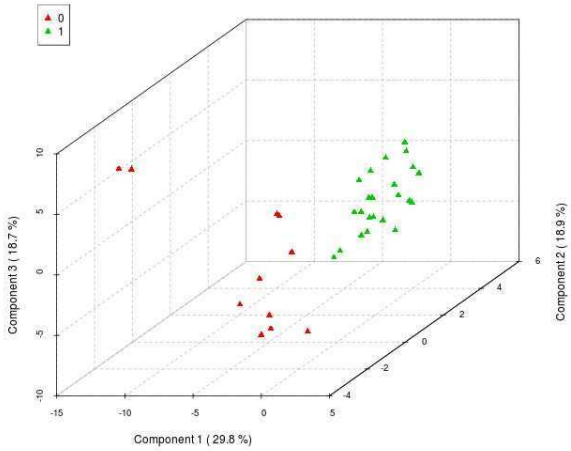
0=OA, 1=GB

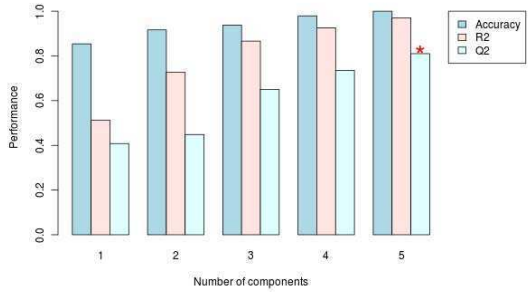
OA_GB Quest



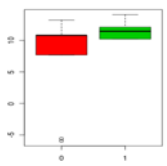
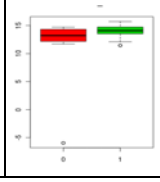
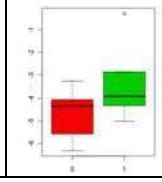
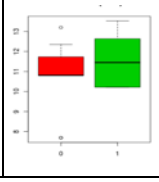
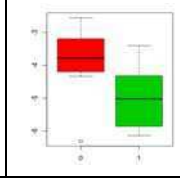
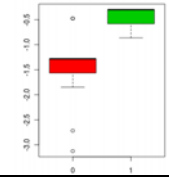






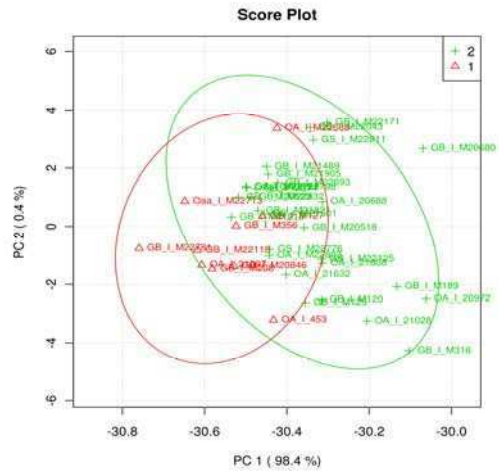


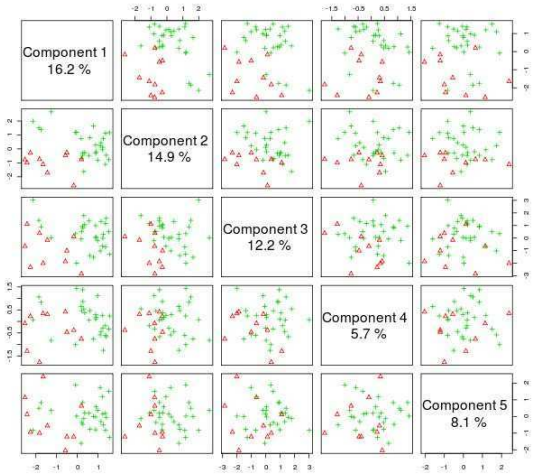
	Metabolito	Coef VIP
1	Hipotaurina (H-Tau)	2,9415
2	Lipido_1,2	2,9178
3	Desconocido2 (Desc_2)	1,0253
4	Acetato (Ace)	1,0125
5	Mio-Inositol (Mio)	0,88059
6	Alanina (Ala)	0,85064
7	Glutamina (Gln)	0,82708
8	Lipido_2,02	0,74425
9	Glicina (Gly)	0,68788
10	Lipido_0,9_2	0,56252
11	Lipido_1,17	0,54926
12	Creatina (Cr)	0,53478
13	Glutation_1 (GSH)	0,53094
14	Desconocido	0,51278
15	Lipido_0,9_1	0,49498

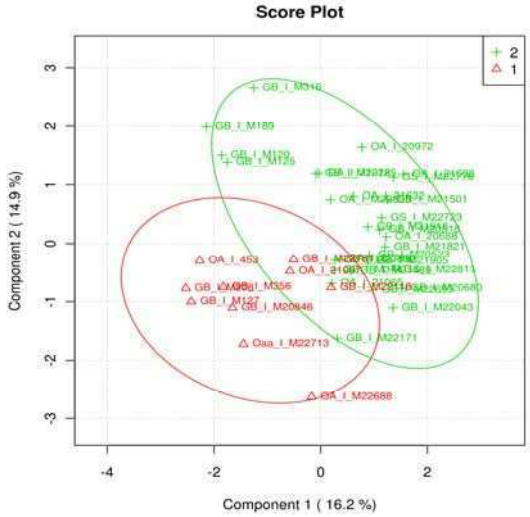
Hipotaurina (H-Tau)	Lip_1.2	Desconocido:2	Acetato (Ace)	Mio-inositol (Mio)	Glicina (Gly)	
						**Quest**

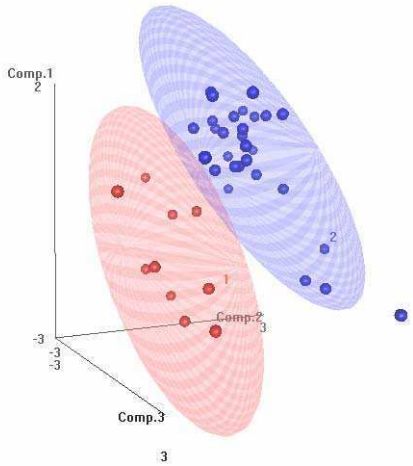
0=OA, 1=GB

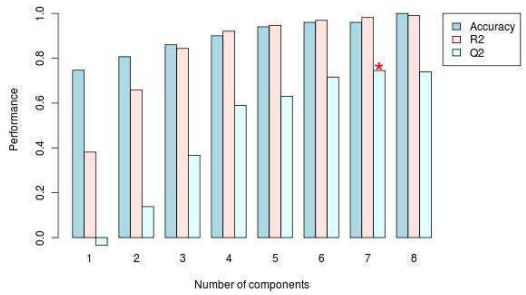
OA_GB_CDK2N ACD/NMR



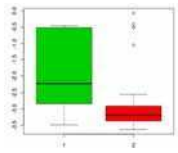
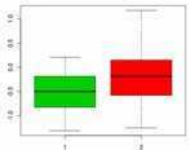
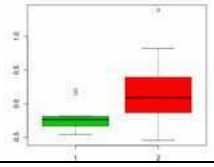
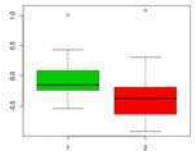
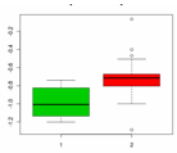






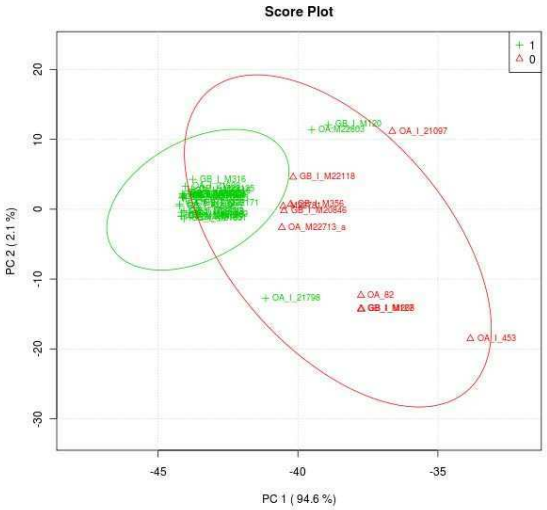


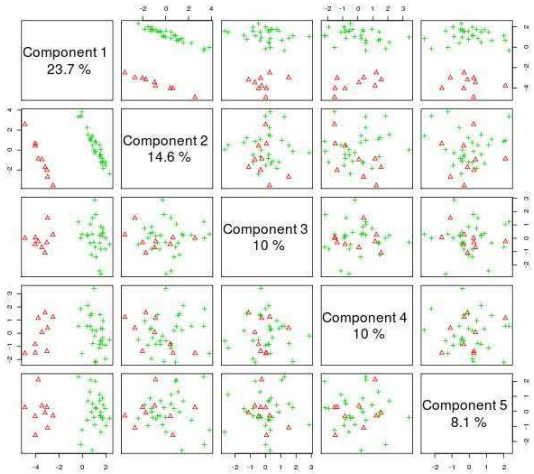
	Metabolito	Coef VIP
1	Hipotuarina (H-Tau)	4,7099
2	[3.3881 .. 3.3974]	2,6837
3	Fosfocolina (PCho)	2,3297
4	Lactato 1	2,1867
5	Desconocido 1	2,1248
6	Creatina (Cr)	2,1239
7	Mio-Inositol (Mio)	1,923
8	[3.3798 .. 3.3881]	1,8024
9	Taurina (Tau)	1,7767
10	Mio-Inositol (Mio)	1,7644
11	[3.4454 .. 3.4628]	1,736
12	Hipotuarina (H-Tau)	1,5905
13	Glutamato+Glutamina (Glux)	1,5386

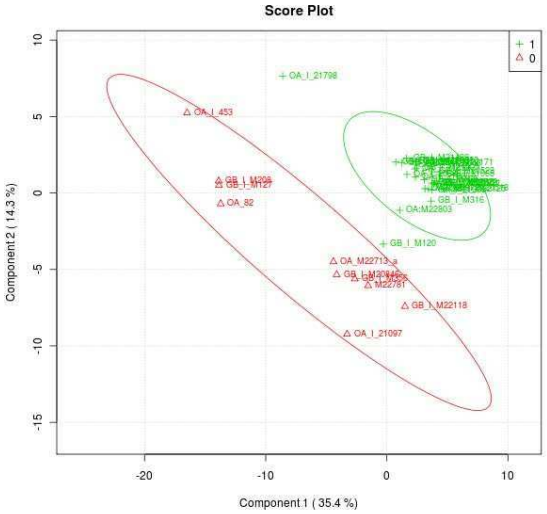
H-Taurina (H-Tau)	Fosfocolina (PCho)	Creatina (Cr)	Mio-Inositol (Mio)	Taurina (Tau)	
					**ACD/NMR**

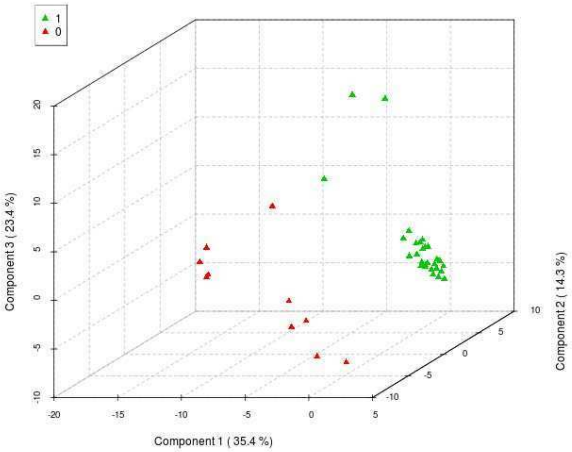
1=normal, 2=alterado

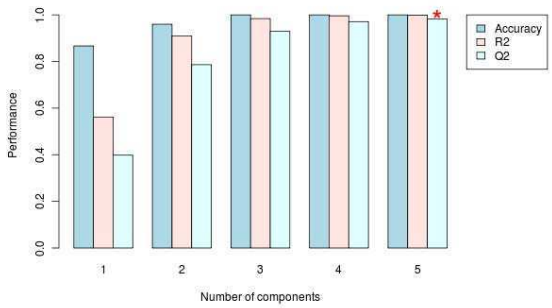
OA_GB_CDK2N Quest



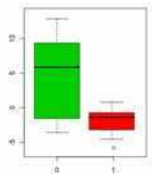
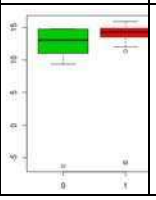
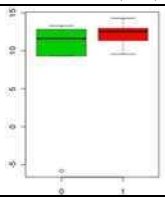
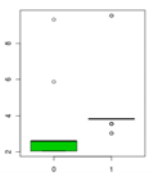
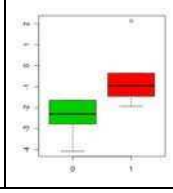
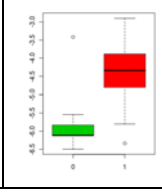






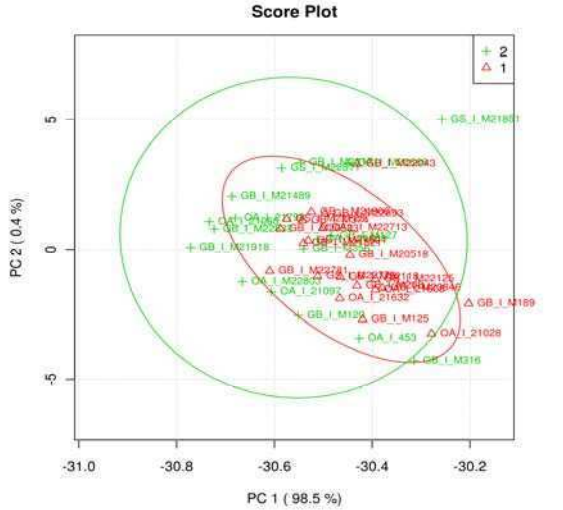


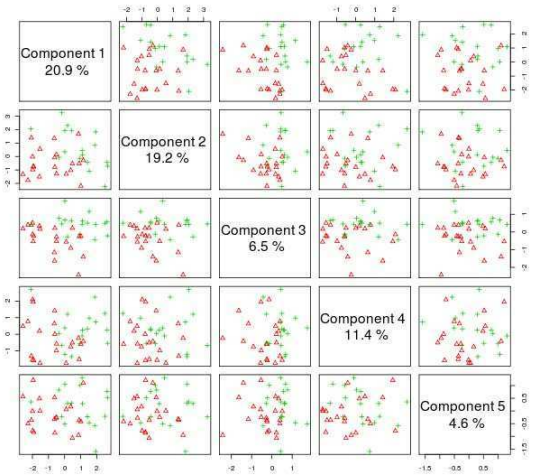
	Metabolito	Coef VIP
1	Hipotaurina (H-Tau)	3,3974
2	Lipido_1,2	1,4112
3	Glutamina (Gln)	1,2012
4	Acetato (Ace)	1,0541
5	Lipido_0,9_1	0,97794
6	Fosfocolina (PCho)	0,92185
7	Glutamato (Glu)	0,89093
8	Lipidos_1,17	0,8773
9	Taurina (Tau)	0,82032
10	Alanina (Ala)	0,71046
11	Lactato1	0,67358
12	Lactato2	0,6328
13	Creatina (Cr)	0,58499
14	Desconocido2	0,57968
15	Etanol	0,55642

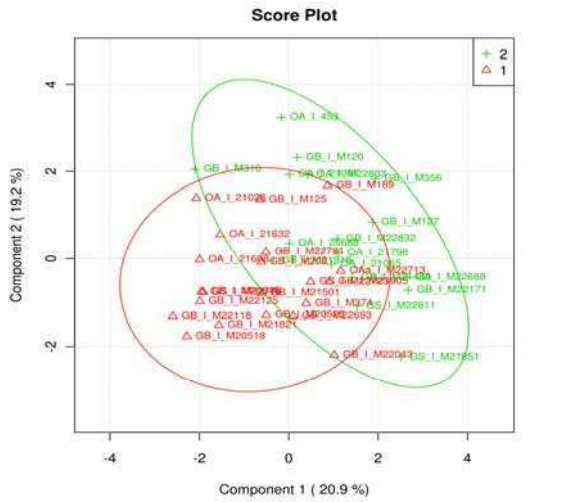
H-Taurina (H-Tau)	Lip_1.2	Glutamina (Gln)	Lipido_0,9_1	Fosfocolina(PCho)	Taurina (Tau)	
						**Quest**

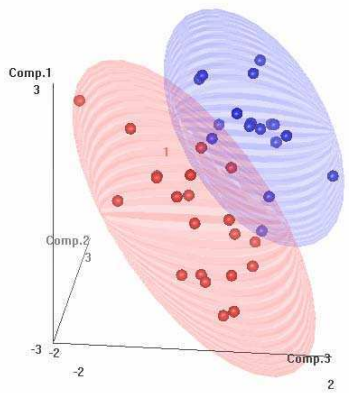
0=normal, 1=alterado

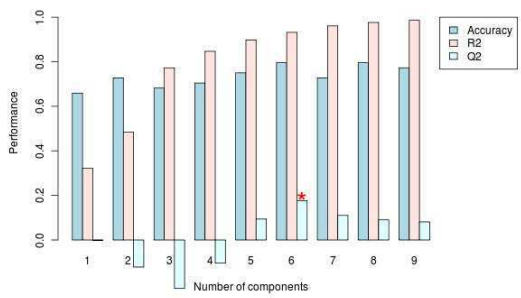
OA_GB_MGMT ACD/NMR



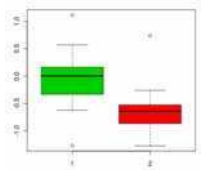
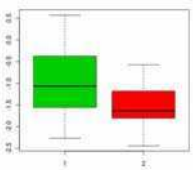
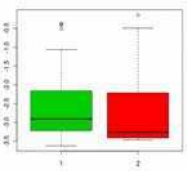
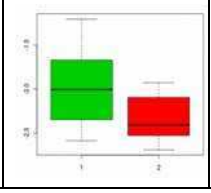
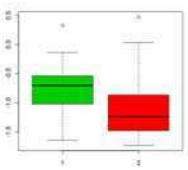






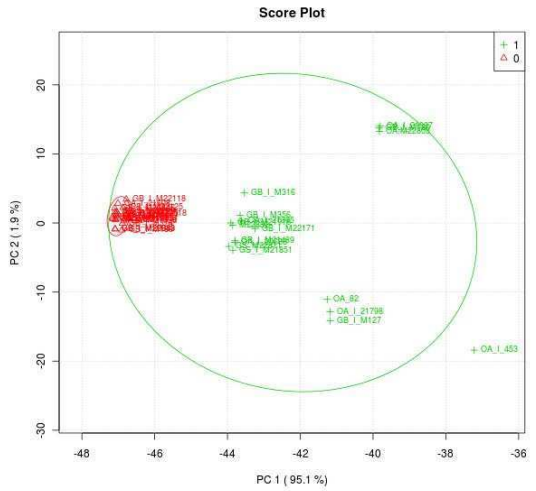


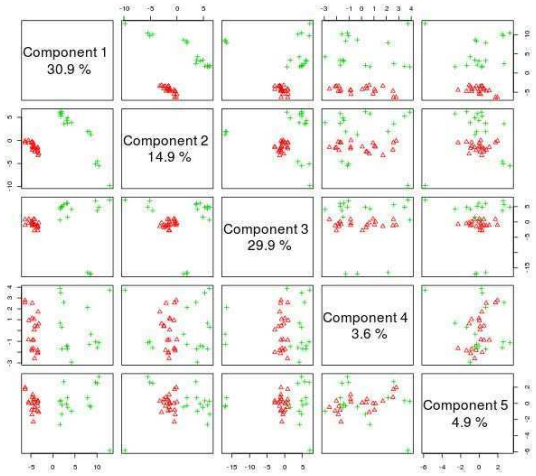
	Metabolito	Coef VIP
1	Fosfocolina (PCho)	3,3498
2	Glicina (Gly)	3,3478
3	[1.2243 .. 1.2804]	2,7429
4	Hipotaurina (H-Tau)	2,6378
5	Hipotaurina (H-Tau)	2,1541
6	[3.3881 .. 3.3974]	1,9536
7	Desconocido 2	1,9403
8	[3.2082 .. 3.2121]	1,9338
9	Glicerocolina (GPCho)	1,7833
10	Pico Princ. Etanol	1,76
11	[1.4524 .. 1.4991]	1,6441
12	[3.6538 .. 3.6690]	1,6289
13	Colina (Cho)	1,6223
14	[3.6692 .. 3.6835]	1,6022
15	[1.1890 .. 1.1947]	1,5973

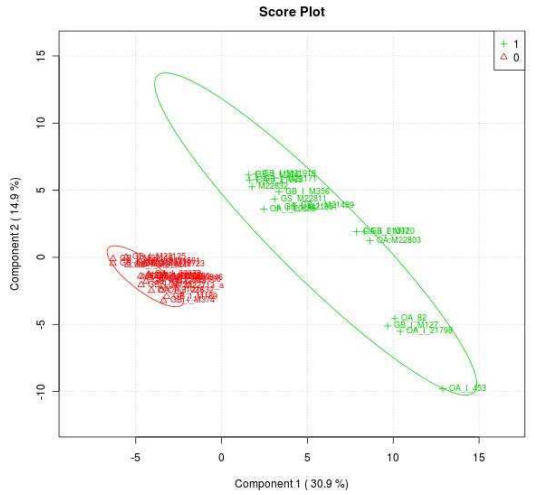
Fosfocolina (PCho)	Glicina (Gly)	Hipo-Taurina (H-Tau)	Desconocido 2	Glicerofosfocolina (GPCho))	
					ACD/NMR

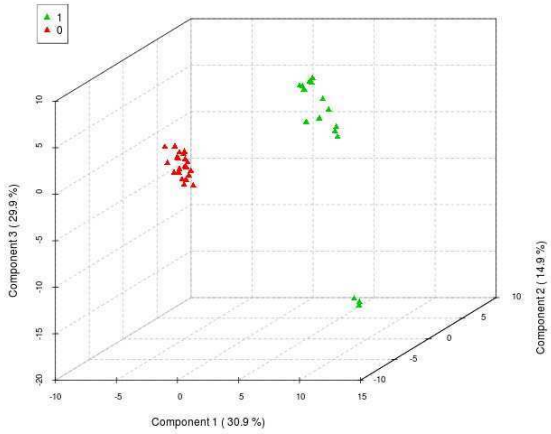
1= no metilado, 2=metilado

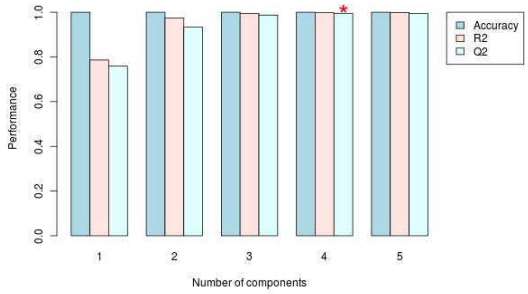
OA_GB_MGMT Quest



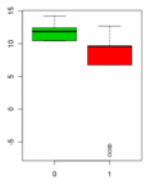
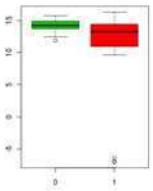
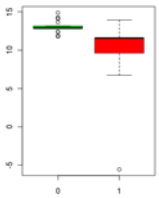
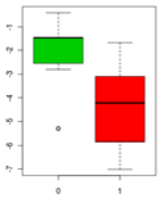
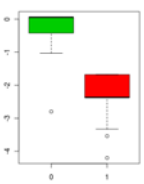
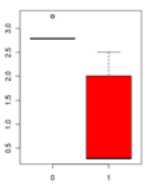






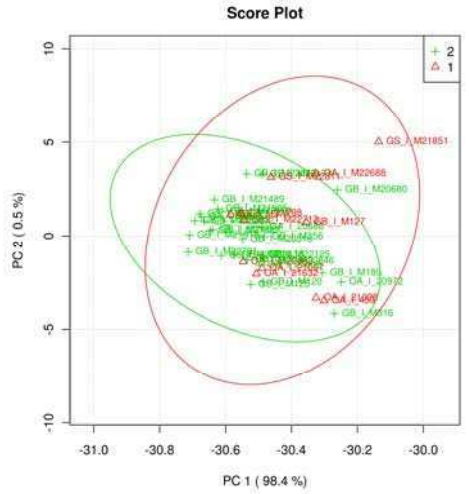


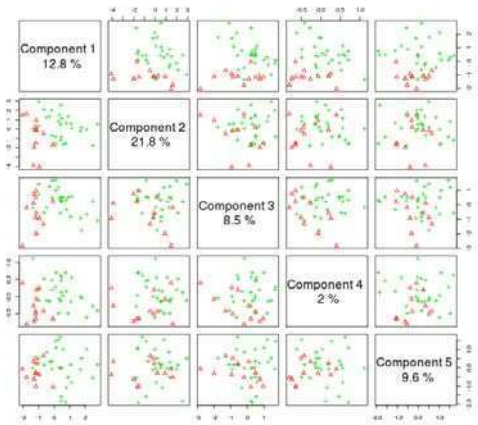
	Metabolito	Coef VIP
1	Hipotaurina (H-Tau)	2.9905
2	Lipido_1.2	1.9418
3	Glutamina (Gln)	1.396
4	Glutation (GHS)	1.0726
5	Alanina (Ala)	0.94559
6	Lipidos_1.17	0.91882
7	Fosfocolina (PCho)	0.83782
8	Glutamato (Glu)	0.82165
9	Mio-Inositol (Mio)	0.8204
10	Taurina (Tau)	0.77117
11	Glicina (Gly)	0.76212
12	Acetato (Ace)	0.74255
13	Lactato2	0.7089
14	Glicerocolina (GPCho)	0.70005
15	Desconocido2	0.6505

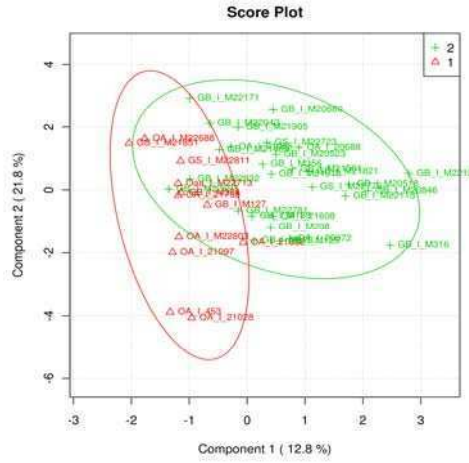
H-Taurina (H-Tau)	Lip_1.2	Glutamina (Gln)	Glutation (GSH)	Alanina (Ala)	Lipidos_1.17	
						**Quest**

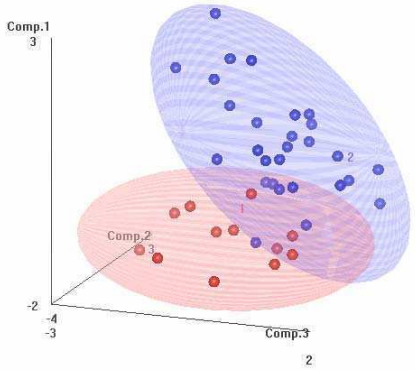
0= no metilado, 2=metilado

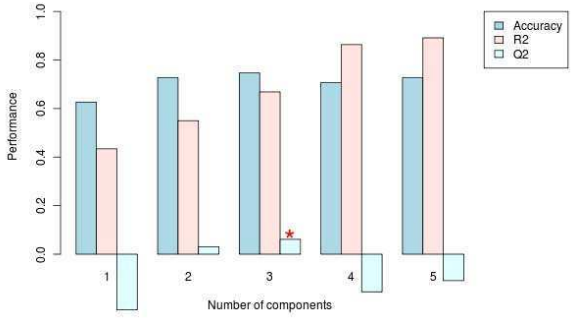
OA_GB_EGFR ACD/NMR



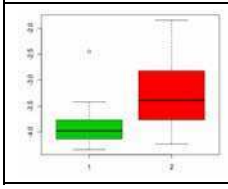
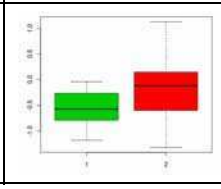
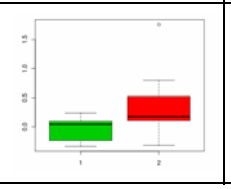
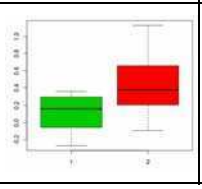
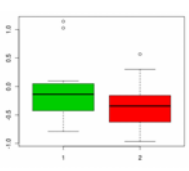






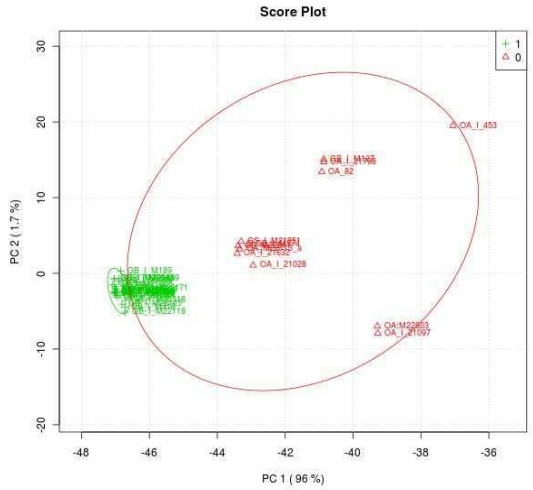


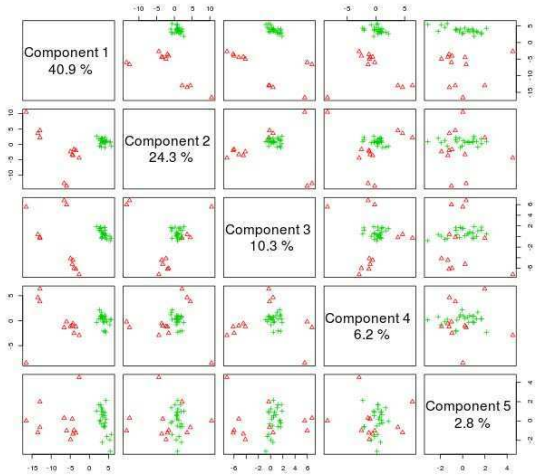
	Metabolito	Coef VIP
1	Hipotaurina (H-Tau)	4,2507
2	Hipotaurina (H-Tau)	3,0588
3	Fosfocolina (PCho)	2,6191
4	Gluta o glutamina?	2,5872
5	[3.6692 .. 3.6835]	2,484
6	Glutamato+Glutamina (Glux)	2,3473
7	Mio-Inositol (Mio)	2,1916
8	Desconocido 1	2,0412
9	[3.6538 .. 3.6690]	2,0074
10	Glicina (Gly)	2,0057
11	Creatina (Cr)	1,9946
12	[3.6835 .. 3.6875]	1,9944
13	[3.6438 .. 3.6538]	1,9922
14	Mio-Inositol (Mio)	1,8589
15	[3.3699 .. 3.3798]	1,7882

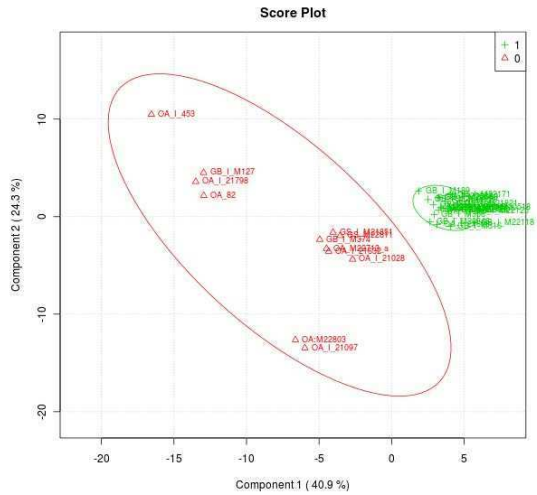
Hipo-Taurina (H-Tau)	Fosfocolina (PCho)	Glutamina (Gln)	Glux	Mio-inositol (Mio)	
					**ACD/NMR**

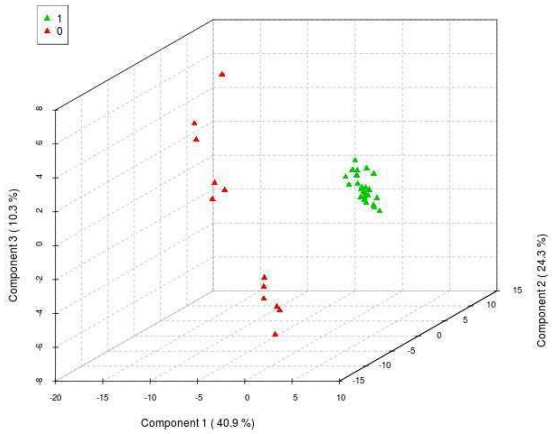
1=normal, 2=amplificado

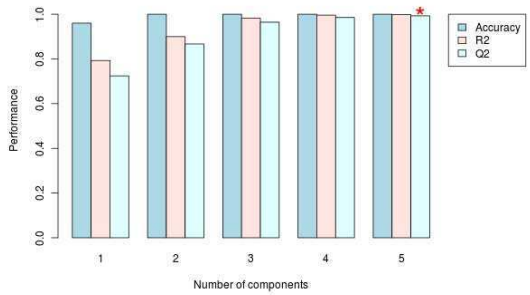
OA_GB_EGFR Quest



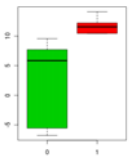
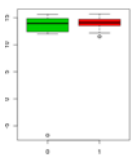
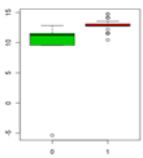
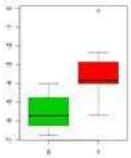
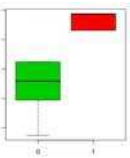
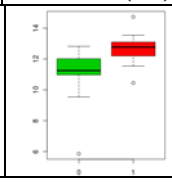








	Metabolito	Coef VIP
1	Hipotaurina (H-Tau)	3.6685
2	Lipido_1.2	1.7993
3	Glutamina (Gln)	1.3857
4	Dsconocido2	0.95181
5	Alanina (Ala)	0.91495
6	Glutamato (Glu)	0.75026
7	Lipidos_1.17	0.74828
8	Desconocido	0.68706
9	Lipido_2.02	0.63749
10	Fosfocolina (PCho)	0.58001
11	Glutation (GSH)	0.56064
12	Glicina (Gly)	0.52846
13	Lactato1	0.48928
14	Creatina (Cr)	0.47661
15	Lactato2	0.44917

H-Taurina (H-Tau)	Lip_1.2	Glutamina (Gln)	Desconocico 2	Alanina (Ala)	Glutamato (Glu)	
						**Quest**

0=normal, 1=amplificado