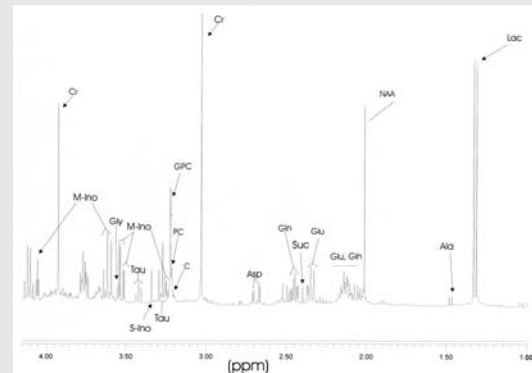
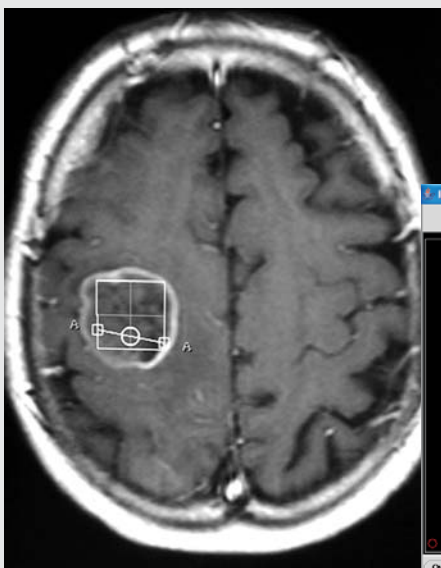




UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Contribució a la millora del diagnòstic i de la valoració pronòstica de tumors cerebrals humans



INTERPRET SV GUI - June 2004

Classify New Case

Visual Overview of Case Database

MR Spectra | MR Images | Clinical Record | Case Notes

No Overlay | Show Voxel Image | Show Long Echo MRS

STEAM
TE: 30ms
TR: 2000ms

Overview Key | Overview Description | Help

<input type="checkbox"/> Healthy Tissue	<input type="checkbox"/> Abscess	<input type="checkbox"/> Pilocytic Astro
<input type="checkbox"/> Astrocytoma 2	<input type="checkbox"/> Astrocytoma 3	<input checked="" type="checkbox"/> Glioblastoma
<input type="checkbox"/> Haemangioblastoma	<input type="checkbox"/> PNET	<input type="checkbox"/> Lymphoma
<input type="checkbox"/> Meningioma	<input checked="" type="checkbox"/> Metastases	<input type="checkbox"/> Oligoastrocytoma
<input type="checkbox"/> Oligodendroglioma	<input type="checkbox"/> Schwannoma	<input type="checkbox"/> Rare Types

MR Spectra | MR Images | Clinical Record | Case Notes

ID: I0452 | Pathology: Glioblastoma

Ana Paula Candiota Silveira
Setembre de 2004

Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**CONTRIBUCIÓ A LA MILLORA DEL
DIAGNÒSTIC I DE LA VALORACIÓ
PRONÒSTICA DE TUMORS CEREBRALS
HUMANS**

Memòria presentada per Ana Paula Candiota Silveira per optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques per la Universitat Autònoma de Barcelona

Aquest treball ha estat realitzat al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona sota la direcció del Dr. Carles Arús i Caraltó

Vist-i-plau del Director

Dr. Carles Arús i Caraltó

Ana Paula Candiota Silveira

Cerdanyola del Vallès, 30 de setembre de 2004.

*Al meu germà Márcio,
Que d'ençà que era una criatura als meus braços em té el cor robat.*

*I per a ell:
“One love, One blood, One life
You got to do what you should
One life with each other
Sisters, Brothers
One life but we're not the same
We get to carry each other”
(One Love, from U2)*

AGRAÏMENTS

Al dr. Carles Arús, per haver-me acceptat en el seu grup d'investigació i dirigit aquest treball en un moment molt important per a mi; per haver donat el seu recolçament sempre que he necessitat; i per la seva comprensió, generositat i paciència en totes les situacions personals i laborals que s'han plantejat.

Als col·legues del Grup d'Aplicacions Bioquímiques de la RMN, els "antics" com la M^a Rosa i Margarida, i als "semi-nous" com el Dani, Indira, Eva i Rui, i l'equip informàtic de primera línia, que són Lluís, Jordi Montero i Jordi Nebot i Guillem. Agraeixo al Guillem la paciència eterna, les moltes versions de prototip que m'ha adaptat i la bona voluntat que posa en tot el que fa. Als col·legues més antics, per tot el que hem arribat a compartir en aquest temps. Ells saben de tota la feina que surt aquí, i sobretot de la feina que no surt, però és igualment important. En especial la Maria Rosa, per compartir les coses bones i les no tan bones, i per donar-me ànims quan les coses no anaven bé. Sense la seva crítica constructiva, aquesta tesi no seria igual. Als col·legues nous, per la il·lusió que porten, i perquè ensenyant també se n'aprén, i per ser persones tan diversificades aportant una altra òptica als temes. Als col·legues que ja no hi son, com Katja, el Mohamed i el Dionisio, gent que ha deixat la seva marca en aquest laboratori i que s'en troba a faltar. En aquesta feina, hi ha una mica de cadascun d'ells. Dins d'aquest grup, mai no m'he sentit una estranya (ni molt menys una estrangera).

Al Miquel, per la imprescindible ajuda amb els interminables problemes de RMN i per tenir tanta paciència i idees originals per ajudar-me amb la feina experimental.

Als altres col·legues i professors del la Unitat de Bioquímica de Ciències, per l'amistat i l'acollida que sempre han tingut amb mi, en especial la Carme Espunya, la primera persona de fora del meu grup que m'ha fet sentir part integrant d'aquesta universitat ja al meu primer dia de feina.

Al dr. Carles Majós, de l'Institut de Diagnòstic per la Imatge de Bellvitge, per l'amable cessió de dades no publicades, per la interminable adquisició d'espectres de phantoms i per ajudar amb el tema de les anatomies patològiques, tot això sempre amb bona disposició i entusiasme; igualment agraeixo a altres membres de l'IDI la seva bona voluntat i aportació de coneixement.

Al dr. Juan José Acebes, per la gran empenta en la col·laboració en la recollida de biòpsies i líquids quístics, i a tot el personal del quiròfan de l'Hospital Prínceps d'Espanya, per la feina extra que representava la recollida i emmagatzemament de mostres.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología, per la concessió d'una beca predoctoral.

Als d'aquí, que m'han acollit a la seva família, a la Joana i al Sergi, per entendre tot el que això significa per mi; al Josep, que no ha pogut estar entre nosaltres pel final de la tesi, però estic segura que, des d'on sigui, m'acompanya; al Pere, per ser una font inesgotable de carinyo, força, paciència i comprensió, i per aquesta suma de petits detalls que li fa tan especial. Gràcies pel suport moral, per aguantar amb paciència les meves absències i horaris impossibles, i l'humor inestable que caracteritza el final d'una tesi.

I finalment, volia agrair molt als meus pares, la meva família, perquè no deixaran mai de sorprendre'm i donar-me lliçons d'amor sense límits, d'estabilitat, d'equilibri, d'esperança, de força de voluntat; el meu germà per ser el meu model, molt més del que ell pot arribar a imaginar, i per ser tan fort i tan lluitador. Agraïxo també a la Dani i la seva família, per dedicar-se tant al meu germà. Els dono gràcies a tots per saber fer els meus dies més lleugers amb somriure i motivació i per intentar estalviar-me de preocupacions, i entendre'm tan bé des de la distància. Igualment, gràcies per dipositar molta confiança en aquest treball, gairebé més que jo mateixa. Sense vosaltres, tota aquesta feina no hauria estat possible.

INDEX

1. INTRODUCCIÓ	3
1.1 RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR (RMN) – HISTÒRIC, EVOLUCIÓ I CONCEPTES BÀSICS	4
1.1.1 <i>El fenomen de la ressonància, desplaçament químic i acoblament</i>	5
1.1.2 <i>Temps de relaxació</i>	7
1.1.2.1 Temps de relaxació longitudinal (T_1)	7
1.1.2.2 Temps de relaxació transversal (T_2)	7
1.2 ERM I IRM: ESPECTROSCÒPIA I IMATGE PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA APLICADES AL DIAGNÒSTIC DE TUMORS CEREBRALS HUMANS	8
1.2.1 <i>IRM: Imatge per ressonància magnètica</i>	8
1.2.2 <i>ERM: espectroscòpia per ressonància magnètica</i>	10
1.2.2.1 Patrons espectrals esperats per a cervell normal	11
1.2.2.2 Espectroscòpia RMN d'alta resolució	13
1.2.2.3 Extractes amb àcid perclòric (PCA)	14
1.3 NEOPLÀSIES	15
1.3.1 <i>Tumors del sistema nerviós</i>	16
1.3.1.1 Classificació del càncer per graus i etapes	19
1.3.1.2 Descripció dels principals tipus de Tumors Cerebrals	21
A) Tumors Neuroepitelials	23
B) Tumors de Nervis Cranials i Espinals	25
C) Tumors Meningeals i mesenquimals	26
D) Limfoma	27
E) Tumors de la regió sellar	28
F) Metàstasis cerebrals d'altres tumors	28
1.3.1.3 Lesions pseudotumorals	29
1.3.1.4 Tumors amb formació de part cística	29
1.3.2 <i>Importància de la discriminació bilateral entre tipus tumorals</i>	31
1.3.3 <i>Incidència i epidemiologia dels diferents tipus de tumors cerebrals</i>	32
1.3.4 <i>Factors etiològics dels tumors cerebrals</i>	33
1.3.4.1 Factors genètics determinants en el desenvolupament de tumors cerebrals	33
1.3.4.2 Factors virals en el desenvolupament de tumors cerebrals	35
1.4 EL PROJECTE INTERPRET	36
1.4.1 <i>Objectius principals</i>	36
1.4.2 <i>Base de dades preliminar: ipDB</i>	36
1.4.3 <i>Reconeixement de Patrons en l'anàlisi de dades biomèdiques</i>	37
2. OBJECTIUS	41
3. MATERIALS I MÈTODES	45
3.1 OBTENCIÓ DE BIÒPSIES DE TUMORS HUMANS I LÍQUIDS CÍSTICS	45
3.2 PREPARACIÓ PRÈVIA DE LES MOSTRES PER ESPECTROSCÒPIA <i>EX VIVO</i>	46
3.2.1 Mostres líquides	46
3.3 PROTOCOL D'EXTRACCIÓ DEL TEIXIT AMB ÀCID PERCLÒRIC (PCA)	47
3.3.1 <i>Obtenció de l'extracte de biòpsies</i>	47
3.3.2 <i>Obtenció de l'extracte de líquids cístics</i>	49
3.4 PREPARACIÓ PRÈVIA DE LES MOSTRES PER ESPECTROSCÒPIA <i>IN VITRO</i>	49
3.4.1 <i>Reconstitució dels extractes per a RMN</i>	49
3.5 ESPECTROSCÒPIA <i>IN VIVO</i> (A CAMP CLÍNIC, 1,5T)	50
3.5.1 <i>Pacients</i>	50
3.5.1.1 Lesions cístiques	51
3.5.2 <i>Dissolucions model</i>	52
3.5.2.1 Preparació dels mostres model a estudiar	52
3.5.3 <i>Processament dels espectres in vivo de pacients i mostres model</i>	54
3.5.4 <i>Espectres promig</i>	57
3.6 ESPECTROSCÒPIA <i>EX VIVO</i> A ALT CAMP (9,4T) AMB BIÒPSIES INTACTES I MOSTRES DE LÍQUID CÍSTIC	58
3.6.1 <i>Calibració prèvia del capil·lar</i>	58
3.6.2 <i>Experiments de mesura de T_1</i>	58
3.6.3 <i>Experiments de mesura de T_2</i>	60

3.6.4	Obtenció dels espectres <i>spin-eco</i>	61
3.7	ESPECTROSCÒPIA <i>IN VITRO</i> AMB ELS EXTRACTES PCA DE BIÒPSIES DE TUMORS HUMANS I DE LÍQUIDS CÍSTICS	63
3.7.1	Obtenció dels espectres <i>pols-adquisició</i>	63
3.7.1.1	Processament dels espectres i càlcul de la concentració de metabòlits.....	64
3.7.1.2	Correcció de les pèrdues al procés d'extracció mitjançant la concentració de fumarat detectada per RMN.....	64
3.8	ANÀLISI DE PROTEÏNES AL SEDIMENT DE L'EXTRACTE PCA I ALS LÍQUIDS CÍSTICS	66
3.8.1	Dissolució prèvia dels sediments d'extractes PCA	66
3.8.2	Determinació de proteïnes als líquids cístics.....	67
3.8.3	Determinació de proteïnes als sediments d'extracció PCA pel mètode de Folin-Lowry	67
3.8.4	Normalització dels valors de metabòlits a la concentració de proteïna	68
3.9	ANÀLISIS QUÍMIQUES REALITZADES ALS LÍQUIDS CÍSTICS.....	68
3.9.1	Assaig de Periodat-Resorcinol per quantificar àcid siàlic	68
3.9.2	Test del carbazol per quantificar àcid hexurònic.....	69
3.10	PROCEDIMENTS RELACIONATS AL PROJECTE INTERPRET.....	70
3.10.1	Protocol d'entrada de dades a la <i>ipDB</i> : dades històriques i dades noves.....	71
3.10.2	Cerca i introducció de les imatges de referència absents de la <i>iDB</i>	73
3.10.3	Control de qualitat de les dades als prototips científic i industrial	74
3.11	TÈCNiques DE RECONeixEMENT DE PATRONS	77
3.11.1	Espectres <i>in vivo</i>	78
3.11.1.1	Grups de patologies.....	78
3.11.1.2	Format dels espectres	78
3.11.1.3	Tria de les variables.....	78
3.11.1.4	Anàlisi Discriminant Lineal (LDA, Linear Discriminant Analysis).....	79
3.11.2	Espectres <i>in vitro</i>	80
3.11.2.1	Tria de les variables i LDA	81
3.12	ANÀLISIS ESTADÍSTICS	81
3.12.1	Distribució normal dels valors: test <i>t</i> i ANOVA.....	81
3.12.1.1	Test <i>t</i> de student	81
3.12.1.2	ANOVA	82
3.12.2	Distribució no normal dels valors: test no paramètric	82
	RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	85
4.1	ESTUDIS AMB ELS LÍQUIDS CÍSTICS DE TUMORS CEREBRALS HUMANS.....	85
4.1.1	Espectroscòpia <i>In vivo</i>	88
4.1.2	Espectroscòpia <i>ex vivo</i> i mesures de T_2	89
4.1.3	Quantificació de la ressonància a 2,03 ppm als espectres <i>spin-eco</i>	93
4.1.4	Extractes PCA dels estàndards i líquids cístics	96
4.1.5	Determinacions químiques i de proteïnes als líquids cístics	99
4.1.5.1	Quantificació d'àcid hexurònic	100
4.1.5.2	Quantificació d'àcid siàlic.....	101
4.1.6	Resultats obtinguts amb reconeixement de patrons d'espectres de líquids cístics <i>in vivo</i>	106
4.1.6.1	Líquids cístics produïts per tumors benignes <i>versus</i> malignes <i>versus</i> abscessos	106
4.1.6.2	Comparació entre patró espectral de la part sòlida de tumors, parènquima cerebral normal i líquids cístics.....	108
4.2	ESTUDIS <i>IN VITRO</i> AMB ELS EXTRACTES DE LES BIÒPSIES SÒLIDES DE TUMORS CEREBRALS HUMANS: RESULTATS GENERALS	111
4.2.1	Distribució de les patologies i dades dels extractes.....	111
4.2.2	Anàlisi dels metabòlits quantificats.....	113
4.3	CORRELACIÓ ENTRE PATRONS ESPECTRALS <i>IN VIVO</i> , DISSOLUCIONS MODEL A CAMP CLÍNIC I DADES D'EXTRACTES DE BIÒPSIES <i>IN VITRO</i>	118
4.3.1	<i>Myo-Inositol</i> i <i>Glicina</i>	118
4.3.1.1	Estudis <i>in vivo</i> i amb dissolucions model.....	118
4.3.1.2	Estudis <i>in vitro</i>	124
	Inositol	124
	Glicina.....	127
4.3.1.3	Correlacions <i>in vivo-in vitro</i> i preguntes plantejades amb l'estudi d'extractes PCA.....	129
4.3.1.3.1	Gradació de tumors astrocítics	129
4.3.1.3.2	Glioblastomes primaris i secundaris.....	133

4.3.1.3.3 Discriminació entre astrocitomes de grau II i oligodendrogliomes	139
4.3.1.3.4 Hemangiopericitomes <i>versus</i> Meningiomes.....	141
4.3.1.3.5 Discriminació entre neurinomes i meningiomes	144
4.3.1.3.6 Glioblastoma <i>versus</i> metastasis.....	146
4.3.1.4 Reconeixement de patrons <i>in vivo</i> : introducció de la variable m-inositol/glicina	148
4.3.1.4.1 Inclusió del quocient RmI.gly/Cr a la classificació de tumors	148
4.3.1.4.2 Selecció de variables amb els casos d'entrenament del sistema.....	149
4.3.1.4.3 Anàlisi Discriminant Lineal (<i>Linear Discriminant Analysis</i> , LDA).....	150
4.3.1.5 Reconeixement de patrons <i>in vitro</i> : altres discriminacions bilaterals plantejades.....	154
4.3.1.5.1 Meningiomes vs neurinomes.....	154
4.3.1.5.2 Astrocitomes grau II vs oligodendrogliomes.....	155
4.3.1.5.3 Astrocitomes grau II vs Astrocitomes grau III vs glioblastomes.....	156
4.3.2 <i>Taurina</i>	157
4.3.2.1 Estudis <i>in vivo</i> i amb dissolucions model.....	157
4.3.2.2 Estudis <i>in vitro</i>	160
4.3.2.3 Correlacions <i>in vivo-in vitro</i> i preguntes plantejades amb l'estudi d'extractes PCA.....	161
4.3.2.3.1 Discriminació entre PNETs i astrocitomes de baix grau	161
4.3.2.4 Reconeixement de patrons <i>in vitro</i>	163
4.3.2.4.1 PNET vs A2	163
4.3.2.4.2 Glioblastomes vs. metastasis.....	164
4.3.3 <i>Glutamat i Glutamina</i>	165
4.3.3.1 Estudis <i>in vivo</i> i amb dissolucions model.....	165
4.3.3.2 Estudis <i>in vitro</i>	167
4.3.3.3 Correlacions <i>in vivo-in vitro</i> i preguntes plantejades amb l'estudi d'extractes PCA.....	169
4.3.3.3.1 Discriminació entre astrocitomes, oligodendrogliomes i oligoastrocitomes	169
4.3.3.4 Reconeixement de patrons <i>in vitro</i>	174
4.3.3.4.1 Astrocitomes grau II vs oligodendrogliomes vs oligoastrocitomes.....	174
4.3.4 <i>Altres metabòlits i correlacions in vivo/in vitro</i>	175
4.3.4.1 N-acetil aspartat (NAA)	175
4.3.4.2 Creatina	176
4.3.4.2.5 NAA, Creatina i la classificació tumor <i>versus</i> no tumor	178
4.3.4.3 Alanina	179
4.3.4.4 Colina i compostos relacionats.....	181
4.4 ANÀLISI DE PROTEÏNES AL SEDIMENT D'EXTRACCIÓ PCA.	184
4.5 RESULTATS DE LA COL·LABORACIÓ AMB EL PROJECTE INTERPRET	189
5. CONCLUSIONS	195
BIBLIOGRAFIA.....	201
ANNEX I: CLASSIFICACIÓ WHO DELS TUMORS DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL (2000)..	217
ANNEX II: FULL D'ENTRADA DE DADES A LA BASE DE DADES PRELIMINAR INTERPRET..	221
ANNEX III: DESCRIPCIÓ DE LES DADES AVALUADES EN CONTROL DE QUALITAT PER LA CERTIFICACIÓ DEL PROTOTIP INDUSTRIAL INTERPRET.....	223
ANNEX IV: FULL DE CONSENTIMENT INFORMAT PER OBTENCIÓ DE BIÒPSIES.....	225
ANNEX V: FULL DE CONSENTIMENT INFORMAT PREVI A L'EXPLORACIÓ IRM/ERM.....	227
ANNEX VI: CÀLCULS TEÒRICS PER LA PLANIFICACIÓ DE LES DISSOLUCIONS MODEL DE M-INO I GLY.....	229
ANNEX VII: PROTOTIP CIENTÍFIC INTERPRET	235
ANNEX VIII: ARTICLES	239

INDEX DE FIGURES

FIGURA 1.1: ZONES DE L'ESPECTRE ELECTROMAGNÈTIC.	5
FIGURA 1.2: INCLINACIÓ DEL VECTOR MAGNETITZACIÓ DE TOTA LA MOSTRA QUAN ELS NUCLIS ENTREN EN RESSONÀNCIA AMB LES ONES RF, SOTA UN CAMP MAGNÈTIC EXTERN.....	5
FIGURA 1.3: IMATGES EN TALL AXIAL PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA D'UN MATEIX PACIENT DIAGNOSTICAT DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME, PONDERADES EN A) T_1 , B) T_1 DESPRÉS DE L'ADMINISTRACIÓ DE CONTRAST, C) T_2 I D) DENSITAT DE PROTONS..	9
FIGURA 1.4: ESPECTRES REALITZATS AMB LA SEQÜÈNCIA PRESS A TE CURT I LLARG DE: A) CERVELL NORMAL D'UN VOLUNTARI I B) UN PACIENT DIAGNOSTICAT DE MENINGIOMA MENINGOTELIAL.....	11
FIGURA 1.5: PROCÉS ESQUEMÀTIC DE MIGRACIÓ D'UNA CÈL·LULA TUMORAL A TRAVÉS DE LA MATRIU EXTRACEL·LULAR (ECM) I INTRAVASAMENT AL CORRENT SANGUINI.....	16
FIGURA 1.6: INCIDÈNCIA DELS PRINCIPALS TIPUS DE TUMORS CEREBRAL EN INFANTS A) ENTRE 2 I 15 ANYS, I B) MENORS DE 2 ANYS.	17
FIGURA 1.7: INCIDÈNCIA (CASOS PER 100.000 HABITANTS) DE TUMORS DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL ALS DIFERENTS PAÏSOS DE LA COMUNITAT EUROPEA.	18
FIGURA 1.8: DISTRIBUCIÓ DE LA INCIDÈNCIA DE LESIONS INTRACEREBRALS.....	19
FIGURA 1.9: DISTRIBUCIÓ DELS PRINCIPALS TIPUS DE TUMORS CEREBRALS PRIMARIS AL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL SEGONS LA Taula 1.4	22
FIGURA 1.10: DISTRIBUCIÓ DELS TUMORS SEGONS ELS PRINCIPALS SUBGRUPS ANALITZATS EN AQUESTA SECCIÓ RESSALTANT EL PERCENTATGE QUE REPRESENTEN ELS TUMORS NEUROEPITELIALS.	23
FIGURA 1.11: DISTRIBUCIÓ DELS PRINCIPALS TUMORS ASTROCÍTICS.....	23
FIGURA 1.12: DISTRIBUCIÓ DELS TUMORS SEGONS ELS PRINCIPALS SUBGRUPS ANALITZATS EN AQUESTA SECCIÓ RESSALTANT EL PERCENTATGE QUE REPRESENTEN ELS TUMORS DE NERVIS CRANIALS I ESPINALS.	25
FIGURA 1.13: DISTRIBUCIÓ DELS TUMORS SEGONS ELS PRINCIPALS SUBGRUPS ANALITZATS EN AQUESTA SECCIÓ RESSALTANT EL PERCENTATGE QUE REPRESENTEN ELS TUMORS MENINGEALS I MESENQUIMALS.	26
FIGURA 1.14: PERCENTATGE OBSERVAT DE DIFERENTS TIPUS DE MENINGIOMES.	27
FIGURA 1.15: DISTRIBUCIÓ DELS TUMORS SEGONS ELS PRINCIPALS SUBGRUPS ANALITZATS EN AQUESTA SECCIÓ RESSALTANT EL PERCENTATGE QUE REPRESENTEN ELS LIMFOMES.	27
FIGURA 1.16: DISTRIBUCIÓ DELS TUMORS SEGONS ELS PRINCIPALS SUBGRUPS ANALITZATS EN AQUESTA SECCIÓ RESSALTANT EL PERCENTATGE QUE REPRESENTEN ELS TUMORS DE LA REGIÓ SELLAR.	28
FIGURA 1.17: IMATGE PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA, PESADA EN T_1 POST CONTRAST, D'UN TUMOR AMB FORMACIÓ CÍSTICA.....	30
FIGURA 3.1: ESQUEMA D'EXTRACCIÓ DE TEIXITS AMB PCA.....	48
FIGURA 3.2: MORTER D'ACER UTILITZAT PER A LES EXTRACCIONS EN ÀCID PERCLÒRIC	49
FIGURA 3.3: IMATGE PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA PESADA EN T_1 POST CONTRAST AMB EL VÒXEL DELIMITAT.	51
FIGURA 3.4: CONTENIDOR PER DISSOLUCIONS MODEL UTILITZAT EN L'ADQUISICIÓ DELS ESPECTRES DE METABÒLITS A 1,5 T	53
FIGURA 3.5: ERM DE CERVELL CONTROL D'UN VOLUNTARI, A) ESPECTRE DE METABÒLITS AMB ATENUACIÓ PARCIAL DEL SENYAL D'AIGUA, B) ESPECTRE DE L'AIGUA SENSE SUPRIMIR I C) RESULTANT DE LA DIVISIÓ DE A ENTRE B I LA CONSEQÜENT CORRECCIÓ DE LA FASE DE LES RESSONÀNCIES DE METABÒLITS.	55
FIGURA 3.6: ESPECTRE <i>IN VIVO</i> DE CERVELL CONTROL D'UN VOLUNTARI ABANS (A) I DESPRÉS (B) DEL FILTRAT DE LA RESSONÀNCIA DE L'AIGUA RESIDUAL AMB L'ALGORISME HLSVD.....	56
FIGURA 3.7: MESURA DE LES ALÇADES DELS PICS A 3,55 I 3,03 PPM ALS ESPECTRES DE LA DISSOLUCIÓ MODEL N.3 ([M-INO]/[GLY] = 0,25) EN UN ESPECTRE DE TE 30 MS.....	57
FIGURA 3.8: SEQÜÈNCIA DE POLSOS UTILITZADA EN L'ADQUISICIÓ DELS ESPECTRES PER A EXPERIMENTS DE CÀLCUL DE T_1	59
FIGURA 3.9: SEQÜÈNCIA DE POLSOS UTILITZADA EN L'ADQUISICIÓ DELS ESPECTRES PER A EXPERIMENTS DE CÀLCUL DE T_2	60
FIGURA 3.10: SEQÜÈNCIA DE POLSOS UTILITZADA PER ALS EXPERIMENTS SPIN-ECO	62
FIGURA 3.11: PERFIL D'EXCITACIÓ SINUSOÏDAL DE LA SEQÜÈNCIA JRSE.	62
FIGURA 3.12: SEQÜÈNCIA DE POLSOS UTILITZADA EN ELS ESPECTRES DE POLS-ADQUISICIÓ.....	63
FIGURA 3.13: EXEMPLE DE DECONVOLUCIÓ PER CÀLCUL D'ÀREES DE M-INO I GLY EN UN EXTRACTE PCA DE LA BIÒPSIA D'UN PACIENT DIAGNOSTICAT D'ASTROCITOMA DE GRAU II. B) ESPECTRE ORIGINAL I LORENTZIANES AJUSTADES A) ESPECTRE RESULTANT DE LA SUMA DE LES LORENTZIANES I C) RESIDUAL OBTINGUT DE L'AJUST D'AQUESTS 4 PICS.....	66
FIGURA 3.14: EXEMPLE DE PANTALLES A) DEL MENÚ PRINCIPAL, B) DE LA PANTALLA D'ENTRADA DE DADES DELS PACIENTS A LA IPDB I C) DE LA PANTALLA D'EXPORTACIÓ DE CASOS.	72

FIGURA 3.15: A I B: EXEMPLES DE PANTALLA DEL PROGRAMARI PER LA CONSTRUCCIÓ DELS PAQUETS PER INTRODUIR IMATGES A LA IDB.....	75
FIGURA 3.16: ORGANIGRAMA DE LES DIRECTRIUS SEGUIDES EN EL CONTROL DE QUALITAT DE LES DADES	77
FIGURA 4.1: IRM D'UN PACIENT DIAGNOSTICAT D'HEMANGIOBLASTOMA, AMB EL VÒXEL A DINS DEL LÍQUID CÍSTIC SENSE CONTAMINACIÓ DE LA PART SÒLIDA. A BAIX, A) ESPECTRE <i>IN VIVO</i> (PRESS 136 MS) DEL VÒXEL QUE S'ENSENYA A IRM. ESPECTRES A 9,4T (TE=136 MS) B) <i>EX VIVO</i> DEL LÍQUID CÍSTIC OBTINGUT D'AQUEST PACIENT I C) <i>IN VITRO</i> , DE L'EXTRACCIÓ PCA REALITZADA D'AQUEST LÍQUID.	86
FIGURA 4.2: SEGMENTS DE L'ESPECTRE DE RMN DE ¹ H DE POSSIBLES COMPONENTS DE LA RESSONÀNCIA D'INTERÈS.....	87
FIGURA 4.3: ESPECTRES <i>IN VIVO</i> (TE = 136 MS, PRESS) DE LA PART CÍSTICA DE DOS HEMANGIOBLASTOMES (PACIENTS HB1 I HB2).	88
FIGURA 4.4: ESPECTRES PROMIG <i>IN VIVO</i> (TE = 136 MS, PRESS) DE LA PART CÍSTICA DE DIFERENTS TUMORS DE LA BASE DE DADES INTERPRET. S'HAN FORMAT ARBITRÀRIAMENT TRES GRUPS PER INSPECCIÓ VISUAL DE L'ESPECTRE.....	89
FIGURA 4.5: ESPECTRE ¹ H-RMN A 9,4 T DEL LÍQUID CÍSTIC DEL PACIENT HB2, AMB UNA SEQÜÈNCIA DE POLS-ADQUISICIÓ	90
FIGURA 4.6: ESPECTRES <i>EX VIVO</i> I <i>IN VITRO</i> (DESPRÉS D'EXTRACCIÓ PCA) DE LES MOSTRES DE LÍQUID CÍSTIC DE A) ASTROCITOMA PILOCÍTIC AP1; B) METÀSTASIS ME1; C) GLIOBLASTOMA MULTIFORME GB1; D) CRANIOFARINGIOMA CF2 I E) HEMANGIOBLASTOMA HB2.	91
FIGURA 4.7: CORBES RESULTANTS DELS EXPERIMENTS DE CÀLCUL DE T ₂ PER ALS ESTÀNDARDS ANALITZATS I UNA MOSTRA-PROBLEMA (HB2).....	92
FIGURA 4.8: EXEMPLE D'INTEGRACIÓ PER CÀLCUL DE L'ALÇADA DE LA RESSONÀNCIA NAC A UN ESPECTRE DE LÍQUID CÍSTIC (AP1)	95
FIGURA 4.9: <i>BOXPLOT</i> DELS VALORS DE LACTAT CALCULAT <i>IN VITRO</i> (MM) ALS LÍQUIDS CÍSTICS PROVINENTS DE TUMORS MALIGNES I BENIGNES.....	99
FIGURA 4.10: EXEMPLES DE RECTA PATRÓ OBTINGUDES ALS ANÀLISIS D'ÀCID HEXURÒNIC (ESQUERRA) I ÀCID SIÀLIC (DRETA) EN EL RANG D'INTERÈS DE LES MOSTRES CONSIDERADES	100
FIGURA 4.11: RECTA DE CALIBRACIÓ PER A LA QUANTIFICACIÓ D'ÀCID SIÀLIC EN UNA MOSTRA QUAN ES FA SERVIR COM A ESTÀNDARD L'ÀCID SIÀLIC O LA MUCINA.....	102
FIGURA 4.12: "UNIVERS" DELS CASOS D'ESPECTRES <i>IN VIVO</i> DE LÍQUIDS CÍSTICS A TE LLARG (136 MS) AL PROTOTIP CIENTÍFIC INTERPRET, A) LDA AMB 6 VARIABLES I B) LDA AMB 3 VARIABLES.....	107
FIGURA 4.13: A L'ESQUERRA, DISPOSICIÓ DELS CASOS D'ESPECTRES <i>IN VIVO</i> A TE LLARG (136 MS) DE TUMORS, PARÈNQUIMA CEREBRAL NORMAL I LÍQUIDS CÍSTICS AL PROTOTIP CIENTÍFIC INTERPRET, A) LDA AMB 11 VARIABLES INICIALS I B) LDA AMB 6 VARIABLES.	110
FIGURA 4.14: REPRESENTACIÓ PERCENTUAL DE LES DIFERENTS PATOLOGIES TUMORALS DE LES BIÒPSIES ESTUDIADES.....	112
FIGURA 4.15: FRAGMENT (0-4,1 PPM) D'ESPECTRE ¹ H A 9,4T D'EXTRACTE PCA DE LA BIÒPSIA DEL PACIENT 179, DIAGNOSTICAT D'ASTROCITOMA GRAU III, AMB LES PRINCIPALS ASSIGNACIONS ESPECTRALS.	114
FIGURA 4.16: <i>BOXPLOT</i> DEL QUOCIENT DELS PICS 3,55/3,03 A TE CURT I LLARG (R M _I ,GLY/CR) PER QUATRE TIPUS DE TUMOR GLIAL DE LA BASE DE DADES DEL PROJECTE INTERPRET.	119
FIGURA 4.17: ESPECTRES PROMIG ± SD A TE LLARG (135 MS, ESQUERRA) I TE CURT (20-32 MS, DRETA) DE TUMORS ASTROCÍTICS DE DIVERSA MALIGNITAT DE LA BASE DE DADES INTERPRET.	121
FIGURA 4.18: VALOR DEL QUOCIENT 3,55/3,03 ALS DOS TE PER LES DISSOLUCIONS MODEL DE CONCENTRACIÓ VARIABLE DE M-INO I GLY.	125
FIGURA 4.19: EXEMPLES D'ESPECTRES DE LES DISSOLUCIONS MODEL PER A LA CORBA DE M-İNOSITOL I GLICINA ([M-INO]/[GLY]=10). A) TEMPS D'ECO CURT (30MS) I B) TEMPS D'ECO LLARG (136MS).	125
FIGURA 4.20: PROMIG ± SEM DELS VALORS DE M-INO I S-INO PER ALS DIFERENTS TIPUS TUMORALS.	126
FIGURA 4.21: PROMIG ± SEM DELS VALORS DE GLICINA PER ALS DIFERENTS TIPUS TUMORALS.....	128
FIGURA 4.22: PANTALLA DEL PROTOTIP CIENTÍFIC INTERPRET. ES REPRESENTEN ELS TUMORS ASTROCÍTICS. GLIOBLASTOMES; ASTROCITOMES GRAU III; ASTROCITOMES GRAU II. LES ABCISSES REPRESENTEN L'ALÇADA DE LA RESSONÀNCIA A 3,57 PPM (M-INO, GLY) I LES ORDENADES, L'ALÇADA DE LA RESSONÀNCIA A 3,03 (CREATINA).....	130
FIGURA 4.23: <i>BOXPLOT</i> DE VALORS <i>IN VITRO</i> QUE SIMULEN EL QUOCIENT 3,55/3,03 ALS DOS TE QUE S'ESPERARIA PELS TUMORS ASTROCÍTICS	131
FIGURA 4.24: COMPARACIÓ DELS VALORS OBTINGUTS PER A M-INO (ESQUERRA) I GLY (DRETA) AMB VALORS DE LA LITERATURA	131
FIGURA 4.25: <i>BOXPLOT</i> DE VALORS QUE SIMULEN EL QUOCIENT R _{M_I} ,GLY/CR QUE S'OBTINDRIA <i>IN VIVO</i> EN LES CÈL·LULES C6 A PARTIR DE VALORS <i>IN VITRO</i>	133
FIGURA 4.26: PANTALLA DEL PROTOTIP CIENTÍFIC INTERPRET REPRESENTANT NOMÉS ELS GLIOBLASTOMES. ABCISSA: ALÇADA A 3,57 PPM. ORDENADA: ALÇADA A 3,03 PPM.	134

FIGURA 4.27: HISTOGRAMA DE LA DISTRIBUCIÓ DE FREQUÈNCIES PER ALS VALORS DEL $[M-INO]/[GLY]$, A) PER ALS VALORS CALCULATS <i>IN VITRO</i> I B) DEL QUOCIENT $[M-INO]/[GLY]$ CALCULAT A PARTIR DE L'EQUACIÓ SIGMOIDAL, DEL QUOCIENT RMI_{GLY}/CR ALS GLIOBLASTOMES <i>IN VIVO</i> .	136
FIGURA 4.28: HISTOGRAMES DE DISTRIBUCIÓ DELS VALORS DE CONCENTRACIÓ DE GLICINA (A) I M-INO (B) ALS EXTRACTES DE BIÒPSIES.	137
FIGURA 4.29: ERM <i>IN VIVO</i> A) TE CURT (31 MS); B) TE LLARG (136 MS); C) <i>EX VIVO</i> HR-MAS, POLS I ADQUISICIÓ; D) <i>EX VIVO</i> HR-MAS CPMG (FILTRE T_2), DE DOS GLIOBLASTOMES PRIMARIS (PRIM1, PRIM2) I UN SECUNDARI (SEC).	138
FIGURA 4.30: <i>BOXPLOT</i> DELS VALORS OBTINGUTS PER M-INO $\mu\text{MOL}/\text{GTF}$ PER PER ASTROCITOMES DE GRAU II (N=7) I OLIGODENDROGLIOMES (N=6).	140
FIGURA 4.31: PANTALLA DEL PROTOTIP CIENTÍFIC D'INTERPRET DE LA REPRESENTACIÓ ENTRE ASTROCITOMES DE GRAU II I OLIGODENDROGLIOMES. EIX X: 3,57 PPM. EIX Y: 3,03 PPM.	140
FIGURA 4.32: PANTALLA DEL PROTOTIP CIENTÍFIC INTERPRET, REPRESENTANT LA DISCRIMINACIÓ QUE S'ACONSEGUEIX ENTRE MENINGIOMES VS UN HEMANGIOPERICITOMA, UTILITZANT LA RESSONÀNCIA A 3,55 PPM A L'EIX DE LES ABCISSES I A 3,03 PPM A L'EIX DE LES ORDENADES.	142
FIGURA 4.33: ESPECTRES ALS DOS TE DEL MATEIX CAS D'HEMANGIOPERICITOMA (I0274) QUE S'ENSENYA A LA FIGURA 4.32.	143
FIGURA 4.34: REPRESENTACIÓ DELS VALORS DE HEMANGIOPERICITOMES I MENINGIOMES <i>IN VITRO</i> (M-INO+GLY)/(C+PC+GPC).	143
FIGURA 4.35: REPRESENTACIÓ AL PROTOTIP CIENTÍFIC INTERPRET DE MENINGIOMES I NEURINOMES. EIX X: ALÇADA A 3,57 PPM (M-INO, GLY). EIX Y: ALÇADA A 3,03 PPM (CREATINA).	145
FIGURA 4.36: VALORS TROBATS PER M-INO A NEURINOMES I MENINGIOMES.	145
FIGURA 4.37: PANTALLA DEL PROTOTIP CIENTÍFIC (Y= 1,29/3,03 PPM; X=3,55/3,03 PPM A TE 20-32 MS) ON S'ENSENYA LA DISCRIMINACIÓ EMPÍRICA D'UN PETIT SUBGRUP DE GLIOBLASTOMES NO NECRÒTICS DE LES METÀSTASIS.	147
FIGURA 4.38: REPRESENTACIÓ DE LES DUES FUNCIONS CALCULADES PEL PROGRAMA SPSS PER LA CLASSIFICACIÓ DELS ESPECTRES DE TE CURT PER LDA. BENIGNES N=38; AGRESSIU N=135; MENINGIOMES N=67.	149
FIGURA 4.39: REPRESENTACIÓ DE LES DUES FUNCIONS CALCULADES PEL PROGRAMA SPSS PER LA CLASSIFICACIÓ DELS ESPECTRES <i>IN VIVO</i> PER LDA (NOMÉS ELS ESPECTRES AMB DOS TE).	152
FIGURA 4.40: REPRESENTACIÓ DE LES DUES FUNCIONS CALCULADES PEL PROGRAMA SPSS PER LA CLASSIFICACIÓ DELS ESPECTRES <i>IN VIVO</i> PER LDA (NOMÉS ELS ESPECTRES AMB DOS TE; INCLUSIÓ FORÇADA DE LES VARIABLES TRIADES I TAMBÉ DEL QUOCIENT RMI_{GLY}/CR).	153
FIGURA 4.41: REPRESENTACIÓ GRÀFICA DE L'ANÀLISI DISCRIMINANT LINEAL EFECTUADA NOMÉS AMB ELS TUMORS ASTROCÍTICS. A) MÈTODE D'INCLUSIÓ PER PASSOS I LLIURE TRIA DE VARIABLES; B) VARIABLES FORÇADES JUNTAMENT AMB EL QUOCIENT RMI_{GLY}/CR .	154
FIGURA 4.42 : RESULTAT OBTINGUT AMB ANÀLISI DISCRIMINANT LINEAL ENTRE MENINGIOMES (MM) I NEURINOMES (NE) UTILITZANT ELS VALORS DE METABÒLITS <i>IN VITRO</i> .	155
FIGURA 4.43: REPRESENTACIÓ OBTINGUDA EN L'ANÀLISI DISCRIMINANT LINEAL ENTRE ASTROCITOMES DE GRAU II (A2) I OLIGODENDROGLIOMES (OD) <i>IN VITRO</i> .	156
FIGURA 4.44: REPRESENTACIÓ ESPACIAL DE LES PUNTUACIONS OBTINGUDES EN L'ANÀLISI DISCRIMINANT DE TUMORS ASTROCÍTICS <i>IN VITRO</i> . A) TOTS ELS METABOLITS MESURATS I B) TOTS ELS METABOLITS MÉS EL QUOCIENT $[M-INO]/[GLY]$.	157
FIGURA 4.45: ESPECTRE PRESS, 136 MS (1,5T) DE A) SOLUCIÓ MODEL DE TAURINA (100MM) BARREJADA AMB ACETAT (20MM) I B) PACIENT I0377 DE LA IDB, DIAGNOSTICAT DE LIMFOMA MALIGNA.	158
FIGURA 4.46: ESPECTRE PRESS, 30 MS (1,5T) DE TAURINA.	159
FIGURA 4.47: FRAGMENT DE L'ESPECTRE DE ^1H A 9,4T DE L'EXTRACTE PCA DE LA BIÒPSIA DEL PACIENT I0377, DEL QUAL S'ENSENYA ESPECTRE <i>IN VIVO</i> A LA FIGURA 4.45B.	160
FIGURA 4.48: PROMIG \pm SEM DELS VALORS DE TAURINA PER ALS DIFERENTS TIPUS TUMORALS.	161
FIGURA 4.49: <i>BOXPLOT</i> DELS VALORS DE TAURINA ($\mu\text{MOL}/\text{GTF}$) PER ASTROCITOMES DE GRAU II I PNETs.	162
FIGURA 4.50: FRAGMENT D'ESPECTRES ^1H A 9,4T D'EXTRACTES PCA DE BIÒPSIES DE A) PACIENT 96907, DIAGNOSTICAT DE PNET I B) PACIENT 192, DIAGNOSTICAT D'ASTROCITOMA GRAU II.	162
FIGURA 4.51: REPRESENTACIÓ OBTINGUDA AMB ANÀLISI DISCRIMINANT LINEAL ENTRE PNETs (MB) I ASTROCITOMES DE GRAU II (A2), <i>IN VITRO</i> .	163
FIGURA 4.52: REPRESENTACIÓ OBTINGUDA AMB ANÀLISI DISCRIMINANT LINEAL ENTRE GLIOBLASTOMES I METÀSTASIS, <i>IN VITRO</i> .	164
FIGURA 4.53: ESPECTRES DE DISSOLUCIONS MODEL REALITZATS A 1,5T AMB SEQÜÈNCIA PRESS A 136 MS AMB A) GLUTAMAT I ACETAT, B) GLUTAMINA I ACETAT. C) ESPECTRE PROMIG REALITZAT AMB LA SUMA DELS DOS ANTERIORS. D) ESPECTRE <i>IN VIVO</i> AMB LA MATEIXA SEQÜÈNCIA REALITZAT AL PACIENT I0375, DIAGNOSTICAT DE MENINGIOMA. E) ESPECTRE DE L'EXTRACTE PCA REALITZAT AMB LA BIÒPSIA DEL PACIENT I0375.	166

FIGURA 4.54: PROMIG \pm SEM DELS VALORS DE GLUTAMAT, GLUTAMINA I GABA PER ALS DIFERENTS TIPUS TUMORALS.....	168
FIGURA 4.55: <i>BOXPLOTS</i> DELS VALORS DE METABÒLITS CALCULATS ($\mu\text{MOL/GTF}$) PER ASTROCITOMES DE GRAU II, (A2, N=7) OLIGODENDROGLIOMES (OD, N=6) I OLIGOASTROCITOMES (OA, N=3).....	171
FIGURA 4.56: PANTALLES DEL PROTOTIP CIENTÍFIC INTERPRET ON ES REPRESENTEN A) ELS TUMORS ASTROCÍTICS, OLIGODENDROGLIALS, OLIGOASTROCÍTICS I B) ASTROCÍTICS MÉS OLIGODENDROGLIALS. LA REPRESENTACIÓ ES FA UTILITZANT A) ALÇADA A 3,55 PPM EN L'ORDENADA I A 2,38 EN L'ABSCISSA I B) ALÇADA A 3,57 PPM EN L'ORDENADA I 2,77 PPM EN L'ABSCISSA.	172
FIGURA 4.57: COMPARACIÓ ENTRE ELS VALORS OBTINGUTS EN AQUESTA TESI I A LA LITERATURA. A DALT, OLIGODENDROGLIOMES. A BAIX, ASTROCITOMES DE GRAU II.....	173
FIGURA 4.58: REPRESENTACIÓ GRÀFICA DE LES PUNTUACIONS OBTINGUDES EN L'ANÀLISI DISCRIMINANT D'ASTROCITOMES, OLIGODENDROGLIOMES I OLIGOASTROCITOMES <i>IN VITRO</i>	174
FIGURA 4.59: PROMIG \pm SEM DELS VALORS DE NAA PER ALS DIFERENTS TIPUS TUMORALS.	176
FIGURA 4.60: ESPECTRES A TE LLARG (A) I CURT (B) DE GLIOMATOSIS CEREBRI.....	176
FIGURA 4.61: PROMIG \pm SEM DELS VALORS DE CREATINA PER ALS DIFERENTS TIPUS TUMORALS.....	177
FIGURA 4.62: COMPARACIÓ ENTRE ELS VALORS OBTINGUTS EN AQUESTA TESI PER CREATINA ($\mu\text{MOL/GTF}$) AMB VALORS DE LA LITERATURA.	178
FIGURA 4.63: EXEMPLE DE PANTALLA DEL PROTOTIP INTERPRET I LA REPRESENTACIÓ ALÇADA NAA VS. ALÇADA CREATINA.	179
FIGURA 4.64: PROMIG \pm SEM DELS VALORS D'ALANINA PER ALS DIFERENTS TIPUS TUMORALS.....	180
FIGURA 4.65: PROMIG \pm SEM DELS VALORS DE COLINA LLIURE, FOSFOCOLINA, GLICEROFOSFOCOLINA I COLINA TOTAL PER ALS DIFERENTS TIPUS TUMORALS.	182
FIGURA 4.66: COMPARACIÓ DELS PERCENTATGES DE LA "COLINA TOTAL" OBTINGUTS PELS DIFERENTS METABÒLITS DE COLINA PER TUMORS ASTROCÍTICS DE BAIX GRAU (GRAU II, ESQUERRA) I ALT GRAU (GRAU III + GB, DRETA) ENTRE ELS VALORS OBTINGUTS EN AQUEST TREBALL I ELS VALORS CITATS PER LA LITERATURA.....	183
FIGURA 4.67: ESQUEMA DE VIA METABÒLICA AMB ELS DIFERENTS ROLS DE PC I GPC EN LA SÍNTESI I DEGRADACIÓ DE LA FOSFATIDILCOLINA DE LES MEMBRANES BIOLÒGIQUES.	183
FIGURA 4.68: <i>BOXPLOT</i> DELS VALORS PER A PROTEÏNA QUANTIFICADA EN SEDIMENT RESIDUAL DESPRÉS DE L'EXTRACCIÓ AMB PCA.	186
FIGURA 4.69: <i>BOXPLOT</i> DELS VALORS DE PROTEÏNES DE TOTS ELS TUMORS SÒLIDS <i>VERSUS</i> ELS LÍQUIDS CÍSTICS.	186
FIGURA 4.70: <i>BOXPLOT</i> RELACIONANT LA QUANTITAT DE PROTEÏNA MG/GTF AMB EL GRAU ASTROCÍTIC.	187
FIGURA 4.71: <i>BOXPLOT</i> RELACIONANT LA QUANTITAT DE PROTEÏNA DETECTADA I EL GRAU DE CEL·LULARITAT DEL TUMOR.	189
FIGURA 4.72: EXEMPLE DE PANTALLA DE LA IDB (BASE DE DADES DEFINITIVA), AMB UN EXEMPLE DE CONSULTA SEGONS ELS CRITERIS QUE DETERMINA L'USUARI.	190
FIGURA 4.73: PANTALLA DE LA IDB: RESULTAT DE LA CONSULTA QUE S'ENSENYA A LA FIGURA ANTERIOR.	191

INDEX DE TAULES

TAULA 1.1: PRINCIPALS METABÒLITS DETECTATS EN TUMORS I ALTRES PATOLOGIES CEREBRALS PER ERM <i>IN VIVO</i> I ELS SEUS DESPLAÇAMENTS QUÍMICS.	13
TAULA 1.2: CLASSIFICACIÓ DELS TUMORS CEREBRALS PRIMARIS SEGONS LA CÈL·LULA D'ORIGEN.	20
TAULA 1.3: GRAU TUMORAL, TEMPS ESTIMAT DE SUPERVIVÈNCIA I PRINCIPALS REPRESENTANTS DE CADA GRAU.	21
TAULA 1.4: INCIDÈNCIA DELS DIFERENTS TIPUS DE TUMORS SEGONS EL REGISTRE DEL CÀNCER DE TARRAGONA (UTILITZAT COM A REFERÈNCIA PER CATALUNYA), ELS CASOS RECOLLITS A LA BASE DE DADEN INTERPRET I ALTRES REFERÈNCIES.	22
TAULA 1.5: FACTORS DE RISC ESTUDIATS EN RELACIÓ A TUMORS CEREBRALS PRIMARIS.	34
TAULA 3.1: NOMBRE DE MOSTRES UTILITZADES EN AQUEST TREBALL.	46
TAULA 3.2: VOLUMS DE RECONSTITUCIÓ DELS EXTRACTES PCA LIOFILITZATS.	50
TAULA 3.3: PARÀMETRES D'ADQUISICIÓ PELS PROTOCOLS D'ADQUISICIÓ <i>IN VIVO</i>	52
TAULA 3.4: VALORS (MM) EMPRATS PER LA CORBA DE CALIBRACIÓ A SER REALITZADA AMB MOSTRES MODEL DE GLY I M-INO.	54
TAULA 3.5: VALORS PER A LA RECTA PATRÓ DE L'ASSAIG DE L'ÀCID GLUCURÒNIC.	69
TAULA 4.1: PATOLOGIES DELS TUMORS QUE PRODUÏEN ELS LÍQUIDS CÍSTICS RECOLLITS A NEUROCIRURGIA.	90
TAULA 4.2: TEMPS DE RELAXACIÓ TRANSVERSAL AJUSTATS A UN COMPORTAMENT BIEXPONENCIAL MESURATS PER MOSTRES REPRESENTATIVES DE CADA PATOLOGIA TUMORAL, I PERCENTATGE DE CONTRIBUCIÓ DEL SENYAL A 2,03 PPM A TE=0MS, CALCULAT AMB EL PROGRAMA SIGMAPLOT.	92
TAULA 4.3: VALORS OBTINGUTS ALS EXPERIMENTS DE T ₂ AMB ELS DIFERENTS ESTÀNDARDS I PROMIG DELS LÍQUIDS CÍSTICS.	93
TAULA 4.4: CONCENTRACIÓ DE GRUPS N-ACETIL A 2,03 PPM MESURADA PER RMN DELS DIFERENTS LÍQUIDS CÍSTICS.	95
TAULA 4.5: SOLUBILITAT EN PCA 0,5M DELS DIFERENTS ESTÀNDARDS I DELS LÍQUIDS CÍSTICS.	96
TAULA 4.6: SOLUBILITAT EN PCA 0,5M DEL COMPONENT NAC DE LES MOSTRES DE LÍQUIDS CÍSTICS. ABBREVIATURES COM A LA TAULA 4.4.	97
TAULA 4.7: VALORS OBTINGUT PER A LA QUANTIFICACIÓ DE LACTAT A L'EXTRACTE PCA.	98
TAULA 4.8: VALORS OBTINGUTS A L'ANÀLISI DE PROTEÏNA DELS LÍQUIDS CÍSTICS.	100
TAULA 4.9: VALORS UTILITZATS PER A LA RECTA PATRÓ UTILITZADA A L'ASSAIG D'ÀCID SIÀLIC.	101
TAULA 4.10: VALORS OBTINGUTS PER LA QUANTIFICACIÓ DE LA RESSONÀNCIA NAC PER RMN, PER L'ANÀLISI D'ÀCID HEXURÒNIC I ÀCID SIÀLIC ALS LÍQUIDS CÍSTICS, AIXÍ COM EL PERCENTATGE GLOBAL, JUSTIFICAT PER AQUESTES DUES DETERMINACIONS, DEL TOTAL QUANTIFICAT PER RMN.	102
TAULA 4.11: VARIABLES TRIADES PER A LA DISCRIMINACIÓ ENTRE LÍQUIDS CÍSTICS DE TUMORS BENIGNES I/M MALIGNES I/S ABSCESSOS; CORRELACIÓ AMB PPM, COEFICIENTS EN X I Y I POSSIBLE EXPLICACIÓ METABÒLICA.	106
TAULA 4.12: VARIABLES TRIADES PER A LA DISCRIMINACIÓ ENTRE PART SÒLIDA DE TOTS ELS TUMORS, PARÈNQUIMA CEREBRAL NORMAL I LÍQUIDS CÍSTICS, I POSSIBLE EXPLICACIÓ METABÒLICA.	109
TAULA 4.13.A: VALORS OBTINGUTS ALS EXTRACTES PCA DE LES BIÒPSIES ANALITZADES.	115
TAULA 4.13.B: VALORS OBTINGUTS ALS EXTRACTES PCA DE LES BIÒPSIES ANALITZADES.	116
TAULA 4.14: ASSIGNACIONS I MULTIPLICITAT DELS PRINCIPALS METABÒLITS OBSERVABLES A ESPECTRES <i>IN VITRO</i> DE TUMORS I ALTRES PATOLOGIES CEREBRALS HUMANES.	117
TAULA 4.15: VALORS DE T ₁ I T ₂ DE LA LITERATURA PER M-INO, CR I GLY <i>IN VIVO</i> , I VALORS EXPERIMENTALS DEL GRUP PER A T ₁ I T ₂ EN EXTRACTES PCA.	122
TAULA 4.16: VALORS TEÒRICS (CÀLCUL, ANNEX VI) I EXPERIMENTALS (DISSOLUCIÓ MODEL) OBTINGUTS AMB EL QUOCIENT R MI ₂ GLY/CR.	122
TAULA 4.17: VALORS OBTINGUTS EXPERIMENTALMENT PER AL QUOCIENT 3,55/3,03 QUOCIENT OBTINGUT A PARTIR DEL CÀLCUL AMB LA FUNCIÓ SIGMOIDAL AJUSTADA.	123
TAULA 4.18: VALORS CALCULATS DEL QUOCIENT [M-INO]/[GLY] (MITJA ± SEM) A PARTIR DE LA FUNCIÓ SIGMOIDAL AJUSTADA (EQ. 4.5).	124
TAULA 4.19: QUOCIENTS M-INO/S-INO (MITJA +/- SEM) OBTINGUDES AMB ELS VALORS CALCULATS A L'EXTRACTE PCA DELS TUMORS ASTROCÍTICS.	127
TAULA 4.20: TOTAL INICIAL D'ESPECTRES AL GRUP D'ENTRENAMENT DEL SISTEMA DE CLASSIFICACIÓ, I TOTAL POSTERIOR A LA REDUCCIÓ DEL GRUP DESPRÉS DE REDUIR-LO ALS ESPECTRES AMB 2 TE I QUALITAT ESPECTRAL ACCEPTABLE.	149
TAULA 4.21: VARIABLES AMB MILLOR CORRELACIÓ OBTINGUDES EN LES COMPARACIONS ENTRE ELS DIFERENTS TIPUS TUMORALS. ES PRESENTEN LES VARIABLES ASSIGNADES PEL PROGRAMA, CORRESPONDÈNCIA EN PPM I COEFICIENT DE CORRELACIÓ (VALOR ABSOLUT).	150
TAULA 4.22: VARIABLES TRIADES PEL SPSS AMB LA CLASSIFICACIÓ REALITZADA NOMÉS AMB ELS ESPECTRES QUE TENEN DOS TE. LA LDA ES FA AMB LES VARIABLES D'ESPECTRES DE TE CURT.	151

TAULA 4.23: VARIABLES TRIADES LLIUREMENT PEL SISTEMA EN UNA CLASSIFICACIÓ DISCRIMINANT, AMB INTRODUCCIÓ DE LES VARIABLES AMB MÉS CORRELACIÓ I EL QUOCIENT RMI, GLY/CR.....	152
TAULA 4.24: GRUPS FORMATS SEGONS LA CAPACITAT PROLIFERATIVA DEL TUMOR PER A LA COMPARACIÓ DEL CONTINGUT EN METABÒLITS DE COLINA.	181
TAULA 4.25: VALORS DE PROTEÏNA MG/GTF PER A LES DIFERENTS PATOLOGIES ANALITZADES EN AQUESTA TESI (N=94) I LES PROCESSADES PRÈVIAMENT AL GABRMN(N=63).	185
TAULA 4.26: VALORS TROBATS EN EL TEST DE PROTEÏNES REALITZAT AMB 5 PARTS DIFERENTS D'UN MATEIX MENINGIOMA.	187
TAULA 4.27: GRAUS DE CEL·LULARITAT ATRIBUÏTS ALS DIFERENTS TUMORS.	188

Abreviatures :

A	Àrea
Aa	Aminoàcids
A2	Astrocitoma grau II
A3	Astrocitoma grau III
Ac	Àcetat
ala	Alanina
ANOVA	Analysis of Variance (anàlisi de la variança)
aq	Temps d'adquisició del senyal
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
B₀	Camp magnètic principal
BD	Base de dades
C, PC, GPC	Colina, Fosfocolina, Glicerofosfocolina
cc	centímetre cúbic
CDP	Centre Diagnòstic Pedralbes
CF	Craniofaringioma
CSI	Chemical shift imaging
CSF	Factor estimulator de colònies
CSFR	Receptor per al factor estimulant de colònies
CSU	Ciutat Sanitària i Universitària
δ	Desplaçament químic
d1	Interval entre polsos (alta resolució)
d2	Interval de temps variable (alta resolució)
D3	Interval de temps corresponent a TE/2 en seqüències de Jump and Return Spin Echo
db	Decibelis
DICOM	Digital Imaging Communication In Medicine
dl	Decilitre
DSS	Decision-Support System (Sistema de recolçament al diagnòstic)
ECM	Extracel·lular matrix (matriu extracel·lular)
eq.	Equació
EGF	Factor de creixement epidèrmic
EGFR	Receptor per al factor de creixement epidèrmic
ERM	Espectroscòpia de ressonància magnètica
FID	Free Induction Decay (esmoreïment de la força electromotriu induïda)
g	Acceleració de la gravetat
GABA	Àcid gama amino butíric
GABRMN	Grup d'Aplicacions Bioquímiques de la RMN
GAG	Glicosaminoglicans
GB	Glioblastoma multiforme
Gd	gadolini
GE	General Electric
gln	glutamina
glu	glutamat
glx	Resultant de glutamat + glutamina
gly	glicina
gtf	grams de teixit fresc
GUI	Graphical user interface (Interfície gràfica per usuaris d'ordinador)
HLSVD	Hankel Lanczos Singular Value Decomposition
HR-MAS	High Resolution Magic Angle Spinning
HUB	Hospital Universitari de Bellvitge
Hz	Hertz
ICD-O	Classificació Internacional de Malalties per Oncologia (International classification of diseases for oncology)
iDB	INTERPRET database
IDI	Institut de Diagnòstic per la Imatge
INTERPRET	International Network for Pattern Recognition of Tumours Using Magnetic Resonance
ipDB	INTERPRET preliminary database

IQR	Interquartil range (rang interquartil)
IRM	Imaginologia de ressonància magnètica
J	Constant d'acoblament
JPEG	Joint Photographic Experts Group
JRSE	Jump and return spin echo
K-S	Kolmogorov-Smirnov
lac	Lactat
LB	Line broadening (factor d'eixamplament)
LCR	Líquid cefalorraquidi
LDA	Linear discriminant analysis (Anàlisi discriminant lineal)
LOO	Leave-one-out (<i>dejar-uno-fuera</i>)
MI	Myo-inositol
M₀	Magnetització inicial
M₀	Magnetització inicial
MM	Meningioma meningotelial
MRUI	Magnetic Resonance User Interface
M_{XY}	Magnetització al llarg de l'eix XY
M_Z	Magnetització al llarg de l'eix Z
NAA	N-acetil aspartat
NAC	Compostos amb grup N-acetil
NF2	Gen neurofibromin 2
NHC	nombre d'història clínica
NS	Nombre d'enregistraments
O1	Offset 1
O2	Offset 2
OA	Oligoastrocitoma
OD	Oligodendrogloma
p1, p2, p3	Polsos calculats per a seqüències d'alta resolució
p18	Pols de presaturació
PBS	Phosphate Buffered Saline (amortidor de fosfat sòdic)
PCA	Àcid perclòric
PD	Proton density (densitat de protons)
PNET	Primitive Neuroectodermal Tumour
PQE	Pharma Quality Europe
ppm	Parts per milió
PR	Pattern Recognition (reconeixement de patrons)
PRESS	Point RESolved Spectroscopy
RF	Radiofreqüència
RMN	Ressonància Magnètica Nuclear
RmI, gly/Cr	Quocient de les ressonàncies [3,55/3,03 TE curt]/[3,55/3,03 TE llarg]
rpm	Revolucions per minut
SEM	Standard error of the mean (error estàndar)
SeRMN	Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la UAB
SD	Standard deviation (desviació estàndar)
SIDA	Síndrome d'immunodeficiència adquirida
s-Ino	Escil·lo Inositol
SNC	sistema nerviós central
SNR	Signal-to-noise ratio (quocient senyal/soroll)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SQL	Structured Query Language
STEAM	STimulated Echo Acquisition Mode
Suc	Succinat
SV	Single Voxel (Vòxel únic)
SW	Sweep Width (amplada d'escombrat)
T	Tesla
t	Temps
T₁	Temps de relaxació longitudinal
T₂	Temps de relaxació transversal
T₂*	Temps de relaxació transversal efectiu
T_{2A}, T_{2B}	T ₂ calculat per diferents components d'una ressonància

TAC	Tomografia axial computeritzada
tau	Taurina
TCA	Cicle dels àcids tricarbòxics
TD	Time domain (domini del temps)
TE	Temps d'eco
TM	Temps de mescla
TMA	Trimetilamines
TR	Temps de reciclatge
TSP	3-trimetilsilil- 2,2,3,3- tetradeuteropropionat sòdic
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
UMCN	University Medical Center Nijmegen
VD	variable delay (interval de temps variable)
WHO	World Health Organization

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

La neoplàsia és una de les malalties que causen una elevada mortalitat en la població mundial. Les estadístiques demostren que en Espanya, a pesar de que és un dels països amb menor incidència de càncer dins Europa, cada any es veuen afectades unes 150.000 persones, de les quals només una tercera part sobreviurà a la malaltia. (Rojo, 1995). En total, aproximadament 22% de les morts es deuen al càncer en la societat occidental (Cotran i col, 1990).

Els tumors cerebrals primaris son relativament poc freqüents, si comparats a altres càncers com el de pulmó, pit o colorrectal, però tot i així constitueixen una important causa de mort i discapacitat (Bernstein i Berger, 2000a). Són responsables del 20% dels tumors malignes diagnosticats abans dels 15 anys. Els tumors cerebrals humans totalitzen més o menys un 10% dels tumors primaris, sent responsables per 2% de les morts (Louis, 1978).

Bernstein i Berger (2000a) afirmen que la incidència i mortalitat degut a tumors cerebrals en països desenvolupats ha augmentat molt (aproximadament 300%) en relació a dècades anteriors, sobretot en les persones de 75 anys o més. La millora en els mètodes diagnòstics, com la tomografia axial computadoritzada i la ressonància magnètica, sumat a un canvi d'actitud en relació al diagnòstic en les persones grans, podrien ser parcialment responsables per aquest increment. És possible que l'augment de l'esperança de vida de la població també contribueixi, ja que la prevalència d'alguns tipus de tumors cerebrals va augmentant proporcionalment amb l'edat.

Altres malalties cerebrals, com per exemple hematoma subdural, abscessos, hidrocefalia, hipertensió intracranial benigna, leucoencefalopatia progressiva multifocal, esclerosi múltiple, malformació vascular, infart cerebral, mal de Alzheimer i algunes anomalies congènites, poden mimetitzar els senyals i símptomes dels tumors cerebrals. Algunes d'aquestes entitats clíniques tenen característiques morfològiques distintes als tumors i poden ser diferenciades d'aquests mitjançant imatge per ressonància magnètica (IRM); d'altres no, com per exemple abscessos, lesions inflamatòries, malalties desmielinitzants, hamartomes i anomalies congènites (Kaye i Laws, 2001a), d'aquí la gran utilitat de la espectroscòpia per ressonància magnètica (ERM) que pot diferenciar força bé tipus tumorals que tenen característica d'imatge semblant i és important, ja que la orientació terapèutica en un cas i altre pot ser bastant diferent.

La ressonància magnètica és actualment el mètode d'elecció per diagnosticar tumors cerebrals humans, i s'està estudiant molt el valor afegit de l'ERM quan s'avalua conjuntament amb IRM per aconseguir un diagnòstic en estadis més inicials de la malaltia, així com per una millor distinció entre els tipus tumorals.

1.1 Ressonància Magnètica Nuclear (RMN) – Històric, evolució i conceptes bàsics

En 1945, dos grups de físics, de manera independent, - Purcell, Torrey i Pound a Harvard i Bloch, Hansen i Packard a Stanford - van observar per primer cop el fenomen de la ressonància magnètica nuclear (citada a Günther, 1995). S'ha observat un fort desenvolupament de la tècnica en les dècades de 60, 70 i 80 i actualment la RMN és molt utilitzada com a mètode no invasiu d'obtenció d'imatges clíniques i estudi del metabolisme de manera no invasiva i no destructiva (Gadian, 1982). El premi Nobel de fisiologia i medicina concedit l'any de 2003 a Paul C. Lauterbur i Peter Mansfield, pels descobriments realitzats en el camp de la imatge per ressonància magnètica, reforça la importància d'aquesta tècnica i reconeix el seu desenvolupament en tots aquests anys.

La RMN és una branca de l'espectroscòpia que actua en la regió de l'espectre electromagnètic entre 10^7 i 10^9 Hz (figura 1.1), a la zona de les ones de ràdio. Les transicions energètiques són de baix nivell i les ones magnètiques penetren membranes i teixits amb poca interferència amb els teixits biològics (Campbell i Dwek, 1984), per això és el que s'en diu una *tècnica no destructiva*, ja que permet estudiar mostres intactes. Amb aquesta tècnica es poden detectar una certa varietat de nuclis que proporcionen informacions diverses sobre la mostra a estudiar, com ^{31}P (informacions sobre el metabolisme energètic), ^1H (present en pràcticament totes les molècules d'interès biològic), ^{13}C (poc abundant, però es pot fer seguiment de molècules enriquides amb aquest isòtop), ^{19}F (permet el seguiment d'algunes drogues d'interès), i també altres nuclis menys utilitzats però d'alt interès en aplicacions concretes (^{23}Na , ^{17}O , ^{39}K).

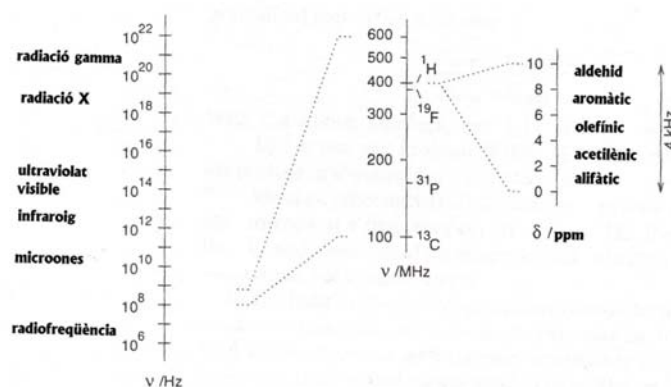


Figura 1.1: Zones de l'espectre electromagnètic. La RMN es situa a la zona de baixes freqüències, a la zona de la radiofreqüència. Figura adaptada de Hore, 1995

1.1.1 El fenomen de la ressonància, desplaçament químic i acoblament

La RMN es basa en el fenomen de ressonància que es dona quan s'aplica una radiació electromagnètica d'una freqüència determinada sobre nuclis que es troben sotmesos a un camp magnètic. Els nuclis amb electrons o protons desaparellats com ^1H tenen característiques magnètiques. Quan s'aplica un camp magnètic B_0 als nuclis, aquests, degut a les seves propietats magnètiques (moment magnètic), s'alineen en relació al camp aplicat, amb un petit excés en el sentit del camp.

Quan s'aplica el pols de radiofreqüència (RF), aquesta "magnetització global" es desplaça en un cert angle; la intensitat del pols d'excitació es descriu segons l'angle que desplaça la magnetització de la mostra (figura 1.2).

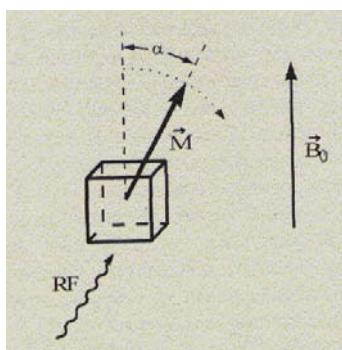


Figura 1.2: Inclinació del vector magnetització (\vec{M}) de tota la mostra quan els nuclis entren en ressonància amb les ones RF, sota un camp magnètic extern (\vec{B}_0)

Després que el pols de RF deixa d'actuar, el sistema comença a relaxar i la tornada de la magnetització de la mostra a l'estat inicial produeix un senyal electromagnètic al detector, que es recull, s'amplifica i que constitueix la FID (*Free Induction Decay*), que és la resultant ("l'interferograma") de les freqüències de ressonància individuals dels nuclis presents. L'anàlisi de Fourier permet distingir els seus diferents components en el domini de les freqüències, resultant en un espectre de RMN.

Aquesta tècnica és molt versàtil, ja que pot detectar diferents nuclis; a més, nuclis idèntics però situats en diferents entorns químics presenten petites desviacions de la seva freqüència de ressonància (freqüència de Larmor) ja que el camp magnètic a que es troben sotmesos és lleugerament diferent del camp magnètic principal. Aquestes desviacions són de l'ordre de parts per milió de la freqüència de ressonància central del tipus de nucli considerat, i és el que s'en diu *desplaçament químic*.

A més del desplaçament químic, un altre concepte important en RMN és la interacció entre nuclis adjacents dins d'una mateixa molècula (també es diu acoblament i ve determinat per la constant J). El comportament d'un nucli individual és influenciat pels nuclis veïns, i l'efecte és el desdoblament de la ressonància en diferents freqüències. Aquest acoblament entre diferents nuclis té una important conseqüència en experiments amb seqüències d'eco ja que causa canvis en la fase relativa dels components de freqüència desdoblada, depenent dels paràmetres emprats. Això és el que usualment es diu *modulació* i tindrà molta importància en apartats d'aquesta tesi com 4.3.1 i 4.3.2.

Una tècnica de baixa sensibilitat. El camp magnètic B_0 interacciona feblement amb els nuclis, el que explica la baixa sensibilitat de la tècnica. Un augment en B_0 augmentaria la interacció d'aquest amb els nuclis, i com a conseqüència l'absorció d'energia i el senyal obtingut amb aquesta tècnica. La RMN *in vivo*, però, presenta limitacions per a aquest augment, com l'escalfament dels teixits per absorció de radiacions de radiofreqüència, directament relacionat amb la força del camp magnètic (Schellock, 1996a); factors relacionats a la salut del pacient com malalties i medicaments també poden contribuir-hi (citats a Schellock, 1996b).

Les referències Gadian, 1982; Friebolin, 1993 i Günther, 1995 amplien més la descripció de les bases teòriques i les aplicacions de la RMN.

1.1.2 Temps de relaxació

Just després del pols de radiofreqüència que excita la mostra i desplaça la magnetització inicial, tenen lloc els processos de relaxació longitudinal i transversal, amb constants de temps respectivament T_1 i T_2 . Els temps de relaxació estan molt influïts pel medi químic on es troben els nuclis (Gili i Capdevila, 1992).

1.1.2.1 TEMPS DE RELAXACIÓ LONGITUDINAL (T_1)

Amb la relaxació longitudinal, T_1 , es mesura la velocitat en que el sistema recupera la seva magnetització inicial després del pols de RF; 1 T_1 equival a una recuperació de 63,2% de la magnetització inicial. La velocitat amb la qual es recupera la magnetització al llarg de l'eix Z obeeix a la equació següent:

$$M_z = M_0 \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) \right] \quad \text{eq 1.1}$$

On M_z és la magnetització detectada a l'eix Z, paral·lel a la direcció del camp magnètic principal; M_0 és la magnetització inicial, abans del pols de RF aplicat; t és el temps transcorregut després de la irradiació inicial de la mostra i T_1 és la constant de relaxació longitudinal.

És important tenir present el factor T_1 perquè si la magnetització no es recupera totalment a l'interval entre polsos RF, hi ha una atenuació artefactual del senyal. La força del camp magnètic també influencia els temps de relaxació, principalment T_1 , per això quan s'informen valors de T_1 i T_2 , s'ha de referir també el camp magnètic utilitzat (Gili i Capdevila, 1992a).

1.1.2.2 TEMPS DE RELAXACIÓ TRANSVERSAL (T_2)

El valor en equilibri de la magnetització transversal, M_{xy} (perpendicular a B_0), és zero. Quan s'aplica un pols, es desplaça la magnetització, observant-se una coherència en la precessió dels moments magnètics individuals, i M_{xy} passa a tenir un valor diferent de zero. Com cada nucli present a la mostra està experimentant un camp magnètic B_0 lleugerament diferent i cadascun gira a la seva pròpia freqüència de Larmor, la magnetització neta comença el seu desfase a la fi del pols d'excitació. La constant T_2 (temps de relaxació transversal, temps de relaxació spin-spin) descriu el retorn de la magnetització M_{xy} a l'equilibri inicial.

Pot ser definida com el temps necessari per a que 63% de la magnetització transversa sigui perduda per desfase. Dos factors contribueixen a la disminució de la magnetització transversa: interaccions moleculars (relaxació T_2 intrínseca) i variacions en B_0 (relaxació T_2 degut a factors instrumentals). La combinació dels dos factors és la que efectivament resulta en la disminució de la magnetització transversa. La constant dels dos factors combinats s'anomena T_2^* .

La equació 1.2 descriu aquesta variació de la magnetització transversal amb el temps

$$M_{XY} = M_{XY,0} e^{-\frac{t}{T_2}} \quad \text{eq. 1.2}$$

Ambdós processos T_1 i T_2 tenen lloc simultàniament, amb la única restricció de que T_2 sigui igual o més petit que T_1 : la magnetització en el pla XY disminueix fins zero i la magnetització longitudinal creix, ja que s'observa al llarg de l'eix Z .

1.2 ERM i IRM: espectroscòpia i imatge per ressonància magnètica aplicades al diagnòstic de tumors cerebrals humans

La informació obtinguda per RMN és explotada en dues branques a la biomedicina: per obtenir informació respecte als constituents del teixit analitzat (espectroscòpia) o bé per obtenir informació anatòmica (imatge). És igualment possible combinar les dues tècniques per obtenir informació espacial de la química del teixit (Segebarth i col, 1990) i molt útil també per donar informació sobre la heterogeneïtat dels tumors (Preul i col, 1998; de Elenyi i col, 2000). La IRM és una tècnica de imatge usada principalment en medicina per produir imatges d'excel·lent qualitat de l'interior del cos humà. Està basada en els principis de la ressonància magnètica nuclear, però degut a la mala connotació de la paraula, es va suprimir la paraula 'nuclear' renomenant la tècnica com a 'Imatge per Ressonància Magnètica' (Hornak, 1996). Des d'aleshores, la IRM ha avançat més enllà de la imatge per tomografia, produint imatges de petits volums d'interès, sobretot per la gran millora de contrast en l'anàlisi de teixits tous.

1.2.1 IRM: Imatge per ressonància magnètica

El protó és el nucli més utilitzat en IRM per dues raons principals: la seva abundància al cos humà, i el gran moment magnètic que posseeix. La principal diferència entre ERM i

IRM es que la primera dóna informació química/metabòlica i la segona dóna informació espacial. La qualitat de la informació en una imatge ve donada pel grau de contrast, o sigui, les àrees clares – (hiperintenses) *versus* les àrees fosques – (hipointenses). En IRM, protons de l'aigua en diferents entorns biofísics son distingits pel contrast a la imatge. D'aquesta manera, els diferents teixits d'un pacient poden ser identificats.

Els tres principals mecanismes intrínsecs que controlen el contrast de les imatges son T_1 , T_2 i densitat de protons a la mostra. Per produir imatges amb eficiència, els paràmetres son elegits normalment per “ponderar la imatge” en un mecanisme de contrast i evitar els altres dos el màxim possible.

Agents de Contrast: L'ús d'agents de contrast en molts casos millora la sensibilitat i/o especificitat. Són captats pels teixits en determinades situacions patològiques i alteren la resposta del teixit (relaxació dels protons de l'aigua) als camps magnètics, i això destaca l'estructura d'interès dels demés òrgans en la IRM. Els principals agents de contrast utilitzats en RMN *in vivo* són els agents que contenen gadolini (Gd).

La figura 1.3 presenta un exemple de cada tipus d'imatge comentat, més una imatge ponderada en T_1 després de l'administració d'agents de contrast.

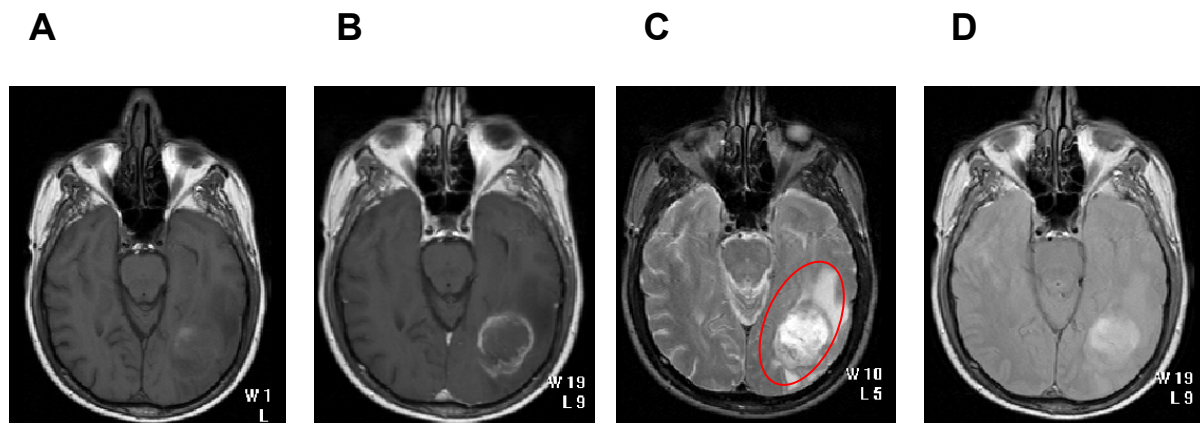


Figura 1.3: Imatges en tall axial per ressonància magnètica d'un mateix pacient diagnosticat de glioblastoma multiforme, ponderades en A) T_1 , B) T_1 després de l'administració de contrast, C) T_2 i D) densitat de protons. L'elipse vermella en “C” encercla la zona patològica.

1.2.2 ERM: espectroscòpia per ressonància magnètica

La ERM és una tècnica que pot mesurar de manera no invasiva la concentració de metabòlits tissulars. A més, pot mesurar variacions qualitatives i quantitatives d'aquests metabòlits, tenint gran potencial per proveir informació clínica respecte al metabolisme tumoral i resposta a la teràpia en pacients i en models animals d'una patologia. Per visualitzar més clarament les ressonàncies d'interès, el senyal de l'aigua és generalment suprimit o atenuat i la regió analitzada és triada evitant el màxim possible la contaminació per lípids subcutanis (Bernstein i Berger, 2000b). Les tècniques espectroscòpiques han estat desenvolupades per obtenir espectres de regions seleccionades dins del cervell i poden ser combinades amb tècniques addicionals per obtenir un espectre únic per a cada regió (vòxel únic) o un conjunt d'espectres per la regió d'interès (multivòxel), o bé combinada amb la informació obtinguda per MRI (MRSI, *Magnetic resonance spectroscopic imaging*) (Segebarth i col, 1990).

Els primers estudis per ERM *in vivo* s'han realitzat amb registre d'espectres de ^{31}P , mentre l'aplicació de la espectroscòpia ^1H ha estat més tardana perquè hi havia el problema del senyal molt intens que s'obtenia de H_2O i emmascarava els demés senyals (Gili i Capdevila, 1992b). L'aigua intracel·lular està present en una concentració de 40–55 M, depenent del teixit, mentre la concentració dels metabòlits d'interès biològic observables directament per ERM es troba aproximadament entre 1-30 mM, el que representa una diferència de 3-4 ordres de magnitud. Altre problema es la presència, en determinats teixits, de concentracions molt elevades de lípids que originen també senyals intensos a l'espectre. Un inconvenient afegit és que totes les ressonàncies apareixen en un interval reduït de desplaçament químic, d'uns 10 ppm, el que ocasiona un gran solapament d'aquestes. D'aquí la utilitat dels estudis "*in vitro*", comentats a l'apartat següent, en l'assignació i quantificació de ressonàncies detectades *in vivo*. En els últims 10 anys, un gran nombre d'estudis de espectroscòpia ^1H han estat realitzats (Bruhn i col, 1989; Demaerel i col, 1991; Kugel i col, 1992; Howe i col, 1993; Usenius i col, 1994a; Hagberg i col, 1995; Castillo i col, 1998) i han demostrat dramàtiques diferències de patró espectral entre teixits normals i tumorals com també es pot veure a la figura 1.4 La sensibilitat de la ERM és limitada per la resolució espacial relativament baixa (1 ml), però la introducció de noves bobines i sistemes de més alt camp magnètic podrien millorar aquest aspecte. Igualment és necessari un quocient senyal/soroll adequat sense augmentar massa el temps d'adquisició, per evitar incomoditat i

movements del pacient a l'interior de l'espectròmetre, cosa que amb volums d'adquisició massa petits és difícil aconseguir. Considerant que els beneficis clínics de la ERM comencen a ser acceptats, aquesta metodologia ja fa part del protocol d'exploració clínica de tumors cerebrals en moltes institucions (Bernstein i Berger, 2000b). La taula 1.1 recull els principals compostos determinats per ERM *in vivo* i els seus desplaçaments químics.

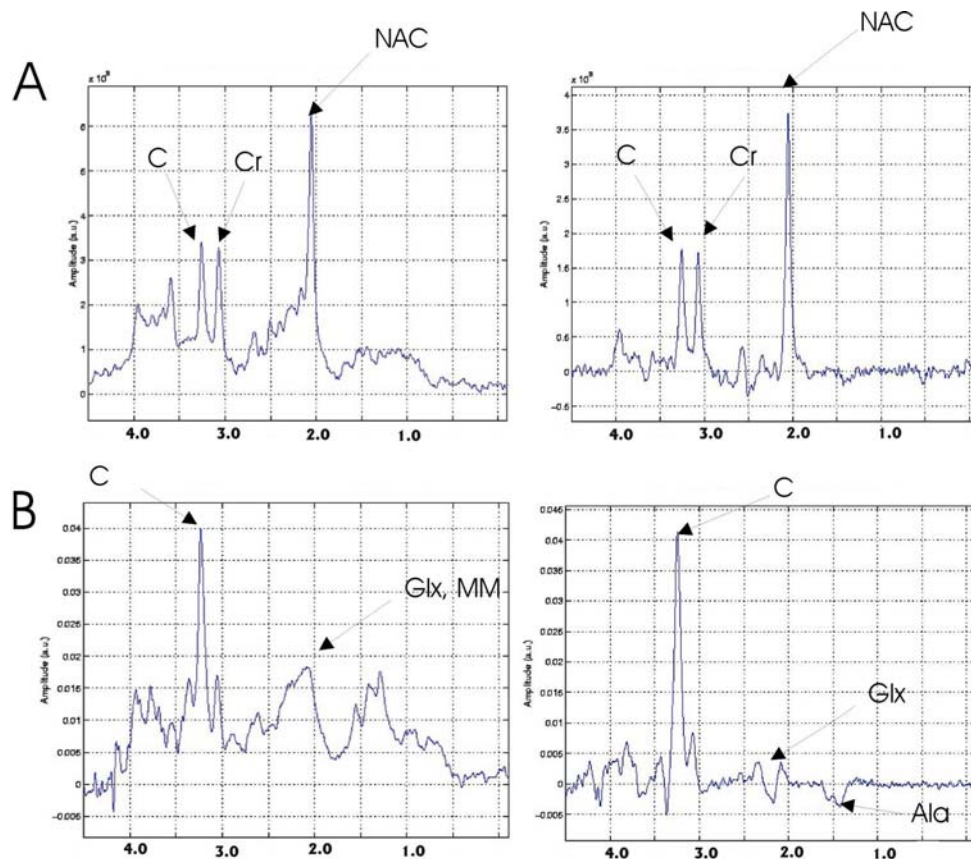


Figura 1.4: Espectres realitzats amb la seqüència PRESS a TE curt, 30 ms (esquerra) i TE llarg, 136 ms (dreta) de: A) cervell normal d'un voluntari (cas I1193) i B) un pacient diagnosticat de meningioma meningotelial (cas I0212), agafats de la base de dades del projecte INTERPRET. Notar les diferències senyalades per les fletxes en els punts a 2,03 ppm (N-acetil, NAC), 3,03 ppm (creatina, Cr), 3,2 ppm (colina, C), 1,48 ppm (alanina, Ala), 2,1 ppm (glu/gln, Glx i macromolècules, MM).

1.2.2.1 PATRONS ESPECTRALS ESPERATS PER A CERVELL NORMAL

L'espectroscòpia ^1H del cervell normal té un patró característic que és bastant diferent del que s'observa en tumors tant de baix com alt grau, en abscessos o lesions cístiques. Altres patologies, com les desmielinitzants, malaltia d'Alzheimer i patologies degeneratives de cervell, presenten canvis menys notables i de diferent magnitud. El cervell normal presenta un

patró del tipus que es veu il·lustrat a la figura 1.4 A. Els principals pics que es veuen representats són:

- *NAA* (N-acetil aspartat), singlet a 2,03 ppm, reconegudament un marcador neuronal. Com la majoria dels tumors són d'origen no-neuronal, aquest és un metabòlit que està generalment disminuït als tumors. Al cervell normal és el pic predominant i el de més intensitat.
- *Metabòlits de colina*, a aproximadament 3,21 ppm. Abarca senyals de colina, fosfocolina i glicerofosfocolina, entre altres. Als tumors es veu augmentat per l'augment de la proliferació que s'observa en aquests i a causa de la major producció de membranes necessàries per a aquesta proliferació.
- *Creatina i fosfocreatina*, a 3,03 ppm, metabòlits associats al metabolisme energètic de les cèl·lules. La proporció entre els pics de creatina i colina al cervell normal és, aproximadament, de 1:1. Generalment en tumors es veu en concentracions inferiors al cervell normal.
- *Myo-inositol* a 3,55 ppm. És considerat un osmolit i també precursor de segons missatgers derivats de fosfatidilinositol, observat a TE curt, representant aproximadament la meitat del pic de colina. A TE llarg (136 ms), degut a la modulació, no s'aprecia quasi a l'espectre de cervell normal.
- *Glutamat/Glutamina/GABA*, multiplets observats conjuntament a TE curt entre 2 i 2,4 ppm. En determinats tipus tumorals es poden veure augmentats, com als meningiomes.

Altres possibles metabòlits no s'observen, bé degut a la seva baixa concentració o bé degut al T_2 relativament curt. Els tumors i altres patologies poden presentar metabòlits diferents o modificacions entre les alçades relatives dels pics de metabòlits observats al cervell normal, d'aquí la gran utilitat de l'espectroscòpia per detectar canvis que no poden ser detectats per IRM.

δ (ppm)	Metabòlit
0,05-2,50	Lípids (vàries ressonàncies, les principals a 0,9 i 1,3 ppm)
1,33	Lactat
1,47	Alanina
1,90	Acetat
2,03	N-acetil aspartat
2,10	Glutamat, glutamina
2,30	GABA
2,37	Glutamat
2,47	Glutamina
2,60	N-acetil aspartat
2,80	Aspartat
3,03	Creatina, fosfocreatina
3,21	Colina, fosfocolina, glicerofosfocolina
3,30	Taurina
3,40	Glucosa
3,55	Inositol, glicina
3,75	Glutamat, glutamina
3,80	Glucosa
3,93	Creatina, fosfocreatina

Taula 1.1: principals metabòlits detectats en tumors i altres patologies cerebrals per ERM *in vivo* i els seus desplaçaments químics (adaptada de Gili i Capdevila, 1992b).

1.2.2.2 ESPECTROSCÒPIA RMN D'ALTA RESOLUCIÓ

La espectroscòpia d'alta resolució és molt útil per l'estudi de mostres biològiques degut a la quantitat d'informació que permet obtenir. És un mètode no selectiu, el que vol dir que es poden detectar metabòlits no esperats però dels quals es pot treure informació d'interès. Actualment hi ha nombrosos treballs publicats utilitzant aquesta tècnica, ja sigui l'estudi d'extractes perclòrics de biòpsies (Gill i col, 1990, Kinoshita i Yokota, 1997), extractes perclòrics de cultius cel·lulars (Florian i col, 1995), fluids corporals (Nicholson i col, 1983; Bell i col, 1989; Agar i col, 1991; Nicholson i Foxall, 1995; Schiller i col, 1996). Moltes vegades s'estudia la totalitat de la mostra (sense extracció), el que s'anomena espectroscòpia *ex vivo* (Kuesel i col, 1994; Rutter i col, 1995). Una altra important tècnica d'alta resolució és la espectroscòpia *ex vivo* 'High-Resolution Magic Angle Spinning' (HR-MAS), on es pot utilitzar la biòpsia intacta, i que aconsegueix una millor resolució degut a altes velocitats de gir de la mostra i l'aplicació de "angle màgic" (Grant i Harris, 1996), amb

l'aventatge de poder reutilitzar la mostra per anatomia patològica (Cheng i col, 1998; Barton i col, 1999) o per posterior extracció de metabòlits solubles en àcid perclòric. L'espectroscòpia d'alta resolució, tant *in vitro* com *ex vivo*, és àmpliament utilitzada per a l'assignació de les ressonàncies i interpretació dels espectres *in vivo* (Rèmy i col, 1994).

1.2.2.3 EXTRACTES AMB ÀCID PERCLÒRIC (PCA)

Els extractes de metabòlits hidrossolubles de teixits en àcid perclòric són utilitzats per molts autors (Bárány i Glonek, 1982; Peeling i Sutherland, 1992; Usenius i col, 1994b; Sutton i col, 1994; Kinoshita i col, 1994; Chang i col, 1995; Carpinelli i col, 1996; Maxwell i col, 1998; Czernicki i col, 2000); s'obtenen per tractament de la mostra (normalment polvoritzada) amb aquest àcid, amb consegüent precipitació de proteïnes, macromolècules i lípids, mentre els metabòlits hidrossolubles de baix pes molecular romanen en dissolució.

Aquest mètode, contràriament a la RMN *in vivo*, és un mètode que necessita biòpsia prèvia i és invasiu, però per altra banda presenta una sèrie d'avantatges addicionals:

- Millora la homogeneïtat del camp magnètic en la zona de la mostra, per això les ressonàncies són més estretes i resoltes;
- Amb la possibilitat de fer servir camps magnètics més alts, millora la resolució de les ressonàncies.
- Proporciona la capacitat de seleccionar el tipus de metabòlits d'interès, exclouent de l'anàlisi ressonàncies amples de macromolècules que dificulten la quantificació dels metabòlits. Avui se sap que hi ha algunes proteïnes de petit pes molecular que romanen dissoltes a l'àcid perclòric (Kauppinen i col, 1993), però la majoria són precipitades i no interfereixen amb l'anàlisi.
- Permet quantificacions absolutes de metabòlits per addició d'una substància estàndard de concentració coneguda.
- Es pot suprimir més fàcilment el senyal de l'aigua ja que aquesta pot ser substituïda per $^2\text{H}_2\text{O}$, que no dona senyal en el ventall de freqüències observat.

1.3 Neoplàsies

Són un complex grup d'estats patològics en els quals les cèl·lules proliferen desmesuradament i envaeixen teixits veïns. Les cèl·lules neoplàsiques proliferen anormalment ignorant les influències reguladores de l'organisme.

Neoplàsia generalment s'usa com a sinònim de "tumor". La divisió principal és entre "benigne" i "maligne". Es diu que un tumor és benigne quan les seves característiques citològiques i macroscòpiques es consideren relativament no perilloses, el que significa que romandrà localitzat, no es disseminarà i en general és factible la seva cura mitjançant extirpació quirúrgica. Els tumors malignes poden envair i destruir estructures adjacents i disseminar-se a llocs llunyans. L'adquisició progressiva d'atributs que afavoreixen la línia cel·lular tumoral agressiva s'anomena *progressió*. Així, el ritme de creixement d'una neoplàsia pot incrementar-se amb el temps.

Invasió i metàstasis: metàstasis connota el desenvolupament d'implants secundaris que no tenen continuïtat amb el tumor primari, moltes vegades en teixits llunyans. Les propietats d'invasió i metàstasis identifiquen amb més claredat una neoplàsia com a maligna. Tot i que la pressió expansiva generada per una massa tumoral en creixement podria facilitar la penetració a estructures adjacents, alguns estudis suggereixen que hi ha tres passos que participen en la invasió: a) adhesió de cèl·lules canceroses; b) proteòlisi local i c) locomoció (figura 1.5). Els teixits normals estan separats en compartiments mitjançant membranes basals i estroma intersticial. La invasivitat suposa l'adhesió de les cèl·lules canceroses a estructures adjacents i tot seguit la síntesi i alliberament de proteases, sobretot col·lagenases, obrint així les vies fins l'estroma intersticial per la locomoció i migració de cèl·lules tumorals. Els factors de creixement i els seus receptors també semblen jugar un paper molt important en aquest procés. Una excepció notable són pràcticament tots els tumors primaris del sistema nerviós central: tot i que aquestes neoplàsies són altament invasives en els seus llocs primaris d'origen, rarament donen metàstasis. Com a excepció, algunes cèl·lules de neoplàsies del sistema nerviós central com el medul·loblastoma i l'ependimoma poden penetrar els ventrículs cerebrals i ser transportades pel líquid cefalorraquidi per reimplantar-se sobre les superfícies meníngees, ja sigui dins el cervell o en la medul·la espinal.

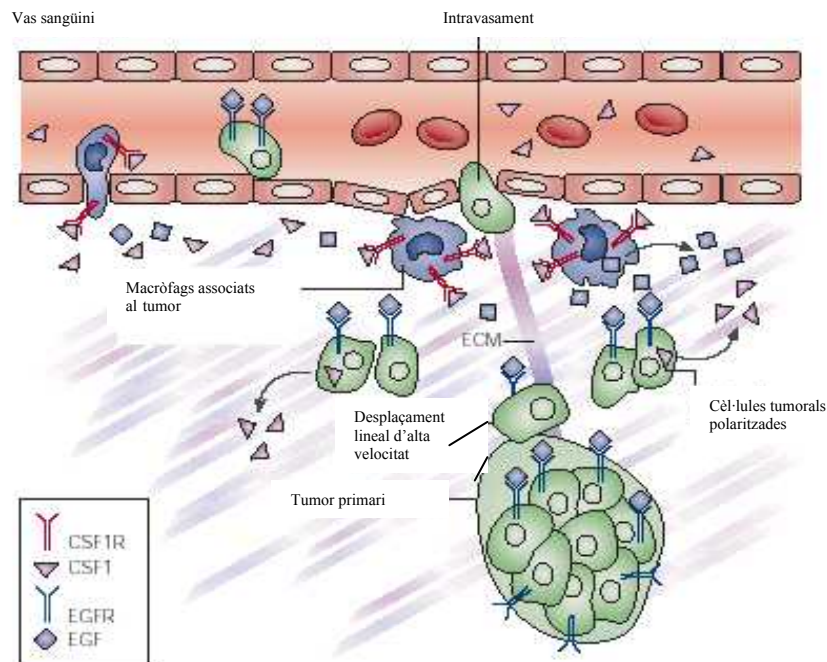


Figura 1.5: Procés esquemàtic de migració d'una cèl·lula tumoral a través de la matriu extracel·lular (ECM) i intravasament al corrent sanguini. (EGF= factor de creixement epidèrmic, EGFR= receptor per al factor de creixement epidèrmic; CSF= factor estimulador de colònies, CSFR= receptor per a factor estimulador de colònies). Adaptada de Condeelis i Segall, 2003

1.3.1 Tumors del sistema nerviós

Els tumors del sistema nerviós totalitzen més o menys un 10% dels tumors primaris en humans, sent responsables del 2% de les morts (Louis, 1978). Són la segona malaltia maligna més freqüent en nens, sent responsable del 20% dels tumors en nens menors de 15 anys (Kaye i col, 2001b), i la incidència varia segons el rang d'edat (figura 1.6 A i B).

La major part dels tumors cerebrals tenen un pronòstic bastant dolent i encara constitueixen un repte tant respecte a diagnòstic com a teràpia. Es dona una supervivència mitjana de 5 anys en 22% dels gliomes i 60% dels meningiomes. Molts són els factors que influeixen en el comportament dels tumors cerebrals, com per exemple la edat del pacient, localització del tumor i possibilitat de resecció, tipus histològic i grau. (Wilms i Balériaux, 1999). La incidència dels tumors del sistema nerviós central en tota la comunitat europea s'il·lustra en la figura 1.7, on es representa el nombre de casos per 100.000 habitants.

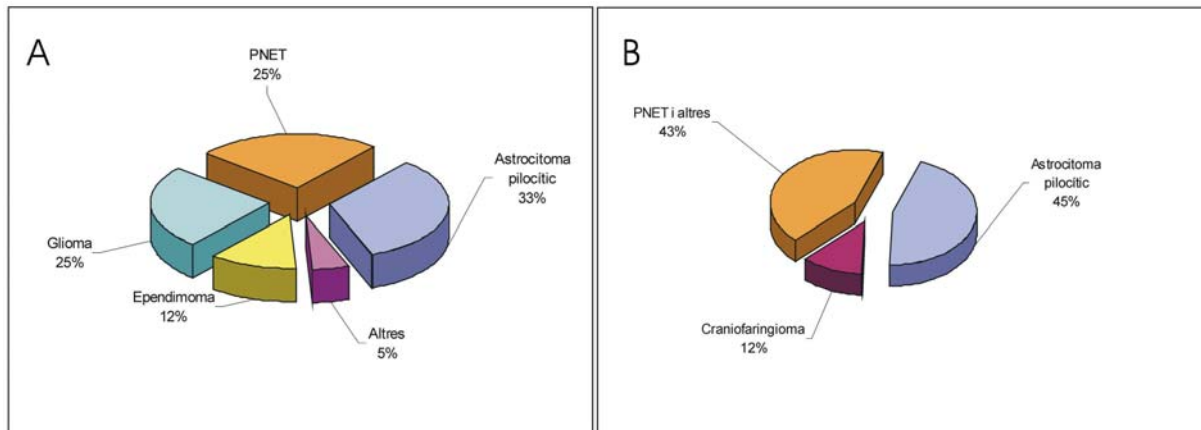


Figura 1.6: incidència dels principals tipus de tumors cerebrals en infants A) entre 2 i 15 anys, i B) menors de 2 anys. Adaptat de (Wilms i Balériaux, 1999). PNET, primitive neuroectodermal tumours

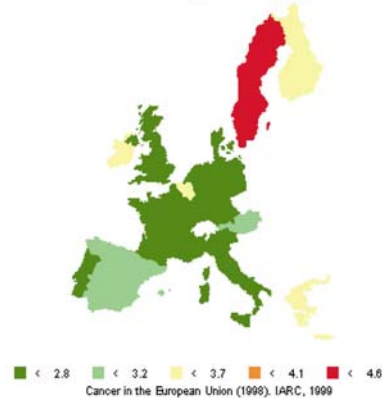
Els tumors cerebrals poden ser dividits en:

- Tumors del sistema nerviós central (SNC), que inclouen tumors del cervell i medul·la espinal.
- Tumors dels nervis perifèrics.

Els tumors intracranials interfereixen amb les funcions de les parts adjacents del cervell i també tenen efectes de massa per l'espai que ocupen dins la cavitat rígida del crani. L'elevada pressió intracranial comprimeix la resta del cervell i pot causar desplaçaments per herniació del contingut cerebral. Conseqüentment, el ventall de símptomes consisteix en:

- Senyals i símptomes localitzats;
- Símptomes deguts a l'augment de pressió intracranial;
- Evidència de desplaçament d'estructures cerebrals.

**Incidència de tumors del sistema nerviós central
Nens (0-14 anys)**



**Incidència de tumors del sistema nerviós central
Adults (15-75 anys)**

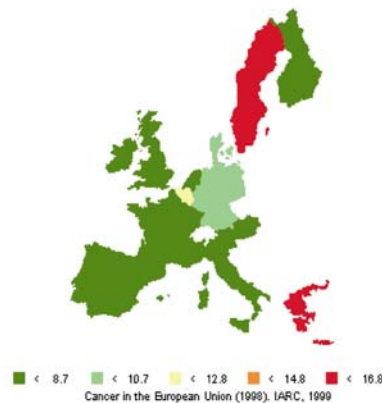


Figura 1.7: Incidència (casos per 100.000 habitants) de tumors del sistema nerviós central als diferents països de la comunitat europea. Adaptat de Ferlay i col, 1999

Aquests símptomes no són distintius de tipus tumorals concrets, però depenen de la regió on el tumor s'està desenvolupant i de la velocitat de creixement. L'activitat epilèptica és freqüentment associada amb tumors. El desenvolupament de dèficits focals deguts a compressió, edema peritumoral o isquèmia depenen de la velocitat de creixement i de la localització. A més, els tumors de creixement lent poden assolir una gran mida abans del desenvolupament de dèficits neurològics gràcies a l'adaptació de les estructures cerebrals.

La majoria (95%) de lesions que ocupen espai intracerebral són neoplasmes, i d'aquests, aproximadament la meitat són tumors primaris, i l'altra meitat són metàstasis. Les metàstasis són principalment carcinomes secundaris, sobretot de pulmó i mama, alguns són melanomes i els demés són sarcomes i limfomes. Una petita fracció (altres, 5%) de les lesions intracerebrals són abscessos, aneurismes, granulomes, hematomes subdurals i cists hidatídics (Louis, 1978). La figura 1.8 il·lustra aquests percentatges.

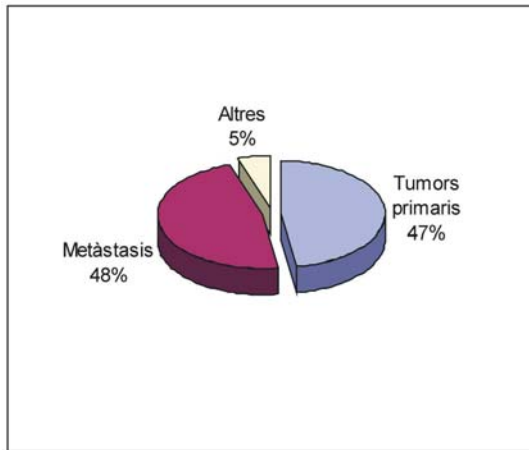


Figura 1.8: Distribució de la incidència de lesions intracerebrals. Adaptat de Louis, 1978

El nom de cada tumor indica la seva presumible cèl·lula d'origen (taula 1.2). Tanmateix, hi ha tumors primaris que tenen un origen poc clar, com els tumors embrionaris del sistema nerviós (De Vita i col, 2001).

Una altra important divisió dels tipus tumorals del sistema nerviós, i que serà mencionada en aquest treball, és entre *intraaxial* i *extraaxial*, que fa referència a la localització dels tumors. Un tumor intraaxial es desenvolupa a partir de les pròpies cèl·lules de l'eix neural, i/o està localitzat a l'interior d'aquestes estructures (lòbul parietal, occipital, etc). Els principals representants són els gliomes i metàstasis. Els tumors extraaxials es desenvolupen a partir dels teixits que envolten el cervell, com les meninges (ex: meningiomes).

1.3.1.1 CLASSIFICACIÓ DEL CÀNCER PER GRAUS I ETAPES

La gradació dels tumors cerebrals té com a objectiu proveir una estimació anticipada del comportament de la lesió. En patologies cerebrals és molt utilitzat un sistema de graus amb 4 nivells. El sistema histològic de gradació dels tumors correspon als següents criteris: atipia nuclear, activitat mitòtica, proliferació endotelial, necrosi i cel·lularitat. Aquestes variables s'interpreten de diferent manera segons el tipus tumoral. La relació entre el grau i el temps estimat de supervivència està recollida en la taula 1.3, així com els principals representants de cada grau. La classificació per etapes dels càncers està basada en el tamany de la lesió primària, el grau de disseminació a ganglis limfàtics regionals, i la presència o absència de metàstasis.

Cèl·lula d'origen	Tumor
astròcit	astrocitoma
ependimòcit	ependimoma
fibroblast aracnoidal	meningioma
cèl·lula de nervi / neuroblast	ganglioneuroma, retinoblastoma
cèl·lula granular externa /neuroblast	medul·loblastoma
cèl·lula de Schwann	Schwannoma (neurinoma)
melanòcit	carcinoma melanocític
cèl·lula epitelial coroïdal	papiloma del plexe coroïdal o carcinoma
pituitària	adenoma
cèl·lula endotelial o estromal	hemangioblastoma
cèl·lula germinativa primitiva	germinoma, pinealoma, teratoma, colesteatoma
cèl·lula del parènquima pineal	pinealocitoma
remanents de notocorda	cordoma

Taula 1.2: Classificació dels tumors cerebrals primaris segons la cèl·lula d'origen. Adaptada de De Vita i col, 2001

Hi ha molts problemes amb la gradació dels tumors per criteris histològics:

- Hi ha diferents sistemes de gradació en ús, el que pot complicar la comparació entre estudis i entre diagnòstics obtinguts en diferents institucions.
- La progressió dels tumors és contínua i el llinar entre diferents graus és molt difícil d'establir en alguns casos.
- Hi ha altres variables que compten a la hora d'establir el pronòstic potencial d'un tumor, com per exemple la seva localització.
- La biòpsia estereotàctica possibilita la exploració de moltes lesions cerebrals; ara bé, els petits fragments de tumor difícilment expressen tota la seva heterogeneïtat i moltes vegades no són representatius de la totalitat de la lesió.
- Els moderns procediments d'imatge i espectroscòpia poden detectar una lesió en estadis molt inicials, de la qual un petit fragment de biòpsia pot ser de difícil interpretació. (Wilms i Balériaux, 1999).

Grau de malignitat	Pronosis després de la resecció	Tumors	
		Extracerebrals	Intracerebrals
I (benigne)	Curació o supervivència > 5 anys	Neurinoma, meningioma, adenoma pituïtària, craniofaringioma	gangliocitoma tèmporo basal, ependimoma (ventricles), papiloma del plexe coroïdal, astrocitoma pilocític
II (semi-benigne)	Temps de supervivència entre 3 i 5 anys	adenoma pituïtària (anaplàstic)	gangliocitoma (altres localitzacions), ependimoma (cerebral), astrocitoma, oligodendroglioma, pinealoma
III (maligne)	Temps de supervivència entre 2 i 3 anys	meningioma anaplàstic, neurinoma anaplàstic	ependimoma anaplàstic, astrocitoma anaplàstic, oligodendroglioma anaplàstic, pinealoma anaplàstic
IV (altament maligne)	Temps de supervivència entre 6 i 15 mesos	sarcoma	glioblastoma, medul·loblastoma, sarcoma primari

Taula 1.3: Grau tumoral, temps estimat de supervivència i principals representants de cada grau (adaptada de Zülch, 1980).

Actualment i per evitar interpretacions errònies degut a que diferents institucions fessin servir una denominació lleugerament diferent per a un mateix tipus de tumor, s'està acceptant la classificació WHO (World Health Organization), basada en números que identifiquen els diferents tipus tumorals. Aquesta classificació organitza els tumors basada en les seves característiques histològiques. Aquesta llista es troba a l'Annex I al final d'aquest treball (citada en Kaye i Laws, 2001c).

1.3.1.2 DESCRIPCIÓ DELS PRINCIPALS TIPUS DE TUMORS CEREBRALS

Donat el gran ventall de tipus tumorals observats a la llista WHO, no es comentaran tots els tipus tumorals, sinó els més significatius i de major incidència, o bé els que tenen especial interès en aquest treball. La taula 1.4 indica la incidència observada per als principals tipus tumorals, en el registre de càncer de Tarragona (utilitzat com a referència per Catalunya), en la base de dades del projecte INTERPRET i en altres referències del tema. La distribució de les principals patologies s'il·lustra en la figura 1.9, mostrant una clara predominància de gliomes i meningiomes sobre la resta dels tipus tumorals. Les figures 1.10,

1.12, 1.13, 1.15, i 1.16 il·lustren la distribució segons els principals subgrups enunciats en aquesta secció.

Tipus tumoral	Registre del Càncer de Tarragona ¹	Base de dades INTERPRET	Altres referències [¥]
Glioma	47,7%	48,4%	46,5%
Meningioma	2,3%	22,3%	21,0%
Adenoma Pituitària	n.i.	0,4%	11,0%
PNET	1,2%	3,2%	3,0%
Schwannoma	0,4%	1,4%	6,9%
Limfoma	1,2%	3,5%	2,5%
Hemangioblastoma	0,8%	1,8%	1,5%
Tumors de cèl·lules germinals	0,4%	0,4%	1,3%

Taula 1.4: Incidència dels diferents tipus de tumors segons el registre del càncer de Tarragona (utilitzat com a referència per Catalunya), els casos recollits a la base de dades INTERPRET (<http://carbon.uab.es/INTERPRET>). ¥: (Walker i col, 1985; Newton, 1994; Wilms i Balèriaux, 1999; De Vita i col, 2001). n.i.= no inclòs

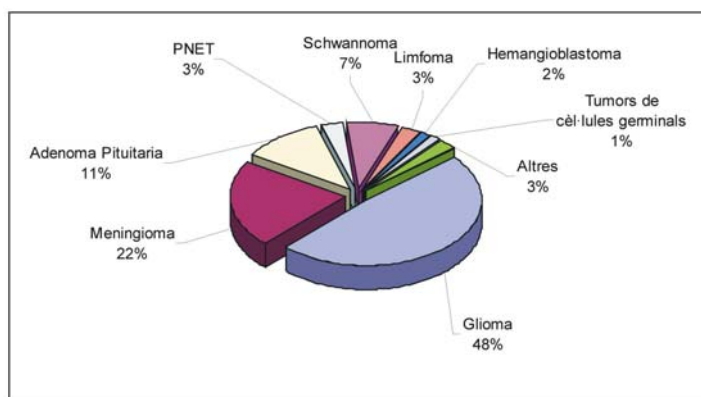


Figura 1.9: Distribució dels principals tipus de tumors cerebrals primaris al sistema nerviós central segons la taula 1.4

¹ El registre del càncer de Tarragona inclou només tumors malignes i primaris. Astrocitomes benignes, meningiomes (excepte malignes) i tumors considerats de baix grau no són contemplats. La nomenclatura utilitzada és la de la Classificació Internacional de Malalties per Oncologia (ICD-O) (<http://www.seer.cancer.gov/icd-o-3/>)

A) TUMORS NEUROEPITELIALS

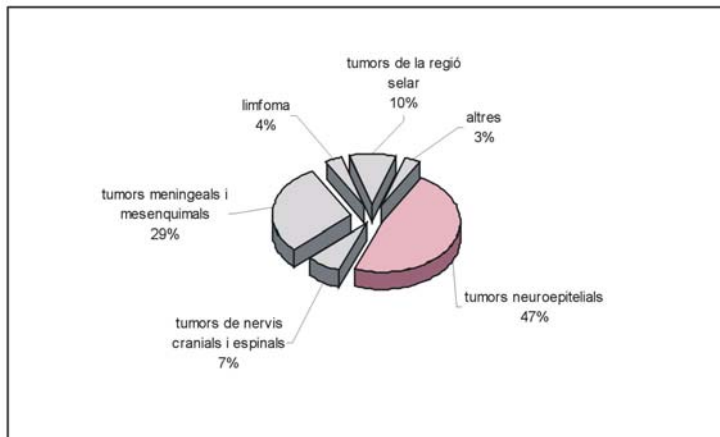


Figura 1.10: Distribució dels tumors segons els principals subgrups analitzats en aquesta secció ressaltant el percentatge que representen els tumors neuroepiteliais. Adaptat de De Vita i col, 2001

Tumors Astrocítics

Els tumors originats a partir dels astròcits, cèl·lules encarregades del manteniment de l'homeòstasi metabòlica al voltant de les neurones, constitueixen una gran proporció dels gliomes. Presenten una gran variació en morfologia, genètica i comportament clínic. Els principals tumors astrocítics i la seva distribució es mostren a la figura 1.11.

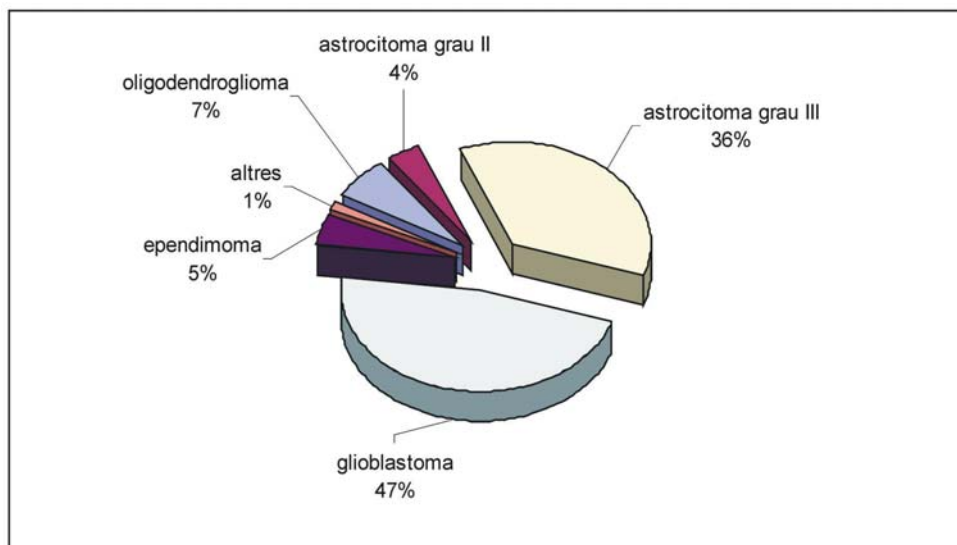


Figura 1.11: Distribució dels principals tumors astrocítics. Adaptada de De Vita i col, 2001

Astrocitoma Pilocític (grau I WHO) és la neoplàsia del sistema nerviós més freqüent en nens, i està predominantment localitzat al cervellet. Creix lentament i té un pronòstic favorable.

Astrocitoma de baix grau (difús) (grau II WHO) es presenta en adults joves, infiltrant el cervell de manera difosa i en general no són totalment extraïbles per neurocirurgia. Més del 60% dels afectats sobreviu un període igual o superior a 5 anys (De Vita i col, 2001). Tendeixen a créixer lentament, però amb una gran probabilitat de recidiva després de la ressecció. Té les variants de *fibril·lar*, *protoplasmàtic* i *gemistocític*. La progressió a graus superiors és freqüent, especialment en la variant gemistocítica (Wilms i Balériaux, 1999).

Astrocitoma anaplàstic (grau III WHO) generalment evoluciona a partir d'un astrocitoma de grau baix, creix relativament ràpid i generalment progressa a glioblastoma en 2 o 3 anys. Infiltra el cervell molt difusament i presenta una capacitat proliferativa elevada (De Vita i col, 2001).

Glioblastomes (grau IV WHO) són el tipus més freqüent de tumor maligne del sistema nerviós. Clínicament es poden subdividir en *secundaris* (evolucionen per progressió des d'astrocitomes de baix grau o anaplàstics) i *primaris*, més freqüents (més del 80% dels casos) que es desenvolupen ràpidament en persones grans (edat mitjana 55), amb una història clínica curta de menys de 3 mesos. Ambdós tipus infiltren difusament el cervell, presentant àrees d'alta cel·lularitat i necrosis, tot i l'elevada vascularització (De Vita i col, 2001).

Tumors Oligodendroglials

Els tumors oligodendroglials s'originen de oligodendròcits, que són essencials en el procés de mielinització. Freqüentment s'observen barrejats amb components glials (apartat següent). Es poden subdividir en *oligodendroglioma*, un tumor relativament poc comú i que té creixement lent; i *oligodendroglioma anaplàstic*, una variant maligna de l'anterior. La calcificació és un element freqüent en aquests tipus de tumors, el que pot ser determinant per diferenciar-lo, per IRM o TAC, d'altres tipus tumorals (Wilms i Balériaux, 1999).

Gliomes mixtos

S'originen de cèl·lules astrocítiques i oligodendrocítiques i/o endodurals; són un grup de tumors que es donen amb diferents freqüències en nens i en adults. Es divideixen en *oligoastrocitoma*, que és el tipus més freqüent de glioma mixt, i *oligoastrocitoma anaplàstic*, una variant maligna.

Tumors embrionaris (PNET)

El concepte de “*Primitive Neuroectodermal Tumour*” (PNET) està basat en la suposició de que aquestes lesions tenen un origen comú en cèl·lules neuroepiteliales multipotencials, que haurien sofert una transformació maligna. Això origina tumors en diferents llocs del SNC amb idèntica histologia, morfologia i comportament biològic. Les lesions més comuns són medul·loblastoma, neuroblastoma, pineoblastoma i ependimoblastoma (Wilms i Balériaux, 1999). Representen una important fracció dels tumors pediàtrics i són tumors altament malignes considerats com a grau IV.

B) TUMORS DE NERVIS CRANIALS I ESPINALS

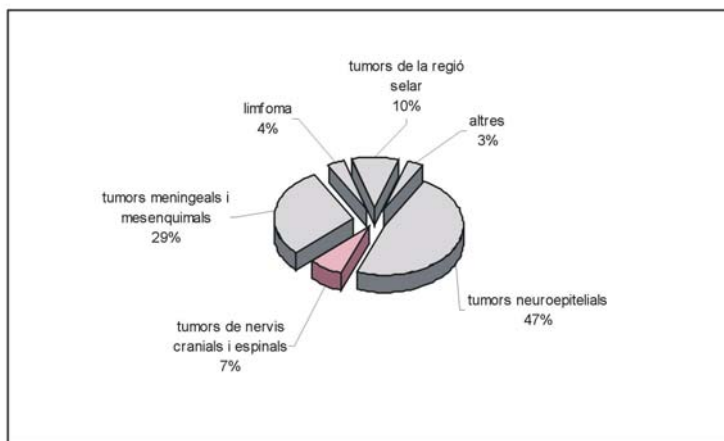


Figura 1.12: Distribució dels tumors segons els principals subgrups analitzats en aquesta secció ressaltant el percentatge que representen els tumors de nervis cranials i espinals. Adaptat de De Vita i col, 2001

Tenen dos representants principals. El primer, el *schwannoma acústic*, s'origina de les cèl·lules de Schwann, generalment en la zona de transició on les cèl·lules glials de la beina nerviosa es transformen en cèl·lules de Schwann, freqüentment localitzades al canal auditiu intern. El segon, el *neurinoma (Schwannoma trigeminal)* és un tumor rar que s'origina de l'arrel del nervi trigeminal o d'altres arrels nervioses.

C) TUMORS MENINGEALS I MESENQUIMALS

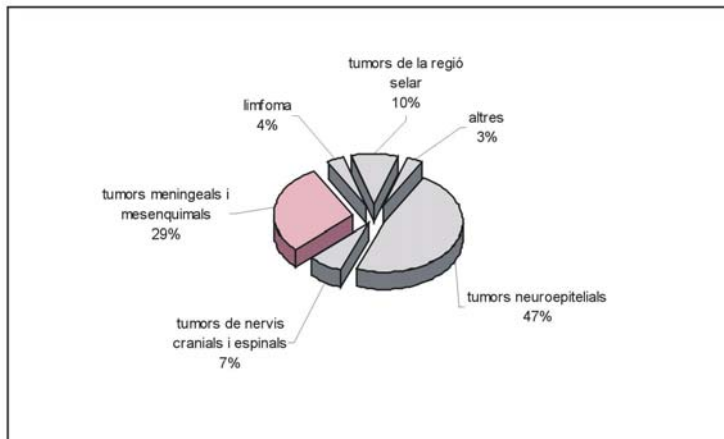


Figura 1.13: Distribució dels tumors segons els principals subgrups analitzats en aquesta secció ressaltant el percentatge que representen els tumors meningeals i mesenquimals. Adaptat de De Vita i col, 2001

Tumors de les cèl·lules meningoteliales

Són lesions que s'originen de les meninges, les membranes que recobreixen el cervell. Es pot dividir en *meningiomes*, *tumors no meningoteliales*, *hemangiopericitoma*, *tumors melanocítics*. Els meningiomes són tumors relativament comuns, responsables d'una cinquena part dels tumors intracranials. S'originen dels fibroblasts de l'aracnoid que formen els "vili", o bé de cèl·lules aracnoidals desplaçades a la dura-màter. Pot aparèixer a qualsevol edat, però és predominant en adults. Generalment és un tumor benigne de creixement lent. Presenta moltes variants, com el meningioma *transicional*, *fibril·lar*, *atípic*, *maligne* (tumor poc corrent) Les incidències dels diferents tipus s'il·lustren a la figura 1.14 . Segons Bernstein i Berger (2000c) , en un percentatge considerable dels casos, la imatge no és suficient per distingir entre meningiomes benignes i malignes.

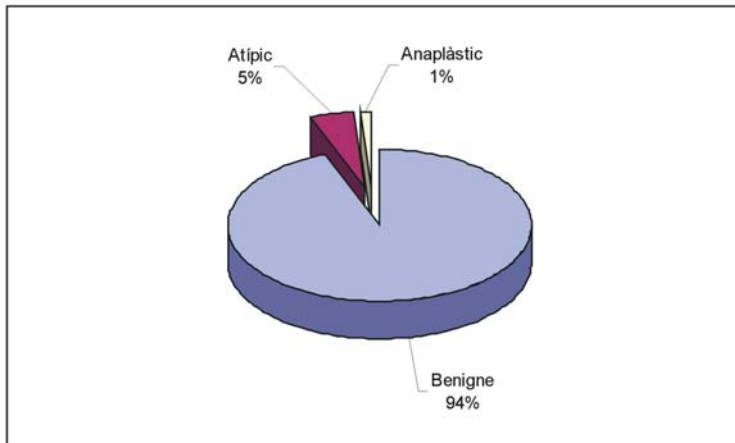


Figura 1.14: Percentatge observat de diferents tipus de meningiomes. Adaptat de Bernstein i Berger, 2000c

Hemangiopericitomes

Són tumors de baixa incidència, representant menys de 0,4% dels tumors cerebrals primaris (Kleihues i Cavenee, 1997b). S'originen dels pericits que estan al voltant dels espais vasculars. Corresponen al grau II o III i tenen una forta tendència a recidivar o bé metastatitzar a l'ós o pulmó.

Tumors d'origen incert: hemangioblastomes

És un tumor típicament cístic i pot ser múltiple, sent més freqüents a l'edat adulta. Del total d'aquests tumors, 10 - 20% son part de les manifestacions de la síndrome de von Hippel-Lindau. Són lesions benignes corresponents al grau I.

D) LIMFOMA

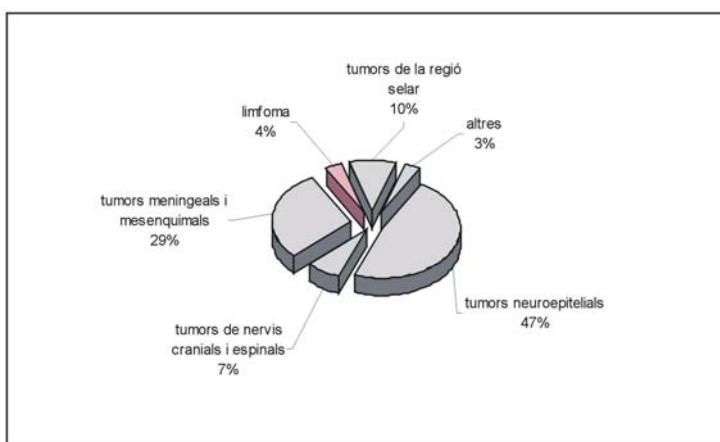


Figura 1.15: Distribució dels tumors segons els principals subgrups analitzats en aquesta secció ressaltant el percentatge que representen els limfomes. Adaptat de De Vita i col, 2001

Els limfomes primaris del SNC tenen les mateixes característiques dels limfomes sistèmics. Quan s'observen lesions múltiples amb necrosis, es donen freqüentment associades amb SIDA. La majoria dels limfomes són non-Hodgkin (Wilms i Balériaux, 1999). Tenen un origen limfocític, però el SNC no té nòduls limfàtics. Així, la qüestió de com un limfoma s'hi pot desenvolupar no té resposta clara; tot i així, els limfòcits que poden entrar i sortir del SNC podrien ser els causants d'aquests tumors.

E) TUMORS DE LA REGIÓ SELLAR

Els craniofaringiomes en són els principals representants, trobats més freqüentment en nens. Estan formats per remanents de les cèl·lules precursors de la glàndula pituitària. La majoria d'aquests tumors esdevé simptomàtic després d'assolir un diàmetre d'aproximadament 3 cm. Usualment són cístics amb un líquid altament ric en proteïnes i calci. (De Vita i col, 2001).

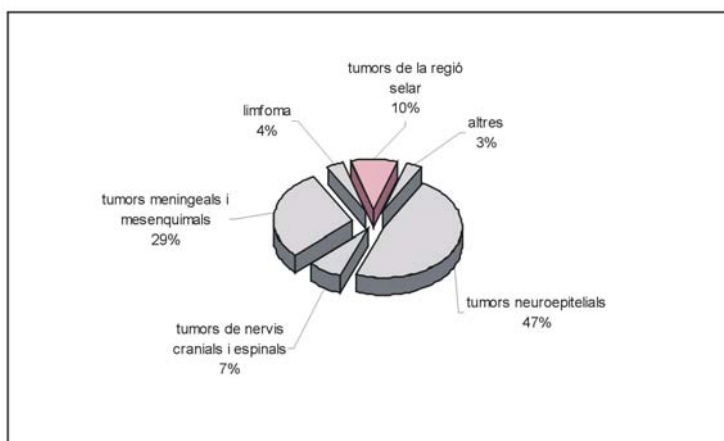


Figura 1.16: Distribució dels tumors segons els principals subgrups analitzats en aquesta secció ressaltant el percentatge que representen els tumors de la regió sellar. Adaptat de De Vita i col, 2001

F) METÀSTASIS CEREBRALS D'ALTRES TUMORS

Les metàstasis, com el nom suggereix, no són tumors cerebrals primaris però són responsables d'un gran percentatge de les masses intracranials anòmales. Els tumors primaris que més freqüentment originen metàstasis cerebrals són de pulmó, de mama, de pell, i tumors del tracte intestinal i genitourinari.

1.3.1.3 LESIONS PSEUDOTUMORALS

En el diagnòstic neuroradiològic, a més de la diferenciació entre diferents tipus histològics de tumors, és important tenir present que altres condicions no-tumorals es poden presentar amb efectes de massa o captació de contrast, simulant o mimetitzant el comportament dels tumors. Això inclou una gran varietat de lesions congènites, com heterotopies de la substància gris, lesions vasculars com infart, radionecrosi, angioma cavernós o aneurisma, lesions inflamatòries com esclerosi múltiple, sarcoidosi, lesions infeccioses com abscessos, neurocisticercosi, neurocriptococosi o cist hidatídic. En situacions on la imatge no pot oferir un diagnòstic diferencial precís, la espectroscòpia té una utilitat afegida molt important.

1.3.1.4 TUMORS AMB FORMACIÓ DE PART CÍSTICA

Diferents lesions intracranials, com els gliomes, metàstasis, craniofaringiomes, hemangioblastomes i abscessos es poden presentar com formacions cístiques als estudis de ressonància magnètica i tomografia (Bernstein i Berger, 2000d). Una formació cística és una cavitat no natural dins del parènquima cerebral, en la qual el teixit és reemplaçat per líquid (Go, 1993). Es poden classificar en cists infecciosos, cists de gliomes i tumors, cists contenint líquid cefalorraquidi (LCR), entre altres. La figura 1.17 il·lustra una imatge per ressonància magnètica d'un tumor cístic. Poptani i col (1995), entre altres, investiguen característiques del patró espectral que puguin ser útils a la hora del diagnòstic diferencial en casos dubtosos. Al davant d'una lesió cística, i donat que la història clínica moltes vegades no és suficient, podria ser d'interès per als clínics una eina que situés aquesta lesió com a inicialment 'benigna' o 'maligna'. En aquesta tesi, s'ha intentat desenvolupar un classificador automàtic de patrons espectrals per a les lesions cístiques. Els abscessos han estat inclosos també per motius diversos: són una patologia de relativa freqüència; és de vital importància conèixer si es tracta o no d'un abscess perquè els procediments adoptats amb el pacient seran totalment diferents; i moltes vegades la història clínica no porta a pensar en un abscess, que es descobreix posteriorment o a l'acte quirúrgic.

Els patrons espectrals ja són molt útils en la discriminació bilateral d'abscessos i tumors agressius necròtics (Martínez-Pérez i col, 1997; Grand i col, 1999; Burtcher i Holtås, 1999) però encara no s'aplica amb tot el seu potencial a la caracterització de tumors cerebrals humans.

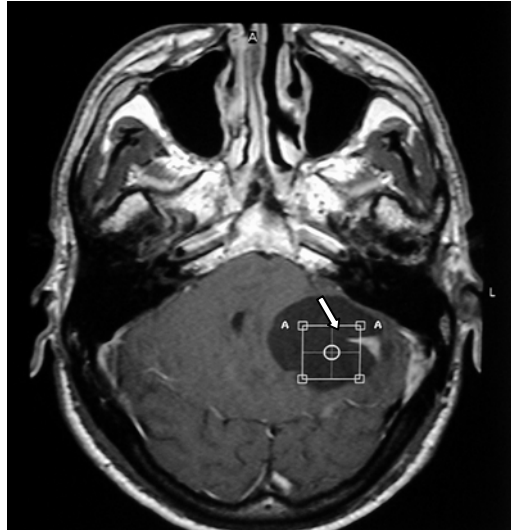


Figura 1.17: Imatge per ressonància magnètica, pesada en T_1 post contrast, d'un tumor amb formació cística (pacient I0380, diagnòstic hemangioblastoma)

Aproximadament 10% dels tumors del sistema nerviós central presenten una àrea cística, i hi ha diferents hipòtesis respecte a l'origen i significat dels cists intra- o peritumorals (Lohle i col, 1998a). Hi ha un interès creixent en la caracterització d'aquestes lesions cístiques, degut a que l'estudi dels components del fluid cístic pot proporcionar una millor comprensió de la patogènesi de la formació del cist, i possiblement sigui útil en la predicció *in vivo* de l'agressivitat o potencial metastàtic del tumor (Lohle i col, 1998b; Veerman i col, 1998).

Hi ha alguns estudis de les característiques d'IRM de les formacions tumorals cístiques (Jungreis i col, 1988) així com alguns estudis de les característiques d'ERM (Chang i col, 1998), i també estudis de la composició química del seu contingut (Veerman i col, 1998), però falten estudis que correlacionin els components químics dels líquids cístics amb la predicció de la progressió tumoral i amb els patrons característics d'ERM. D'acord amb aquest interès, hem volgut intentar investigar l'origen de la ressonància a 2,03 ppm, un senyal observat en la ERM de parts cístiques de diferents tipus de tumors cerebrals humans. Aquest senyal és usualment atribuït a N-acetil aspartat (NAA) provinent del parènquima cerebral degut a efectes de volum parcial (anàlisi d'un volum superior al delimitat pel vòxel, a causa de que algunes seqüències d'adquisició no són del tot exactes al delimitar la mida d'aquest) o bé teixit normal infiltrant, tant en cists (Chang i col, 1998) com en tumors sòlids (Ott i col, 1993), encara que sigui també detectat en tumors no infiltrants com els meningiomes (Majós i

col, 1999). El fluid cístic és més manejable i fàcil d'analitzar que un tumor sòlid per caracteritzar aquesta ressonància, i es va considerar un bon punt de partida.

1.3.2 Importància de la discriminació bilateral entre tipus tumorals

El pronòstic en general dels tumors cerebrals és reservat o greu, encara que es tracti de tumors benignes. La caixa cranial, degut a la seva anatomia, no accepta bé creixements i lesions que ocupin espai i desplacin les estructures cerebrals, la majoria d'elles vitals. Tot i així, la decisió quirúrgica, a més de dependre essencialment de si el tumor està localitzat en zones del cervell relacionades amb funcions importants i vitals, depèn també del comportament del tumor i les seves característiques (López-Escobar, 2000). Per exemple, la distinció entre un tumor astrocític benigne i maligne és important, ja que la tendència a recidivar d'un tumor maligne és molt superior a la del tumor benigne i porta a reseccions quirúrgiques més radicals; a més, el temps de supervivència és inferior i en relació als tumors benignes, algunes vegades la decisió pot ser la d'altres tractaments que no pas el quirúrgic.

A més, entre diferents tumors glials de baix grau, com els astrocitomes II i oligodendrogliomes, és interessant en el sentit de que alguns tipus d'oligodendrogliomes tenen més sensibilitat a la quimioteràpia (citats a Rijpkema i col, 2003).

La distinció entre medul·loblastomes i astrocitomes grau II és molt important, ja que els medul·loblastomes situats al VI ventricle (zona on es poden situar també alguns astrocitomes de baix grau) poden donar metàstasis a la medul·la espinal per la migració de cèl·lules tumorals. A més, el medul·loblastoma és un tumor de *per se* bastant més maligne que un astrocitoma de baix grau i necessita ser intervingut ràpidament.

Entre els tumors extraaxials, la distinció entre meningiomes i neurinomes té molt que veure amb les característiques tumorals; el meningioma acostuma a ser bastant vascularitzat; el seu lent creixement i l'adaptació de les estructures cerebrals a la seva presència indueixen a una intervenció quirúrgica cuidadosa i amb atenció als vasos que poden envoltar el tumor (López-Escobar, 2000). Quant als neurinomes, depenen bastant de l'estadi en que s'els ha detectat. Quan estan altament desenvolupats, generalment envolten part dels nervis cranials i la intervenció s'ha de fer amb cura per no danyar aquestes estructures nervioses i no deixar seqüeles.

Entre les formacions cístiques, la diferència de malignitat i procediments entre els diferents tumors és clara, ja que per exemple abscessos requereixen tractament antibiòtic

immediat, mentre tumors com hemangioblastomes i craniofaringiomes no tenen el mateix origen i, tot i ser benignes, demanen procediments diferents que els abscessos i tumors cístics malignes.

Aquestes són algunes de les diferències bilaterals estudiades en aquesta tesi, entre patologies que es podrien confondre per IRM, i que busquen una millora del diagnòstic i optimització dels procediments terapèutics de cara a cada tipus tumoral.

1.3.3 Incidència i epidemiologia dels diferents tipus de tumors cerebrals

La incidència entre la població catalana dels tumors primaris del sistema nerviós central es troba entre 7,1 (als homes) i 5,0 (a les dones) per 100.000 habitants per any, segons les últimes dades disponibles al Registre del Càncer de Tarragona (quinquenni 1993-1997), utilitzat com a referència per Catalunya. Tot i que els tumors primaris cerebrals són relativament poc freqüents comparats amb càncers més comuns com pulmó, mama, pròstata i colorrectal, encara així constitueixen una important font de mort i incapacitat.

El percentatge de cada tipus tumoral en relació al total varia lleugerament segons la font consultada. La taula 1.4 presentada anteriorment, porta una comparació d'aquests percentatges parcials entre diferents fonts.

Epidemiologia: Els principals objectius dels estudis epidemiològics són caracteritzar la distribució i entendre les causes dels tumors cerebrals.

Variació geogràfica: Els països amb les incidències més elevades de tumors cerebrals generalment tenen serveis sanitaris més accessibles i desenvolupats, el que podria reflexar que no és que tinguin incidències més altes, sinó que és més fàcil obtenir dades del servei de salut.

- *Edat i sexe:* El pic màxim d'incidència observat en la incidència de tots els tipus de tumors al voltant de 65-75 anys és degut al pic en aquest grup d'edat per als tipus més comuns de glioma, anomenats glioblastoma i astrocitoma. L'augment en la incidència de molts tipus de tumors cerebrals amb l'edat podria ser degut al temps d'exposició necessari per la transformació maligna, o bé la necessitat de moltes alteracions genètiques abans de la manifestació clínica de la malaltia, o finalment la resposta immune disminuïda. El factor sexe és altament controvertit i no hi ha resultats concloents.

1.3.4 Factors etiològics dels tumors cerebrals

Amb l'excepció dels tumors cerebrals associats amb síndromes hereditàries de càncer i dels casos poc corrents causats per irradiació terapèutica, no s'han pogut associar inequívocament factors ambientals i personals amb la incidència de tumors cerebrals (Bernstein i Berger, 2000a). Meningiomes induïts per radiació poden ser conseqüència d'irradiació per tractament de *tinea capitis* o per tractament de tumors del SNC (Kleihues i Cavenee, 1997b).

Alguns estudis suggereixen una incidència més gran de tumors del SNC en persones exposades per la seva professió a determinats elements químics o físics, però la majoria d'aquests estudis no han estat confirmats o bé no s'hi han identificat clarament els agents causals. La hipòtesi de que la radiació de baixa freqüència generada per telèfons mòbils i ones de telecomunicació té un paper en el desenvolupament de gliomes encara espera confirmació. D'igual manera, el paper de la dieta en l'etiologia dels tumors del SNC, especialment el paper dels compostos N-nitrosos, no és clara. El SNC és freqüentment afectat en síndromes hereditàries, moltes vegades associades amb tumors extraneurals i lesions de pell (Bernstein i Berger, 2000a). La taula 1.5 recull alguns dels factors de risc recentment publicats i sobre els quals hi ha algun consens.

1.3.4.1 FACTORS GENÈTICS DETERMINANTS EN EL DESENVOLUPAMENT DE TUMORS CEREBRALS

Observacions experimentals i epidemiològiques indiquen que la majoria dels càncers sorgeixen com a conseqüència d'un estat d'*inestabilitat genètica* cel·lular. Mutacions en determinats gens que estan directa o indirectament relacionats amb la divisió cel·lular provoquen l'aparició d'un càncer. Actualment s'estudia molt la genètica associada a diferents tipus de tumors, ja que aquesta pot ajudar a determinar en altres pacients una propensió a determinats tipus tumorals o bé donar indicacions pronòstiques d'aquesta lesió.

Tumors astrocítics: el gen p53 és un supressor de tumors i la seva alteració sembla estar involucrada en estadis inicials de tumorigènesi dels astrocitomes. Molts factors de creixement, molècules de superfície cel·lular i de matriu extracel·lular són expressats als astrocitomes, el que reflexa una modificació dinàmica en l'adhesió cel·lular, remodelant la matriu, i també la motilitat de les cèl·lules (De Vita i col, 2001).

Factors de risc	Glioma	Meningioma	No especificat / tots els tipus
<i>Historial mèdic personal</i>			
Trauma al cap	Lleugerament negatiu	Positiu	Positiu
Epilèpsia, marejos, convulsions	Positiu		Positiu
<i>Dieta i vitamines</i>			
Menjars curats	Controvèrsia	Positiu	Positiu
Fruites i vegetals	Controvèrsia		
Vitamines	Lleugerament negatiu		
Nitrats	No hi ha associació		
Nitrits	Lleugerament positiu		
Nitrosamines	Positiu		
<i>Alcohol</i>	Lleugerament negatiu		
<i>Tabac</i>			
Actiu, sense filtre	Lleugerament positiu		
Amb filtre	No hi ha associació	Lleugerament positiu	
<i>Radiació Ionitzant</i>			
Terapèutica			Fortament positiu
Diagnòstica	Lleugerament positiu	Lleugerament positiu	
Industrial			Lleugerament positiu
<i>Camp electromagnètic baixa freq.</i>			
Residencial			No hi ha associació
Ocupacional			Lleugerament positiu
<i>Treballadors, Indústries</i>			
Goma sintètica			Positiu
Clorur de Vinil			Positiu
Refinament/producció petroli			Positiu
Pesticides/Insecticides			
- Manufactura química			Lleugerament negatiu
- Aplicació de pesticides			Positiu
- Treballador agrícola			No hi ha associació
Formaldehid			
- Exposició professional			Lleugerament positiu
- Exposició Industrial			No hi ha associació

Taula 1.5: Factors de risc[¥] estudiats en relació a tumors cerebrals primaris (Bernstein i Berger, 2000a)

[¥] Risc: Fortament positiu: risc relatiu mitjà de almenys 3 estudis excedeix 3,0; Positiu: risc relatiu mitjà de almenys 3 estudis excedeix 1,5; Lleugerament positiu: risc relatiu mitjà de almenys 3 estudis entre 1,1 i 1,5; Lleugerament negatiu: risc relatiu mitjà de almenys 3 estudis entre 0,7 i 0,9; Negatiu: risc relatiu mitjà de almenys 3 estudis per sota de 0,7; No hi ha associació: risc relatiu mitjà de almenys 3 estudis entre 0,9 i 1,1; Controvèrsia: dos estudis amb resultats inconsistents.

La transició de grau II a III de l'escala WHO és acompanyada per un augment en les característiques histològiques malignes i la pèrdua del cromosoma 9p es troba en aproximadament 50% dels astrocitomes grau III (A3) i glioblastomes multiformes (GB). GB és l'estadi més maligne d'un astrocitoma. En 60 a 95% dels casos de glioblastoma, hi ha pèrdua del cromosoma 10, que té al menys 2 supressors de tumors en el braç llarg. El gen que codifica pel receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) està freqüentment amplificat en 40% dels GB. Les mutacions en el gen p53 generalment estan relacionades amb la progressió d'un astrocitoma de grau més baix (glioblastoma secundari). Per altra banda, els glioblastomes amb amplificació de EGFR poden sorgir *de novo* i ràpidament sense evidències d'un astrocitoma de grau més baix preexistent (glioblastoma primari) (De Vita i col, 2001). Als oligodendrogliomes i oligoastrocitomes, entre 40 i 80% dels casos, hi ha pèrdues al·lèliques preferencialment en cromosomes 1p i 19q. La pèrdua al·lèlica al cromosoma 10 sembla ser una característica comú als gliomes d'alt grau ja siguin astrocítics o oligodendroglials. Aquests tumors semblen tenir més sensibilitat a la quimioteràpia quan comparats a astrocitomes de baix grau.

La monossomia del cromosoma 22 és freqüent en *meningiomes*, i el gen NF2 està freqüentment mutat al cromosoma 22q, clarament implicat en la tumorigènesi meningotelial. En meningiomes de graus més alts també s'observen afegits cromosomals. La pèrdua del cromosoma 10 en particular està associada amb característiques malignes als meningiomes, com la invasió.

1.3.4.2 FACTORS VIRALS EN EL DESENVOLUPAMENT DE TUMORS CEREBRALS

Els virus oncogènics, sobretot aquells que interfereixen amb funcions de supressors de tumors, estan relacionats amb el desenvolupament d'alguns càncers humans. Als tumors del plexe coroïdal, per exemple, s'observa un possible paper del SV40 (simian virus, un petit virus de DNA de primats) en l'etiologia d'aquests tumors.

Per altra banda, el virus Epstein-Barr té un paper important en el desenvolupament de limfomes, sobretot en pacients immunodeprimits. S'ha detectat aquest virus en el LCR de pacients portadors de síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA) i que també tenen limfoma cerebral (Bernstein i Berger, 2000a).

1.4 El projecte INTERPRET

1.4.1 Objectius principals

El projecte europeu INTERPRET (*International Network for Pattern Recognition of Tumours using Magnetic Resonance*, IST-1999-10310 <http://carbon.uab.es/INTERPRET>) tenia com objectiu fer possible la utilització més freqüent, als centres hospitalaris i radiològics, de la informació provinent de la ERM. Mentre la IRM és una tècnica àmpliament utilitzada i la informació que dóna és fàcilment interpretada per la majoria dels radiòlegs, tal situació no s'observa amb la ERM. La informació espectroscòpica és totalment diferent de la informació donada per la imatge, encara que estigui basada en els mateixos fonaments instrumentals i metodològics. Per interpretar un espectre de RM és necessari un cert coneixement de la bioquímica del teixit en qüestió i una pràctica en el reconeixement de patrons no associats a la morfologia i l'anatomia. Aquest tipus d'entrenament no és habitual entre els radiòlegs. Considerant que tant la IRM com la ERM poden ser adquirides en la mateixa exploració amb un augment molt petit del temps total necessari per cada pacient, i que el valor afegit de la ERM a la IRM encara no és un fet àmpliament acceptat, s'ha plantejat la forma de transformar la informació espectroscòpica a un format que pogués ser fàcilment utilitzable pels radiòlegs. La feina desenvolupada per tot l'equip del projecte és molt complexa i només ha estat possible gràcies a la col·laboració de tots els centres implicats; explicar-ho en detall està més enllà dels objectius d'aquesta Tesi.

En aquest treball seran esmentades només les feines en les quals he participat més directament o que han influït més directament sobre la Tesi.

1.4.2 Base de dades preliminar: ipDB

La ipDB consistia en una gran col·lecció d'espectres de vòxel únic (*single voxel*, SV) $^1\text{H-MR}$ de tumors cerebrals humans adquirits en els anys anteriors a l'inici de l'estudi per dos dels centres participants del projecte INTERPRET, Institut de Diagnòstic per la Imatge – Centre Bellvitge (IDI) i Centre Diagnòstic Pedralbes (CDP). Espectres (temps d'eco curt i llarg), imatges (DICOM i JPEG), així com dades clíniques (sexe, diagnòstic patològic original, edat i altres) han estat introduïts fins octubre del 2001. El full d'entrada de dades que s'utilitzava està a l'annex II d'aquesta tesi. Aquest conjunt preliminar de dades ha possibilitat

el desenvolupament dels classificadors i de la GUI (*graphical user interface*) inicials, que han originat les eines d'auxili a la decisió diagnòstica, relacionant la patologia amb el patró espectral. Breument, la ipDB ha estat dissenyada en MySQL², amb accés protegit per contrasenya i la interfície gràfica estava dissenyada en Java³ (Masllorens, 1998). Hi havia la possibilitat d'exportar i importar dades espectroscòpiques en diferents formats, així com els fitxers procedents del processament manual amb MRUI (Magnetic Resonance User Interface <http://carbon.uab.es/mrui/>). També s'emmagatzemaven imatges JPEG de vòxels.

Exemples de pantalla de la interfície gràfica es poden veure a la figura 3.14. En la pantalla A es veuen les diferents alternatives que es podien triar del menú inicial: manteniment de dades de pacients, patologies, entrada d'imatges i espectres, cerca a la base de dades, exportació. La pantalla B mostra els camps que s'omplien quan s'entren dades de pacients: codi INTERPRET, número de ressonància, sexe, número de 'clinical record' (formulari de dades clíniques), data de neixement, data d'espectroscòpia, hospital, patologia. Per a la pantalla C (exportació) es mostren els principals camps que es feien servir per crear l'arbre de directoris. Es podia igualment generar un llistat amb tots els casos d'una patologia determinada.

1.4.3 Reconeixement de Patrons en l'anàlisi de dades biomèdiques

El reconeixement de patrons és una anàlisi multivariant de la informació continguda en dades biomèdiques com, per exemple, espectres (ERM *in vivo*) (Hagberg, 1998). L'objectiu principal és identificar patrons que siguin capaços de separar diferents subgrups entre les dades; és també un mètode per extreure informació rellevant de dades extremadament complexes (Tate, 1997). És adequat per a l'anàlisi d'espectres ERM perquè, entre altres coses, analitza no només una variable o una mesura, sinó la relació entre les variables; discrimina entre diferents classes i també pot classificar una mostra desconeguda a una classe o altra; facilita la presentació de dades multidimensionals en una forma fàcilment interpretable; és una anàlisi que no depèn de factors subjectius relacionats a l'observador, així que no presenta cap mena de prejudici. El nostre grup ha participat de diferents treballs on s'han aplicat tècniques de reconeixement de patrons, tant *in vivo* com *in vitro*. (Tate i col, 1998; Maxwell i col, 1998).

² <http://www.mysql.com/products>

³ <http://java.sun.com>

En aquesta tesi no es descriuran tots els mètodes de reconeixement de patrons existents, sinó que se centrarà l'atenció a un dels mètodes utilitzats, l'Anàlisi Discriminant Lineal. Aquesta tècnica defineix criteris per classificar els 'objectes de test' en una de les classes conegudes pel sistema. És necessari, en aquest cas, un pas previ d'entrenament del sistema amb mostres que formin part d'una classe coneguda, intentant combinar les variables de manera de disminuir la variabilitat intra-classe i augmentar la variabilitat inter-classes.

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

Els objectius d'aquest treball han estat:

1. Analitzar quantitativa i qualitativament els patrons espectroscòpics dels líquids cístics provinents de diferents tumors cerebrals humans, intentant trobar correlacions que caracteritzessin determinats tipus o graus tumorals.
2. Estudiar l'origen de la ressonància a 2,03 ppm observada en líquids cístics de tumors humans, mitjançant espectroscòpia *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro*, a més d'anàlisis químics.
3. Analitzar quantitativa i qualitativament els diferents patrons espectrals per RMN de ^1H a 9,4 T d'extractes de metabòlits solubles en àcid perclòric (PCA) de biòpsies de tumors cerebrals humans, per cercar metabòlits que variessin força entre tipus i graus d'aquests tumors.
4. Participar en el desenvolupament d'una eina d'auxili al diagnòstic de tumors cerebrals humans (Decision Support System, DSS), durant el projecte INTERPRET, col·laborant en l'emmagatzemament protocol·litzat de dades i el seu control de qualitat.
5. Utilitzar les dades obtingudes *in vitro* de biòpsies i d'estudis amb dissolucions model per intentar millorar alguns dels classificadors ja desenvolupats durant el projecte INTERPRET.

MATERIALS I MÈTODES

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Obtenció de biòpsies de tumors humans i líquids cístics

Es van obtenir les biòpsies i líquids cístics com a subproducte de reseccions quirúrgiques de tumors cerebrals humans dutes a terme a l'Hospital Universitari de Bellvitge (HUB). Prèviament els pacients havien donat el seu consentiment mitjançant un full signat del tipus que s'adjunta a l'annex IV. La taula 3.1 recull el nombre total de mostres processades en aquest treball i també anteriorment al Grup d'Aplicacions Biomèdiques de la RMN (GABRMN). És important fer aquesta esmena perquè totes les mostres s'han presentat conjuntament a l'apartat de resultats i discussió. Els valors de mostres processades prèviament són valors anteriors a aquesta Tesi, no publicats i obtinguts al grup. Això s'ha fet perquè, havent estat processades les mostres amb la mateixa tècnica, d'aquesta manera es podia treballar amb una 'n' superior. De les mostres recollides en el temps d'aquesta Tesi, no totes van ser processades, ja que es van prioritzar mostres que tinguessin un interès en la clínica o bé mostres de tumors poc coneguts i estudiats per RMN. Després de la resecció quirúrgica, les mostres eren congelades i emmagatzemades en un contenidor a la temperatura del nitrogen líquid pel personal del quiròfan de l'HUB, fent-se la recollida de les mostres de manera sistemàtica cada dues setmanes. El temps promig d'espera entre la resecció i congelació de la mostra en N₂ líquid era de 5 minuts. Les mostres eren transportades a la UAB i emmagatzemades també a la temperatura de nitrogen líquid, fins el moment de la seva extracció amb àcid perclòric (PCA). L'estudi va ser aprovat pel comitè d'ètica, tant de la UAB com de l'HUB.

Patologia	Mostres processades en aquesta Tesi	Mostres processades Prèviament al GABRMN	Total
Astrocitoma pilocític	2	1	3
Astrocitoma grau II	5	2	7
Astrocitoma grau III	6	2	8
Glioblastoma multiforme	47	12	59
Oligodendroglioma	3	3	6
Oligoastrocitoma	3	0	3
Oligodendroglioma anaplàstic	0	1	1
Oligoastrocitoma anaplàstic	0	1	1
Medul·loblastoma	3	3	6
Hemangiopericitoma	1	3	4
Hemangioblastoma	0	3	3
Neurinoma	4	1	5
Metàstasis	14	4	18
Tumor Neuroectodèrmic	2	0	2
Meningioma	6	23	29
Limfoma	1	1	2
Total	97	60	157

Taula 3.1: Nombre de mostres utilitzades en aquest treball i nombre de mostres processades prèviament al GABRMN, de les quals també es comentaran resultats

3.2 Preparació prèvia de les mostres per espectroscòpia *ex vivo*

3.2.1 MOSTRES LÍQUIDES

Les mostres líquides, conservades en nitrogen líquid, també es van analitzar per RMN d'alta resolució. Es deixaven a temperatura ambient fins que tornessin novament a l'estat líquid, i s'introduïen al tub de RMN fins a un volum mínim fixat en 400µl. Per a aquestes mostres, un capil·lar coaxial amb TSP (3-trimetilsilil- 2,2,3,3- tetradeuteropropionat sòdic) va ser utilitzat tant com referència de desplaçament químic com de concentració, motiu pel qual va ser prèviament calibrat amb una solució de fumarat de concentració coneguda (secció 3.6.1).

3.3 Protocol d'extracció del teixit amb àcid perclòric (PCA)

3.3.1 Obtenció de l'extracte de biòpsies

Procés resumit a la figura 3.1.

Els extractes amb àcid perclòric es realitzaven en mostres de biòpsies congelades a la temperatura del nitrogen líquid. Es pesava prèviament la mostra encara congelada, i a continuació es polvoritzava entre dos blocs d'acer inoxidable (figura 3.2) mantinguts a la mateixa temperatura del nitrogen líquid. La pols obtinguda es recollia en un tub de centrífuga de policarbonat amb 6 ml de PCA 0,5M per gram de teixit fresc, prèviament pesat. Es tornava a pesar el tub amb la pols afegida i barrejada, i es calculava el pes real del teixit per diferència entre les dues pesades, sent aquest el pes de referència per a càlcul posteriors. S'hi afegia el patró intern a la concentració de 5 $\mu\text{mol/gtf}$ (grams de teixit fresc), calculant la concentració necessària de l'estàndard per a que el volum afegit no fos massa petit per no generar errors, ni massa gran per tal de no diluir el PCA que estava actuant a la mostra (normalment s'utilitzava l'estàndard a una concentració de 10 mM). Es centrifugava a 40.000 x g durant 10 minuts (temperatura 0 - 4°C); el sediment es reextreia amb el mateix volum anterior de PCA, es tornava a centrifugar i els sobrenedants s'ajuntaven i es neutralitzaven amb KOH a pH 6,5 - 7. El sediment es guardava per l'anàlisi de proteïnes. Els sobrenedants es deixaven reposar entre 15 i 30 minuts a 0 - 4°C per acabar de precipitar el KClO_4 format. Es tornava a centrifugar a 40.000 x g per 10 minuts, despreciant el sediment format pel precipitat de KClO_4 . Durant tots els passos del procés es mantenia la mostra en gel. El sobrenedant, que contenia els metabòlits solubles, es liofilitzava per eliminar l'aigua residual. El liofilitzat obtingut era ressuspès en $^2\text{H}_2\text{O}$, repartit en tres etapes que sumades fossin inferiors al volum final desitjat, mantingut en gel i centrifugat per eliminar el KClO_4 remanent. Es reunien els sobrenedants i es tornaven a liofilitzar. Les dues liofilitzacions eren realitzades per maximitzar la precipitació dels perclorats i reduir la presència de protons bescanviables. El liofilitzat es redissolia en el volum desitjat $^2\text{H}_2\text{O}$ i després d'aquesta segona dissolució, s'adquiria l'espectre de RMN de l'extracte. Sempre que fos possible, la dilució final tenia la proporció de 1 gtf/ml; això no era possible quan el pes del teixit era molt petit, degut a que es necessita un volum mínim de 350-400 μl per obtenció d'un espectre, a les nostres condicions de treball.

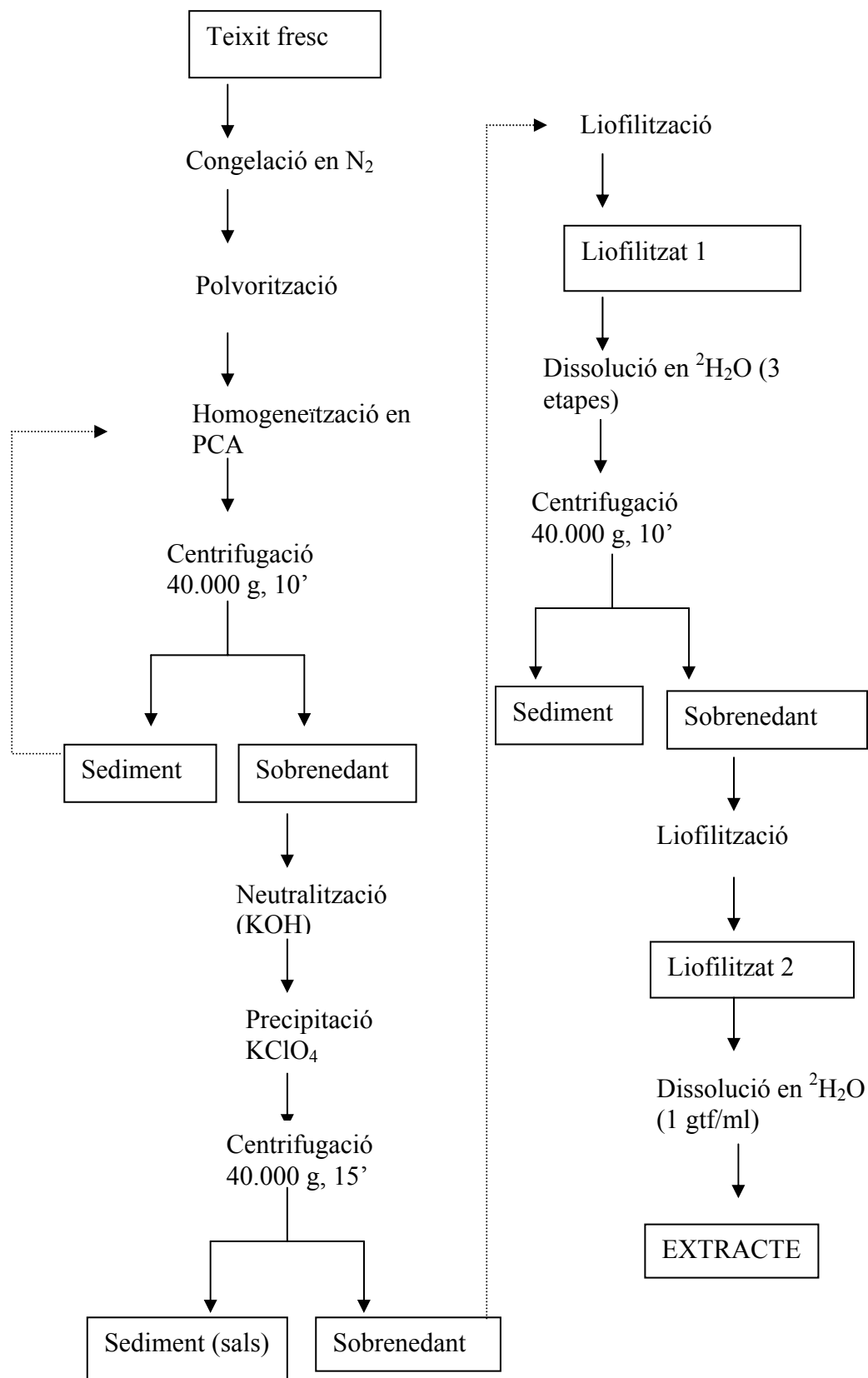


Figura 3.1: Esquema d'extracció de teixits amb PCA

3.3.2 Obtenció de l'extracte de líquids cístics

Els extractes PCA de líquids cístics van ser duts a terme de manera molt semblant als extractes de biòpsies, amb petites modificacions que es comenten tot seguit. Les mostres es van deixar descongelar a la temperatura ambient. La quantitat de líquid utilitzada depenia essencialment de la quantitat de mostra disponible. S'ajustava la molaritat de l'àcid perclòric per a que, afegint-lo al líquid cístic en la proporció de 6 ml d'àcid per ml de mostra, la concentració final fos de 0,5M. La resta del procediment era realitzada de manera igual que amb les biòpsies sòlides. El fumarat era afegit d'igual manera, a 5 $\mu\text{mol/ml}$ de mostra.



Figura 3.2: Morter d'acer utilitzat per a les extraccions en àcid perclòric

3.4 Preparació prèvia de les mostres per espectroscòpia *in vitro*

3.4.1 Reconstitució dels extractes per a RMN

Abans de l'adquisició dels espectres, l'extracte era reconstituït en $^2\text{H}_2\text{O}$, afegint-s'hi TSP dissolt en $^2\text{H}_2\text{O}$ com a referència de desplaçament químic i concentració. Els volums de reconstitució depenien del pes inicial de la mostra, com s'observa a la taula 3.2. Per a mostres més grans de 0,4g, s'afegia amb xeringa Hamilton un volum de dissolució de TSP suficient per resultar en una concentració de 1 mM en un volum de $^2\text{H}_2\text{O}$ tal que la relació gtf/ml fos

igual o el més propera possible a 1. Per mostres de pes més petit, tant la relació gtf/ml com la concentració de TSP eren menors, ja que es necessita un volum mínim de mostra per ésser analitzat per RMN (en aquest cas, s'utilitzaven tubs de 5 mm de diàmetre extern i el volum mínim necessari és 350 µl; degut a importants problemes de distorsió espectral amb volums molt ajustats, s'ha fixat el volum mínim en 400 µl). Abans d'obtenir l'espectre, el pH* era ajustat a la neutralitat amb NaO²H i ²HCl (Aldrich Chem Co, Milwaukee, WI). El pH* és la lectura del pHmetre no corregida per l'efecte isotòpic del deuteri sobre l'elèctrode ($p^2H = pH^* + 0,4$) (Bunton i Shimer, 1961).

Pes del teixit (gtf)	Vol. final (ml)	Vol. ² H ₂ O (µl)	Vol. TSP (µl) ^(a)
≥ 0,400	(b)	= Vol final - Vol TSP	(c)
0,300 - 0,400	0,4	385	15
0,200 - 0,300	0,4	390	10
< 0,100 - 0,200	0,4	395	5

Taula 3.2: Volums de reconstitució dels extractes PCA liofilitzats

(a) Volum de dissolució de TSP 20 mM en ²H₂O. Obtinguda a partir d'una dissolució inicial de TSP 100 mM

(b) Volum necessari per fer una relació gtf/ml igual a 1.

(c) Volum necessari de la dissolució de TSP 20 mM per a que la concentració final fos 1 mM.

(Martínez-Pérez, 1998)

3.5 Espectroscòpia *in vivo* (a camp clínic, 1,5T)

3.5.1 Pacients

Les exploracions de IRM/ERM de pacients per al projecte INTERPRET (<http://carbon.uab.es/INTERPRET>) s'han realitzat per radiòlegs en diferents centres d'Europa i també a Argentina. A Barcelona, els dos principals centres col·laboradors van ser l'Institut de Diagnòstic per la Imatge (IDI) al seu centre de l'Hospital Universitari de Bellvitge i el Centre Diagnòstic Pedralbes (CDP). Les dades es van obtenir a partir d'un protocol consens detallat a seguir (taula 3.3), però també es van utilitzar dades adquirides prèviament a l'establiment del protocol consens. Hi havia dos protocols estipulats per a IRM i ERM segons els centres on eren adquirides les dades. Els pacients donaven el seu consentiment mitjançant un full del que s'adjunta un exemple a l'annex V.

Ambdós protocols comptaven amb una part de IRM que consistia en adquirir imatges pre i post-contrast. El material de contrast (gadolini) era administrat abans de les mesures de

ERM en una dosi de 0,1 mM per kg de pes corporal. El vòxel (veure exemple figura 3.3) cobria la major part possible del tumor amb captació de contrast observada en la imatge pesada en T₁ post-contrast. La mida del vòxel variava entre (10 mm)³ i (20 mm)³, depenent del tamany del tumor, el que resultava en cubs de volums entre 1 i 8ml.

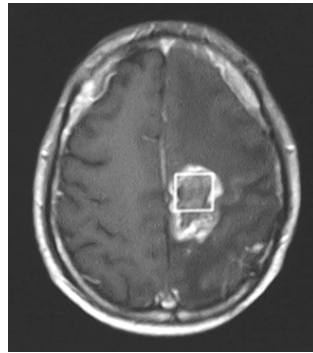


Figura 3.3: Imatge per ressonància magnètica pesada en T₁ post contrast amb el vòxel delimitat. Pacient I0368, diagnòstic histològic: metàstasi

3.5.1.1 LESIONS CÍSTIQUES

Les exploracions ERM i IRM han estat realitzades per radiòlegs a l'IDI de l'Hospital Universitari de Bellvitge en un espectròmetre Philips (ASC NT) de 1,5 T. S'han adquirit imatges spin eco (SE), T₁, *proton density* (densitat de protons, PD) i T₂ en talls sagital i axial, com a part del protocol estàndard d'adquisició. Es van adquirir també imatges SE i T₁ post-contrast (gadolini) (Magnevist®; Schering, Berlin, Germany) en una dosi de 0,1 mM per kg de pes corporal, en talls axial i coronal. Les mesures de ERM s'han realitzat després de l'administració de contrast. Els paràmetres d'adquisició eren: 512 punts, *sweep width* (SW) 1000 Hz, temps de reciclatge (TR) 2 s, temps d'eco (TE) 30 i 136 ms, seqüència Point RESolved Spectroscopy (PRESS). La mida del vòxel oscil·lava entre (15 mm)³ i (20 mm)³ (resultant en volums finals de cub entre 3,37 i 8 ml) depenent de la mida de la lesió i estava centrat en l'àrea necròtic/cística, evitant l'àrea cel·lular del tumor. Els criteris per definir una regió com a necròtic/cística eren: captació perifèrica de contrast però no al centre necròtic, i apariència homogènia de la regió. El nombre d'enregistraments variava segons la mida del vòxel (entre 96 - 192 scans). Es van adquirir també espectres del mateix vòxel sense supressió d'aigua amb els mateixos paràmetres, excepte que NS era de 8.

3.5.2 Dissolucions model

La espectroscòpia de mostres model ha estat realitzada per Dr. Carles Majós a l'IDI (Institut de Diagnòstic per la Imatge) de l'Hospital Universitari de Bellvitge en un espectròmetre Philips (ASC NT) de 1,5 T. Els paràmetres d'adquisició eren essencialment els mateixos que els utilitzats per espectres *in vivo*, excepte el nombre d'enregistraments que s'ha hagut d'ajustar en cas de mostres poc concentrades. Per exemple, en el cas de *Myo*-Inositol (m-Ino) i glicina (Gly), per la dissolució model amb menys concentració de m-Ino el nombre d'enregistraments ha hagut de ser augmentat (768 enregistraments), degut a la dificultat en obtenir un valor de quocient senyal/soroll (SNR) adequat per modulació que el sistema de spin d'aquest compost presenta a temps d'eco 136 ms.

Paràmetre	ERM Vòxel únic: (TE curt)		ERM Vòxel únic: (TE llarg)			
	Espectre metabòlits		Espectre sense supr. H ₂ O			
TE (ms)	30 (prot.1)	20 (prot.2)	30 (prot. 1)	20 (prot.2)	136	136
TR (ms)	2000		2000		2000	2000
Supressió H ₂ O	Si		No		Si	No
NS ⁴	96 - 192		8		128 - 256	8
Dummy scans	4		4		4	4
TD ⁵	1024		1024		1024	1024
SW ⁶	1000 Hz		1000 Hz		1000 Hz	1000 Hz

Taula 3.3: Paràmetres d'adquisició pels protocols d'adquisició *in vivo*. (prot. 1= protocol 1, prot.2= protocol 2). Al protocol 2, els espectres a TE curt (20 ms) eren realitzats amb la seqüència STEAM. Totes les demés adquisicions es van realitzar amb seqüència PRESS

3.5.2.1 PREPARACIÓ DELS MOSTRES MODEL A ESTUDIAR

Els estudis realitzats amb mostres model s'han dividit en a) estudis relacionats amb m-Inositol (m-Ino) i glicina (Gly), b) estudis relacionats amb taurina (tau) i c) estudis relacionats amb glutamat (glu)/ glutamina (gln).

⁴ NS (number of scans) variable segons la mida del vòxel

⁵ TD (Time Domain) de 2048 acceptable per espectròmetres GE

⁶ SW (Sweep Width) de 2500Hz acceptable per espectròmetres GE

Per l'estudi amb glutamat, glutamina i taurina, els metabòlits s'han dissolt per separat a una concentració de 100 mM en solució d'amortidor fosfat sòdic (PBS), amb azida sòdica afegida com a preservatiu a la concentració de 1g/l. S'han afegit acetat de sodi (20mM) i àcid fumàric (30mM) (singlets) per a la referència de desplaçament químic (metil d'acetat a 1,9 ppm) i fase. Les dissolucions s'han guardat congelades a -20°C pel seu posterior anàlisi per RMN d'alta resolució. El contenidor de les dissolucions model utilitzat es mostra en la figura 3.4 i és derivat del desenvolupat pel projecte INTERPRET pel control de qualitat instrumental (van der Graaf i col, 2002). El pH de les dissolucions model era ajustat a 7,6. La dissolució externa al cub de la dissolució model es composava de PBS amb azida sòdica a la mateixa concentració que per la dissolució model, amb pH ajustat a 8,3.

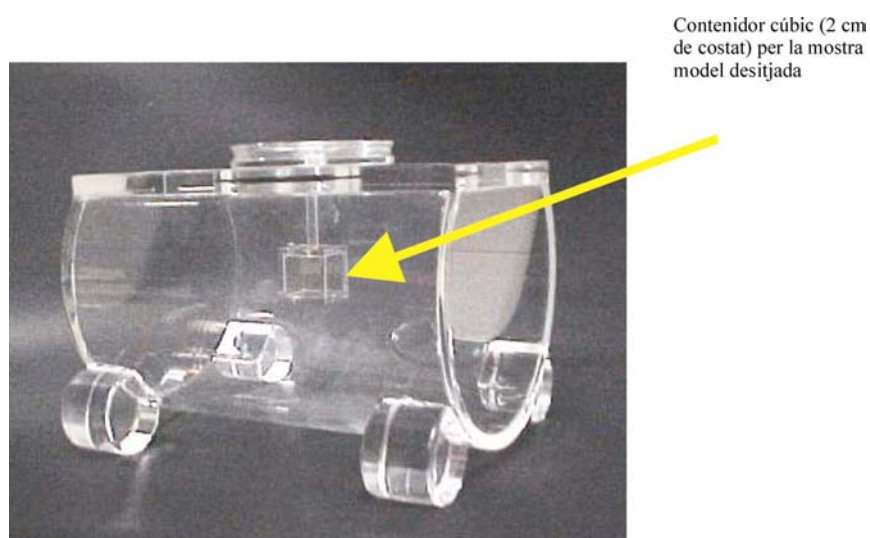


Figura 3.4: Contenidor per dissolucions model utilitzat en l'adquisició dels espectres de metabòlits a 1,5 T

En relació a la dissolució model de m-Ino-Gly, s'han realitzat una sèrie de càlculs previs (annex VI) per a determinar l'alçada teòrica que seria observada basant-se en la concentració i T_2 dels components (m-Ino, gly, i creatina (cr)), i després, en base a aquests càlculs, s'ha planificat una corba relacionant el quocient entre les concentracions de m-Ino i gly i l'alçada del senyal observada. El principal objectiu d'aquesta corba és deduir la quantitat relativa (quocient) de m-Ino i gly present als tumors *in vivo* i comparar-la amb la quantitat detectada *in vitro* (ja que *in vivo* no es pot fer la distinció directa entre aquests dos metabòlits), observant si eren coherents i si aquest coneixement podria ser aplicat en la gradació de tumors astrocítics o altres tipus tumorals.

Les concentracions utilitzades per a la corba de calibració estan recollides a la taula 3.4.

Mostra model n.	[m-Ino] (mM)	[Gly] (mM)	Quocient [m-Ino/Gly]	[Cr] (mM)
1	0	80	0	10
2	12	78	0,15	10
3	16	64	0,25	10
4	27	54	0,5	10
5	40	40	1	10
6	54	27	2	10
7	60	12	5	10
8	70	7	10	10
9	80	5	16	10
10	80	0	∞	10

Taula 3.4: Valors (mM) emprats per la corba de calibració a ser realitzada amb mostres model de gly i m-Ino

3.5.3 Processament dels espectres *in vivo* de pacients i mostres model

El processament dels espectres *in vivo* i de dissolució model s'ha fet amb MRUI, Magnetic Resonance User Interface (<http://carbon.uab.es/mrui/mruiHomePage.html>). Els espectres de metabòlits eren corregits per distorsions de fase dividint-los per l'espectre d'aigua sense suprimir (figura 3.5). L'aigua residual era filtrada amb l'algorisme de Hankel Lanczos Singular Value Decomposition (HLSVD) (van den Boogaart i col, 1994) i el resultat s'observa a la figura 3.6. Per als espectres de mostres model de m-Ino i gly, s'ha realitzat la mida de les alçades a 3,55 i 3,03 ppm (m-Ino, gly i Creatina) als dos TE (figura 3.7), i la fórmula utilitzada per calcular la disminució de senyal per modulació deguda al temps d'eco està representada a la següent equació:

$$\frac{\left(\frac{\text{Alçada } 3,55 \text{ ppm TE } 30\text{ms}}{\text{Alçada } 3,03 \text{ ppm TE } 30\text{ms}} \right)}{\left(\frac{\text{Alçada } 3,55 \text{ ppm TE } 136\text{ms}}{\text{Alçada } 3,03 \text{ ppm TE } 136\text{ms}} \right)} = RmI, gly / Cr \quad \text{eq. 3.1}$$

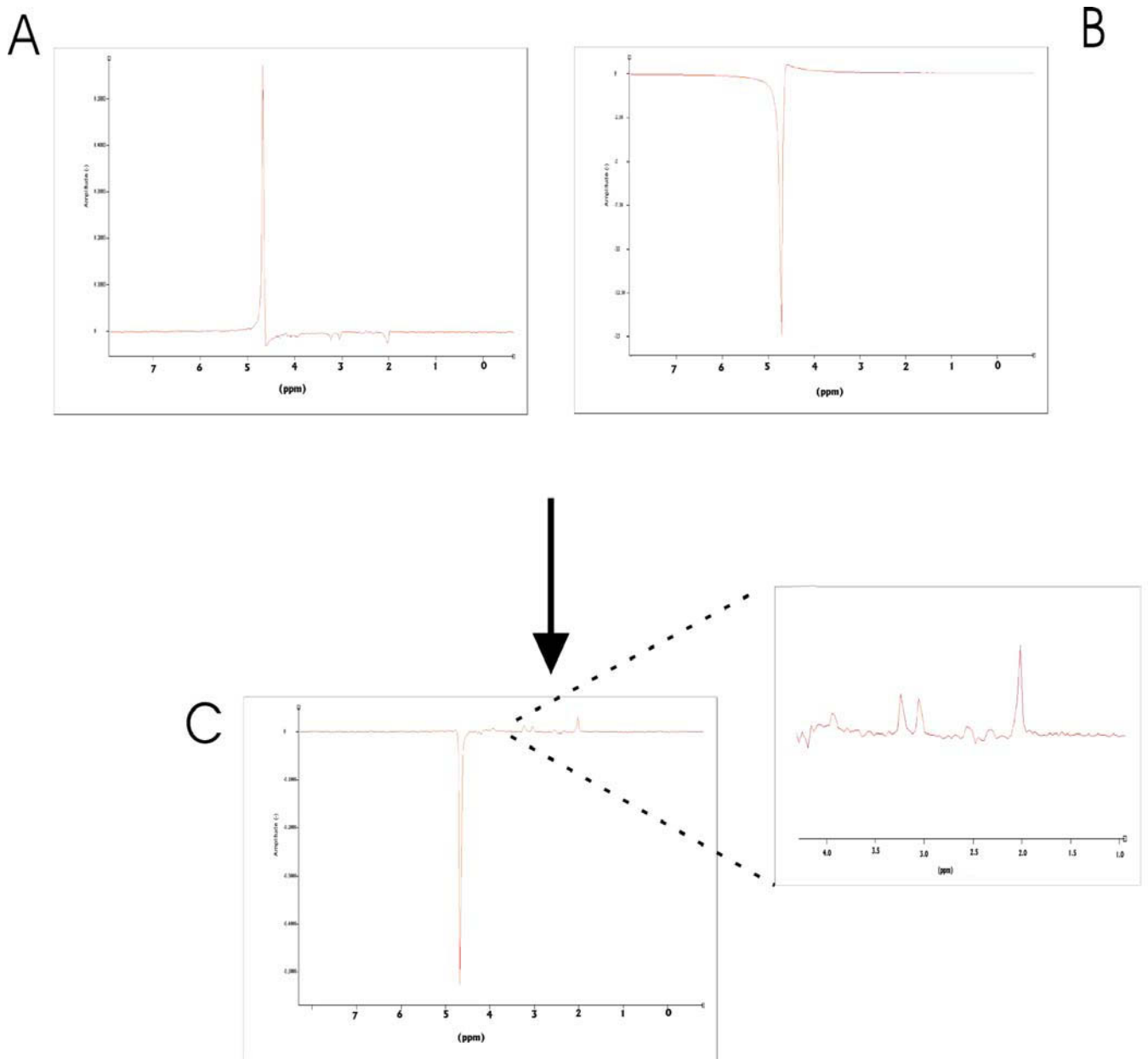


Figura 3.5: ERM de cervell control d'un voluntari, A) espectre de metabòlits amb atenuació parcial del senyal d'aigua, B) espectre de l'aigua sense suprimir i C) resultant de la divisió de A entre B i la consegüent correcció de la fase de les ressonàncies de metabòlits. Al costat, es mostra l'ampliació de la zona d'interès

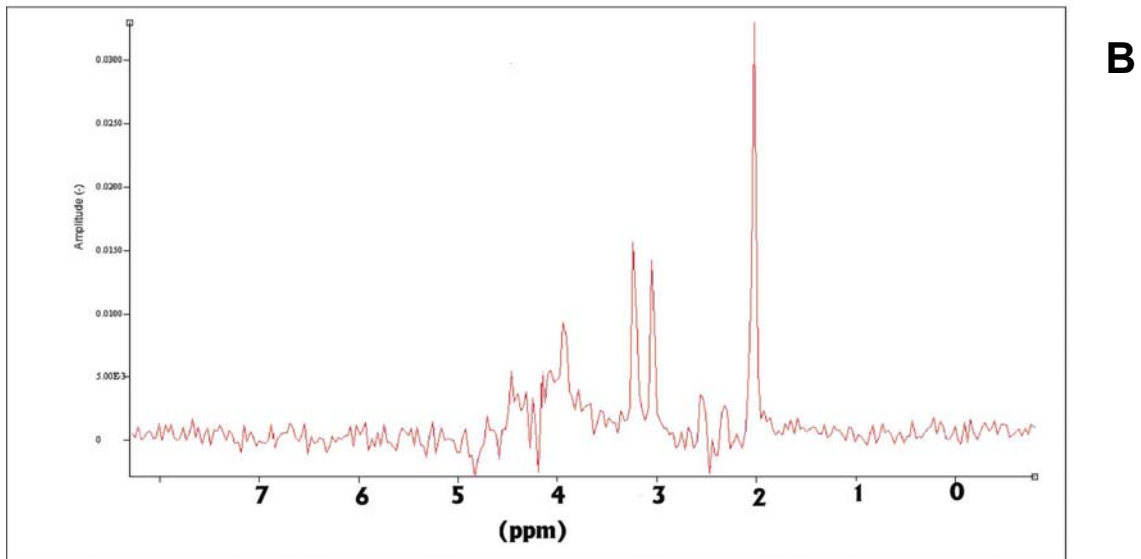
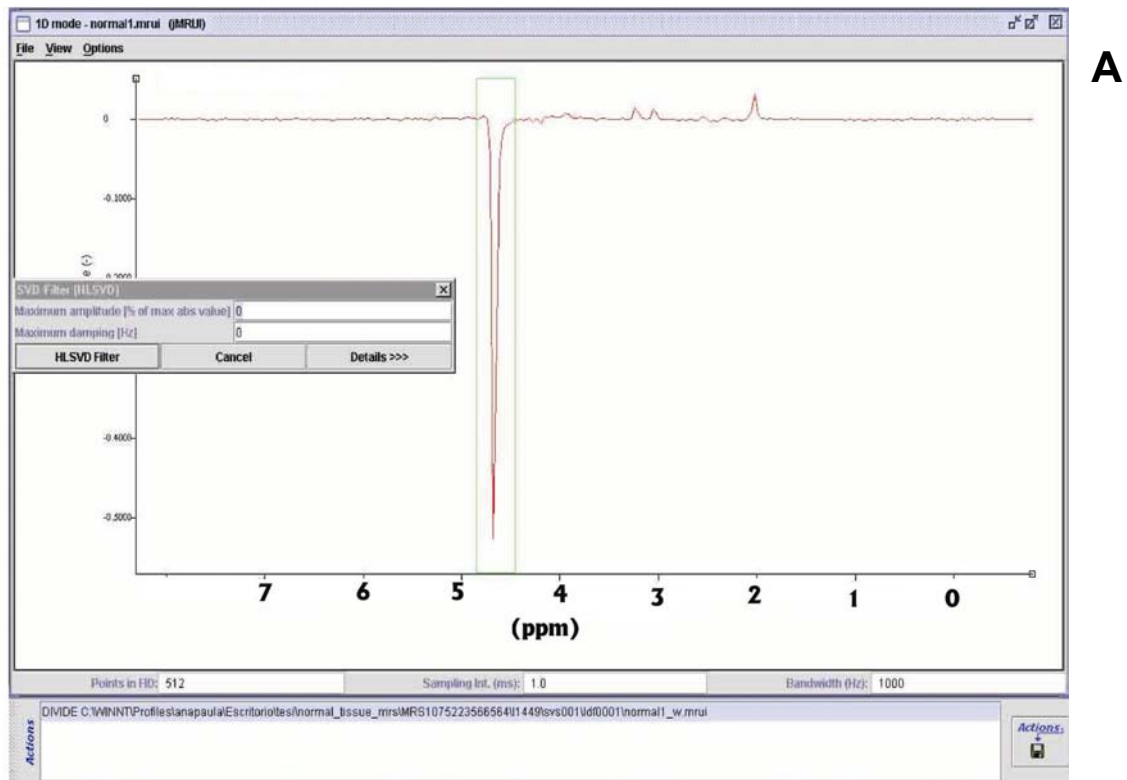


Figura 3.6: Espectre *in vivo* de cervell control d'un voluntari abans (A) i després (B) del filtrat de la ressonància de l'aigua residual amb l'algorisme HLSVD

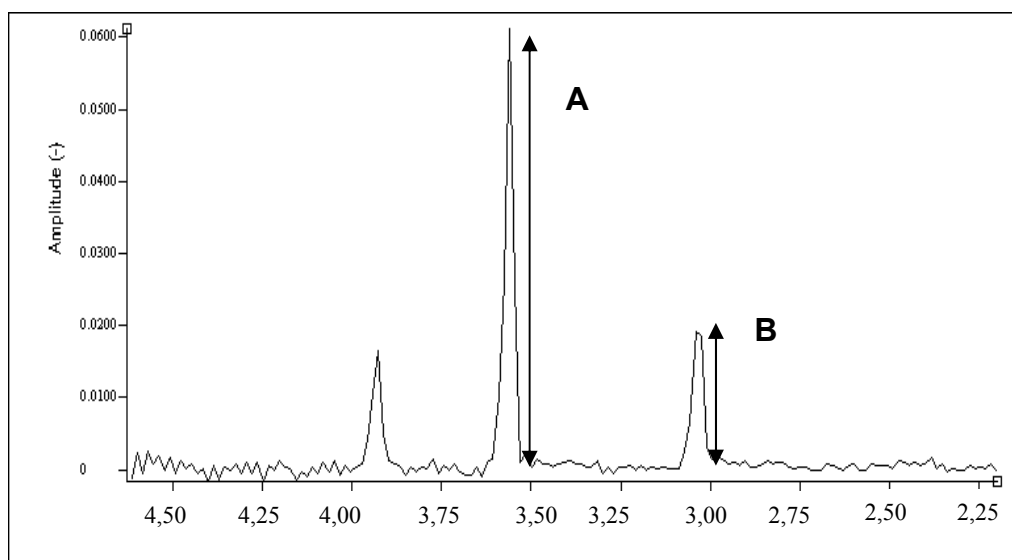


Figura 3.7: Mesura de les alçades dels pics a 3,55 i 3,03 ppm als espectres de la dissolució model n.3 ([m-Ino]/[gly] = 0,25) en un espectre de TE 30 ms. El mateix plantejament s'ha utilitzat pels espectres *in vivo*. A= alçada a 3,55 ppm, B= alçada a 3,03 ppm

3.5.4 Espectres promig

Els espectres promig han estat generats a partir dels fitxers ASCII provinents del processament amb MRUI. Prèviament als càlculs de promig, un programa desenvolupat al nostre laboratori corregia els fitxers per possibles problemes d'*offset*, prenent com a referència els intervals entre 9 i 11 ppm i $-0,5$ i -2 ppm. La zona d'aigua residual entre 4,33 i 5,10 ppm es portava a zero, i el fitxer resultant era normalitzat a la unitat abans del càlcul del promig, segons la següent fórmula:

$$\frac{X}{\sqrt{\sum X^2}} \quad \text{eq. 3.2}$$

X representa cada punt espectral corregit per l'*offset* i $\sum x^2$ és la suma del quadrat de tots els punts entre 7,1 i 2,7 ppm. Es va fer una interpolació de punts als espectres, a 0,02 ppm de resolució entre dos punts consecutius digititzats. Es comprovava l'alineament freqüencial, per ordre de preferència, usant un dels següents compostos: creatina a 3,03 ppm, colina a 3,21 ppm i lípids 1,29 ppm com a referència de desplaçament químic. Finalment, els espectres en el format canònic ASCII han estat sumats i els valors promig (\pm SD) per cada punt espectral calculats pel mateix programa citat anteriorment. Aquest programa també

calculava el quocient senyal/soroll (SNR, *signal-to-noise ratio*) que s'efectuava dividint l'alçada més alta trobada a la zona d'interès (0-3,4 ppm) per la desviació estàndar del soroll (promig del mesurat a les zones 9 a 11 ppm), on ja no es mesuren metabòlits i tot el que s'observa és soroll. Un altre mòdul del programa permetia també el càlcul del quocient senyal/soroll per a qualsevol ressonància de l'espectre.

3.6 Espectroscòpia *ex vivo* a alt camp (9,4T) amb biòpsies intactes i mostres de líquid cístic

Algunes mostres de líquids cístics, han estat analitzades per RMN *ex vivo*. La preparació prèvia es descriu a la secció 3.2.1.

3.6.1 Calibració prèvia del capil·lar

La calibració del capil·lar es feia en un pas previ a l'adquisició de l'espectre de la mostra de líquid cístic. S'adquiria un espectre d'una dissolució de concentració coneguda de fumarat (1 mM) amb el capil·lar a dins. El temps de reciclatge (TR) utilitzat en aquest pas era de 30s, suficient per una total recuperació del senyal de TSP i suficient per una recuperació de 95% del senyal de fumarat (T_1 del fumarat, $9,85 \pm 1,00$ s; dades del grup no publicades, Candiota AP, 2001). Després de corregir l'àrea de la ressonància del fumarat per aquesta lleugera saturació parcial, multiplicant l'àrea obtinguda per al fumarat per un factor de 1,05, es procedia a calcular la relació entre aquest senyal del fumarat i el senyal observat de TSP del capil·lar. Aquest pas era important per la quantificació posterior dels líquids cístics, com es detalla a la secció 4.1.3.

3.6.2 Experiments de mesura de T_1

Es va utilitzar el mètode d'inversió-recuperació (Martin i col, 1980). En 10 experiments consecutius, s'aplica un pols de 180° (p1) (figura 3.8), seguit d'un interval de temps variable (*variable delay* (d2), VD); posteriorment s'aplica un pols de 90° (p2) i es recull immediatament la FID. El temps de reciclatge total és el calculat a partir de la suma de $d1 + d2 + aq + p18$ ($d1$ = temps de reciclatge aq = temps d'adquisició i $p18$ = pols de

presaturació de la ressonància de l'aigua), i en circumstàncies ideals ha de ser igual o superior a $5 \times T_1$ de la ressonància d'interès. Els paràmetres utilitzats eren: *time domain* (TD) 16K, *sweep width* (SW) 4854 Hz, *offset 1* (O1) = *offset 2* (O2), situat a sobre la ressonància de l'aigua residual, p1= pols 180° calculat per a la mostra, p2= pols 90° calculat per a la mostra, d1= 20 s (T_1 aproximat de la ressonància d'interès= 0,72s), d2= intervals de temps variables generats a una llista que contenia valors entre 0,1 ms i 5 segons, sent el nombre d'enregistraments = 8. Quant a la potència de presaturació de l'aigua, t12 es va fixar en 60 db d'atenuació (equivalent a 0,05 mW), aplicada durant el p18 que durava entre 1 i 1,5 segons.

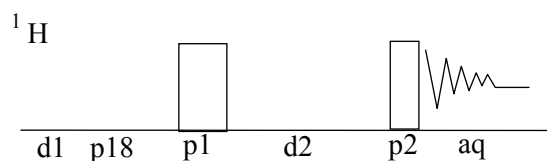


Figura 3.8: Seqüència de polsos utilitzada en l'adquisició dels espectres per a experiments de càlcul de T_1

Els espectres eren processats amb el programa WINNMR versió 6.1.0.0 (Bruker Daltonik, GmbH) en un ordinador AMD K - 6 400, amb sistema operatiu Windows NT. Aquests espectres eren processats consecutivament, començant per l'últim espectre adquirit i s'ajustava la fase de l'espectre, s'apuntava el valor obtingut i s'aplicava a tots els demés espectres. Amb el menú de deconvolució del programa WINNMR, es mesurava l'àrea referent a la ressonància d'interès i s'apuntaven els valors referents a cada d2.

Aquests valors eren ajustats a la equació 3.3 amb el programa de SigmaPlot (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) que és la equació que s'utilitza en el cas d'experiments d'inversió-recuperació. Els valors de d2 es van triar després d'algunes proves preliminars, de manera que els punts es distribuïssin uniformement per tota la extensió de la corba exponencial de recuperació de la magnetització.

$$M_z = M_0 \left[1 - 2 \exp\left(\frac{-t}{T_1}\right) \right] \quad \text{eq. 3.3}$$

3.6.3 Experiments de mesura de T_2

Els experiments de mesura de T_2 de les ressonàncies d'interès a 2,03 ppm (NAC) en fluids cístics i estàndards ha estat realitzat pel mètode de Carr-Purcell Meiboom Gill (Meiboom i Gill, 1958). S'adquirien 10 espectres amb repeticions de polsos resultant en intervals de relaxació entre 4 i 2000 ms. Paràmetres d'adquisició: TD= 16K, SW= 4854 Hz, O1 = O2, situat a sobre la ressonància de l'aigua residual, p1= pols 90° calculat per a la mostra, t12= 0,05 mW, p18= 1 - 1,5 segons (figura 3.9). El temps de reciclatge era de 10 s (suficientment llarg per evitar efectes de saturació de T_1 de les ressonàncies d'interès) i el nombre d'enregistraments estava comprès entre 32 i 256. Els espectres eren processats ajustant les ressonàncies d'interès a lorentzianes. Per al TSP, per l'àcid siàlic i NAA, s'ha considerat que hi havia només un component de T_2 i s'han ajustat a una funció monoexponencial. En les mostres de líquids cístics i altres estàndards, s'ha considerat la possible presència de 2 components de T_2 i els valors s'han ajustat a una funció biexponencial. En aquest darrer cas, aquestes àrees eren ajustades a una funció biexponencial decreixent amb Sigmaplot (eq. 3.4), en funció del temps transcorregut entre les repeticions de polsos. El resultat del càlcul incloïa el valor de T_2 de cada component, i el coeficient de contribució (C) a TE=0 (vegeu equació 4.2, secció 4.1.3 de resultats i discussió). Com a mínim una mostra de líquid cístic de cada patologia ha estat analitzada, i s'han calculat valors promitjos i coeficients de $T_{2,A}$ i $T_{2,B}$, que han estat aplicats a totes les altres mostres de la patologia corresponent. Els punts obtinguts en els experiments de T_2 de les mostres problema s'han intentat ajustar a funcions mono i biexponencials, observant les desviacions dels punts de la funció aplicada. També s'ha intentat un ajust triexponencial però l'ajust no era millor en relació a un biexponencial. L'equació per a un ajust monoexponencial és la 1.2, secció 1.1.2.2 d'introducció.

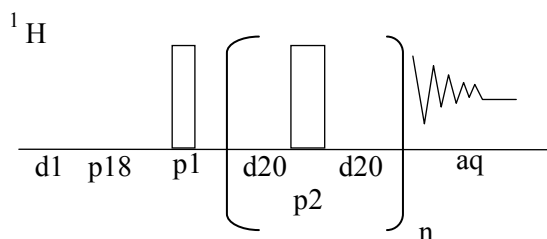


Figura. 3.9: seqüència de polsos utilitzada en l'adquisició dels espectres per a experiments de càlcul de T_2

$$M_{x,y} = M_{0,A} \left[\exp\left(\frac{-t}{T_{2,A}}\right) \right] + M_{0,B} \left[\exp\left(\frac{-t}{T_{2,B}}\right) \right] \quad \text{eq. 3.4}$$

3.6.4 Obtenció dels espectres spin-eco

Els espectres spin-eco eren adquirits de manera comparable a les exploracions realitzades als pacients *in vivo*. Els temps d'eco utilitzats eren 136 ms i 30 ms, que són els que s'utilitzen amb els pacients en les exploracions radiològiques prèvies a la decisió sobre la ressecció quirúrgica dels tumors detectats. Les seqüències d'adquisició, però, no són del tot equivalents, i tampoc ho és el camp magnètic utilitzat (9,4T al nostre cas, i 1,5T *in vivo*). Les adquisicions d'espectres spin-eco amb els extractes eren importants per detectar modulacions presentades pel patró espectral dels metabòlits que permetessin modelar les modulacions observades *in vivo*, amb l'avantatge d'una millor resolució espectral i poca interferència de la ressonància de l'aigua residual. La seqüència es mostra a la figura 3.10.

Els espectres amb seqüències de spin-eco eren a més adquirits amb una seqüència d'excitació sinusoidal de la banda espectral d'interès (figura 3.11), passant per un mínim aproximadament sobre la ressonància de l'aigua (4,75 ppm). Això fa que, a més de la modulació habitual observada en algunes ressonàncies que tenen constants d'acoblament (J) adients, s'observi també una inversió de les ressonàncies després del mínim de l'aigua, fent que totes les ressonàncies amb desplaçament químic més gran que 4,75 ppm es vegin invertides. Aquesta és una de les principals diferències respecte als espectres *in vivo* amb modulació de ressonàncies spin-eco, on aquesta inversió no s'observa. Un altre punt molt important és que, al tractar-se d'un perfil d'excitació sinusoidal, es fixa un màxim que rep el pols equivalent al pols de 90°. La seqüència utilitzada aquí és l'anomenada "Jump and return spin echo" (JRSE) i es poden trobar més detalls en Plateau i Guéron (1982). Els paràmetres utilitzats eren: TD = SI: 16K (8K reals), SW= 4000 Hz, p1: pols de 90° calculat per a la mostra, p2: pols de 90° calculat per a la mostra, p3: pols de 180° calculat per a la mostra, d3: TE/2 (68 mil·lsegons o 15 mil·lsegons) depenent del temps d'eco que es vulgui (136 ms o 30 ms), tl2: 0,5 mW d'atenuació, p18 (1 - 1,5 segons), TR: 10 segons (superior a 3 x T₁ de la

ressonància d'interès), d2: 181 μs (important per determinar els màxims d'excitació de la seqüència).

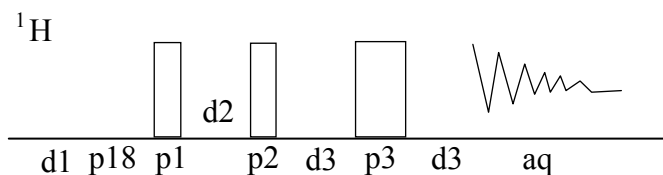


Figura. 3.10: Seqüència de polsos utilitzada per als experiments spin-eco

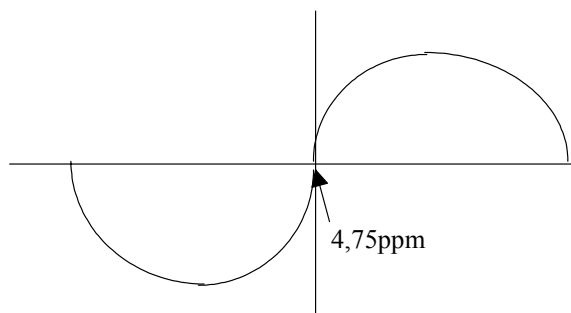


Figura 3.11: Perfil d'excitació sinusoidal de la seqüència JRSE. La fletxa senyala el punt d'excitació mínima ajustat a la posició de l'aigua

El perfil es pot determinar per una sèrie d'equacions on es fixa l'*offset* 1 (O1) i els punts mínims i màxims que es desitja i mitjançant un paràmetre que denominem d2:

$$d2 = \frac{1}{4 \times |O1 - \text{màx}(ppm)| \times 400,13 \text{Hz} / ppm} \quad \text{eq. 3.5}$$

En aquest cas, l'O1 (excitació mínima) està sobre la ressonància de l'aigua, o sigui, 4,75 ppm. Així, la distància freqüencial en Hertz entre màxim i nul del perfil d'excitació es treu del següent càlcul:

$$\delta(\text{Hz}) = \frac{1}{4 \times d2} \quad \text{eq 3.6}$$

La distància freqüencial resultant és, doncs, 1381,24 Hz, que correspon al màxim positiu d'excitació a la freqüència del lactat (1,33 ppm).

Tots els espectres van ser processats amb el WINNMR versió 6.1.0.0. Els espectres en general van ser processats amb correcció dels últims punts de la FID; *zero-filling* fins a 16K, *line broadening* (LB) 1 Hz i transformació de Fourier.

3.7 Espectroscòpia *in vitro* amb els extractes PCA de biòpsies de tumors humans i de líquids cístics

3.7.1 Obtenció dels espectres pols-adquisició

Els experiments de RMN amb els extractes es feien seguint seqüències de pols-adquisició (fig. 3.12). Les adquisicions van ser realitzades a l'espectròmetre ARX-400 del SeRMN de la UAB. La preparació dels extractes per a RMN ja ha estat comentada a l'apartat 3.4. Els paràmetres d'adquisició han estat els següents: TD=SI (size): 16k (8k reals), SW= 4854,36 Hz/ 12,13 ppm, O1= O2: situat a sobre la ressonància de l'aigua residual, p1: pols de 90° calculat per la mostra, t12: potència de presaturació de l'aigua, 60 db d'atenuació (equivalent a 0,05 mW), p18: temps d'aplicació del pols de presaturació (1 - 1,5 segons).

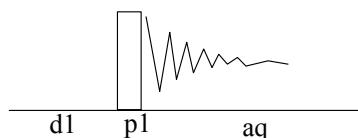


Figura 3.12: Seqüència de polsos utilitzada en els espectres de pols-adquisició

Inicialment tots els espectres eren adquirits amb un TR total de 30 s però posteriorment, per optimitzar els temps d'adquisició, s'ha modificat el protocol. Es feia una adquisició curta amb 30 s de TR a efectes de quantificació del fumarat i càlcul de pèrdues, de 8 scans i amb temps de reciclatge total ($p1+aq+p18$) de 30 segons, i una adquisició més llarga amb un TR total de 10s. Les correccions a les ressonàncies es feien tenint en compte valors de T_1 prèviament descrits (Moreno, 1996). El primer espectre de 8 scans s'utilitzava per comprovar les pèrdues del fumarat al procés d'extracció, que posteriorment s'aplicarien a tots els metabòlits d'aquell extracte concret. És important que el temps de reciclatge sigui llarg perquè el T_1 del fumarat també ho és ($9,85 \pm 1,00s$) (dades prèvies del grup no publicades: Candiota, 2001). El temps de reciclatge es calculava a partir de la suma de $p1 + aq + p18$; el nombre d'excitacions era calculat d'acord amb el pes inicial de la mostra de la que s'havia fet l'extracte PCA, i així, aquest temps d'adquisició era variable. La fórmula utilitzada per

calcular el nombre d'excitacions (a l'espectre amb més enregistraments) per aconseguir una relació senyal/soroll semblant, en funció del pes de la mostra era la següent:

$$NS = \left(\frac{0,4}{\text{pes teixit (g)}} \right) \times 64 \quad \text{eq. 3.7}$$

Amb un temps de reciclatge 3 cops superior al T_1 d'interès, la recuperació de la magnetització és d'un 95%; aquest percentatge de recuperació està relacionat amb el quocient TR/T_1 .

El processament es feia de manera similar als espectres spin eco, amb excepció del LB (0,3Hz en comptes de 1Hz).

3.7.1.1 Processament dels espectres i càlcul de la concentració de metabòlits

Els passos pel càlcul de la concentració de metabòlits als espectres eren els següents:

- Correcció de la línia de base ("*offset correction*")
- Deconvolució i càlcul de les àrees de les ressonàncies amb el menú de deconvolució del programa WINNMR (figura 3.13), tenint en compte la seva multiplicitat i constants d'acoblament. Es feia directament l'ajust manual de les lorentzianes referents a les ressonàncies, respectant les constants d'acoblament i els desplaçaments químics.
- Correcció la ressonància del fumarat per la saturació del senyal. L'àrea trobada a l'espectre amb un TR de 30 s correspon a un 95% del total en absència de saturació, així que el factor de correcció era una multiplicació per 1,05.

3.7.1.2 Correcció de les pèrdues al procés d'extracció mitjançant la concentració de fumarat detectada per RMN

Les possibles pèrdues produïdes pels diferents passos del procés d'extracció (centrifugacions, liofilitzacions, etc) han estat quantificades mitjançant l'estàndard intern introduït al moment de la polvorització. El procediment utilitzat era el següent:

- Contrastar, relativament al TSP i a l'espectre amb 30s de TR total, si hi havia la concentració esperada de fumarat (5 $\mu\text{mol/gtf}$). La fórmula utilitzada era la següent:

$$C_{\text{fumarat}} (\mu\text{mol} / \text{gtf}) = \frac{C_{TSP} \times N_{TSP} \times A_{FUMARAT}}{A_{TSP} \times N_{FUMARAT}} \times \frac{\text{ml dissolució}}{\text{g teixit}} \quad \text{eq.3.8}$$

On: C és la concentració en mM, N el nombre de protons de la ressonància considerada i A l'àrea calculada per deconvolució amb WINNMR. Els ml de dissolució són els mencionats al pas 3.4, i en general es fixava en 0,4 ml, però podrien ser superiors si el pes del teixit era superior. El pes del teixit era el pes calculat per diferència (pas 3.3.1).

Amb el resultat anterior es calculaven les pèrdues produïdes pels diferents passos del procés d'extracció i es corregien totes les concentracions calculades per a les ressonàncies restants.

$$\% \text{ pèrdues} = 100 - \left[\left(\frac{\mu\text{mol} / \text{gtf fumarat trobat}}{\mu\text{mol} / \text{gtf fumarat posat}} \right) \times 100 \right] \quad \text{eq. 3.9}$$

Aquestes concentracions (C_x), eren calculades en relació al TSP, a l'espectre amb 10s de TR total i amb les correccions de T_1 – quan necessàries, amb la següent fórmula :

$$C_x = \left(\frac{C_{TSP} \times N_{TSP} \times A_x}{A_{TSP} \times N_x} \right) \times \left(\frac{100}{100 - \% \text{ pèrdues}} \right) \quad \text{eq.3.10}$$

On: X és el compost d'interès.

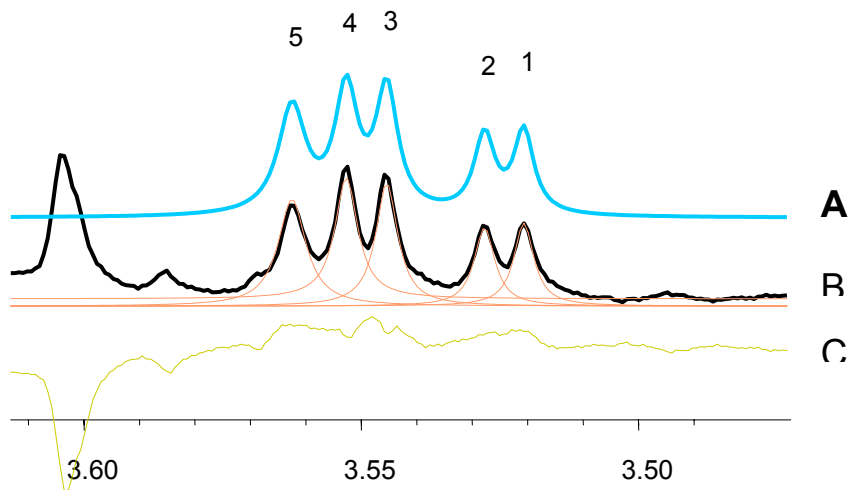


Figura 3.13: Exemple de deconvolució per càlcul d'àrees de m-Ino i gly en un extracte PCA de la biòpsia d'un pacient diagnosticat d'astrocitoma de grau II. B) Espectre original (en negre) i lorentzianes ajustades (en rosa); A) Espectre resultant de la suma de les lorentzianes i C) Residual obtingut de l'ajust d'aquests 4 pics. Les línies de l'espectre original, resultant i residual s'han separat en el pla vertical per una millor visualització. Pics 1, 2, 3 i 4: m-Ino; Pic 5: gly

3.8 Anàlisi de proteïnes al sediment de l'extracte PCA i als líquids cístics

3.8.1 Dissolució prèvia dels sediments d'extractes PCA

El sediment de l'extracte PCA té la proteïna en forma precipitada, i per detectar-la és necessari fer un pas previ de dissolució. La dissolució consisteix en afegir al sediment d'extracció 6 ml de NaOH 0,1M per cada 100 grams de teixit fresc inicial; juntament amb la peça magnètica d'agitació, el conjunt es pesava abans de la dissolució; es cobria amb parafilm i es deixava en agitació a temperatura ambient durant aproximadament 12 hores. Quan es completava la dissolució de les proteïnes, es treia el parafilm i es tornava a pesar el conjunt per tenir en compte possibles evaporacions d'aquest dissolvent. La diferència de pes es dividia per la densitat calculada del NaOH 0,1M (1,031g/ml) per obtenir el volum final *real*. Es passava aquesta dissolució a tubs de polipropilè es centrifugava per 2h i 30 min a 8000

rpm (centrífuga Beckman, rotor JA-20, equivalent a 40.000 x g). Aquest pas era necessari per sedimentar les proteïnes col·lagenoses, i el sobrenedant (“non collagenous proteins”) és el que s'utilitzava per a la determinació de proteïnes en sediment d'extracció (Lilienthal i col, 1950). En general, era suficient una dilució 1:2 d'aquest sobrenedant per a que estigués dins la zona de linealitat del mètode espectrofotomètric de quantificació, veure secció 3.8.3.

3.8.2 Determinació de proteïnes als líquids cístics

La determinació de proteïnes en aquestes mostres es va fer al líquid intacte, diluït a 1:50 per a que la concentració de proteïnes estigués dins de la zona de linealitat del mètode de Folin-Lowry (secció 3.8.3).

3.8.3 Determinació de proteïnes als sediments d'extracció PCA pel mètode de Folin-Lowry

La determinació de proteïna per aquest mètode es basa en: a) la reacció del reactiu cúpric alcalí amb l'enllaç peptídic i a continuació b) la reacció del reactiu de Folin-Ciocalteu (un complex de fosfomolibdotungstat) amb els complexos formats amb el biuret i tirosina/triptofà (Lowry i col, 1951).

A 0,1 ml del sobrenedant obtingut a l'apartat 3.8.1 s'afegia 1,1 ml del reactiu de Biuret i es deixava a la temperatura ambient durant 10 minuts. Després s'afegien 0,05 ml del reactiu de Fenol de Folin-Ciocalteu i es barrejava immediatament, deixant durant 30 minuts a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, es llegia l'absorbància a 725 nm en espectrofotòmetre Cary-100 (Varian, Australia Pty Ltda, software versió 02.00(25)). Considerant la quantitat de proteïna present a les biòpsies sòlides, s'havia de diluir el sobrenedant 1:2 per a que el test estigués dins la linealitat.

RECTA PATRÓ PER LA REGRESSIÓ LINEAL DE LA CONCENTRACIÓ DE LES MOSTRES

La concentració es determinava per regressió lineal a una recta patró feta amb un estàndard de proteïna del mateix “kit” (albúmina sèrica bovina), de concentració 10g/dl. Aquest estàndard era diluït 1:100 i es feien dilucions posteriors adients per obtenir una recta de calibració equivalent a concentracions de 0, 25, 50, 75 i 100 mg/dl de proteïna. Considerant la equació genèrica d'una recta $y=ax+b$, el valor de proteïna als teixits era calculat de la següent manera:

$$mg \text{ proteïna} / gtf = \frac{\left[\frac{(Abs - b)}{a} \right] \times \text{factor dilució}}{100} \times \frac{\text{Volum final NaOH}}{g \text{ teixit}} \quad \text{eq. 3.11}$$

On Abs és la lectura obtinguda a l'espectrofotòmetre; a i b són els termes genèrics de la recta de regressió obtinguda $y=ax+b$.

3.8.4 Normalització dels valors de metabolits a la concentració de proteïna

La normalització dels valors dels metabòlits pel valor de proteïna (transformació en nmol/mg de proteïna, equació 3.12) es feia tenint en compte que, per a tumors de cel·lularitat molt diferent, també hi podria haver nivells de metabòlits diferents (veure secció 4.4).

$$\text{metabolit nmol} / \text{mg proteïna} = \frac{(\text{metabolit } \mu\text{mol} / \text{gtf}) \times 1000}{\text{proteïna mg} / \text{gtf}} \quad \text{eq.3.12}$$

3.9 Anàlisis químiques realitzades als líquids cístics

3.9.1 Assaig de Periodat-Resorcinol per quantificar àcid siàlic

Aquest assaig s'ha realitzat segons el mètode descrit per Jourdian i col (1971) i està basat en la reacció de periodat-resorcinol. Els reactius utilitzats son:

- àcid Periòdic 0,04M
- solució de 0,6g de resorcinol en 60 ml HCl 28% (calculat tenint en compte el percent i la densitat de l'àcid clorhídric inicial), 40 ml H₂O i 25 μmols CuSO₄
- alcohol tert-butílic 95%.

Els reactius eren preparats diàriament dissolent en aigua solucions mare 0,4M d'àcid periòdic i resorcinol al 6%. Es preparava una recta de calibració per quantificar les mostres; el volum de mostra per anàlisi era de 0,25 ml, sent 0,2 μmol el valor màxim de siàlic que poden tenir les mostres per estar dins la linealitat del mètode segons establert per l'autor. Encara que inicialment s'utilitzava àcid siàlic per dur a terme la recta de calibració, aquest estàndard s'ha

canviat posteriorment a mucina (*Mucin from bovine submaxillary glands*, M3895, Sigma Aldrich), degut a la major semblança d'aquesta amb el compost d'interès. La mucina és una proteïna amb percentatge d'unió a àcids siàlics entre 9 i 15% (informació facilitada pel fabricant). Aquest tipus de canvi d'estàndar ja ha estat descrit per altres autors (Pearce i Major, 1978) i l'optimització d'aquest canvi està descrita a la secció 4.1.5.2.

A les mostres incògnita i les mostres patró per a la recta de calibració, s'afegien 50µl de solució d'àcid periòdic (solució de treball 0,04M), s'agitaven les dissolucions, i es posaven a un bany de gel per 35 min. Posteriorment, s'afegien 625µl de reactiu de resorcinol (solució de treball 0,6%) i es deixaven en bany de gel per 5 minuts. Passats aquests 5 minuts, es posaven a un bany a 100°C per 15 minuts. Es refredaven en aigua tèbia i s'afegien 625µl d'alcohol tert butílic 95%, barrejant vigorosament. Per últim, es deixaven per 3 minuts a l'estufa a 37°C i es mesurava l'absorbància a 630 nm. Aquesta tècnica descriu diferents variants per mesurar àcid siàlic total i per àcid siàlic lligat a altres estructures. Per a aquest assaig, en general era suficient una dilució 1:5 de les mostres per a que estiguessin dins del rang de linealitat de la recta (veure resultats a la secció 4.1.5.2).

3.9.2 Test del carbazol per quantificar àcid hexurònic

Aquest assaig va ser primerament descrit per Bitter i Muir (1962), i està basat en el mètode del carbazol. Els reactius utilitzats eren una solució de 25 mM de bòrax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) en H_2SO_4 , solució de 0,125% de carbazol en etanol absolut i solució de 100µg/ml d'àcid glucurònic. Es realitzava una recta de calibració amb al menys 5 punts fets a partir de la dissolució mare de 100µg/ml d'àcid glucurònic (d-glucuronic acid, SIGMA G-8645) per la posterior quantificació de la mostra, com resumeix la taula 3.5:

Tub	µg/ml	sol. mare 100µg/ml glucurònic	H ₂ O
1	0	0	200µl
2	20	40µl	160µl
3	40	80µl	120µl
4	60	120µl	80µl
5	80	160µl	40µl

Taula 3.5: Valors per a la recta patró de l'assaig de l'àcid glucurònic

A les mostres incògnita i a les mostres patró per a la recta de calibració, s'afegia 1 ml del reactiu de bòrax en H_2SO_4 ; es deixaven bullir en un bany a 100°C durant 10 minuts i posteriorment es refredaven a la temperatura ambient. S'afegien 50 μl del reactiu de carbazol i novament es posaven al bany a 100°C durant 15 minuts. Es deixaven refredar i es mesurava l'absorbància a 530 nm. Per a aquest assaig, en general calia diluir les mostres 1:10 per a que estiguessin dins del rang de linealitat del test. Aquesta reacció és afectada per altes concentracions de NaCl (iguals o superiors a 0,5 M), per la qual cosa cal vigilar si els valors són excessivament elevats. La presència de fumarat en concentració apreciable a les mostres interferia igualment amb el test, així que per tests on les mostres continguessin fumarat (cas d'extractes PCA amb fumarat com estàndard per control de pèrdues) calia fer una recta de calibració a part amb aquest compost afegit.

3.10 Procediments relacionats al projecte INTERPRET

A principis del projecte INTERPRET (<http://carbon.uab.es/INTERPRET>), l'any de 1999, vaig col·laborar activament en la organització i entrada de dades històriques i noves en la base de dades preliminar d'INTERPRET. Breument, aquesta tasca consistia en recopilar una base de dades d'espectres de tumors i altres patologies cerebrals que poguessin ser erròniament diagnosticades com a tumors en base a l'observació per IRM, així com dades clíniques i resultats d'anatomia patològica de la biòpsia, quan estiguessin disponibles. Això possibilitaria una avaluació més completa del paper de l'espectroscòpia en el diagnòstic d'anormalitats cerebrals, en especial de tumors. Aquesta base de dades era necessària per al desenvolupament d'un paquet de programari de classificació tumoral basat en reconeixement de patrons i també d'una interfície gràfica que seria de gran interès en l'ajuda a la decisió diagnòstica de tumors cerebrals i que podria ser instal·lada en institucions que realitzessin exploracions IRM/ERM.

La base de dades inicial (ipDB) era una versió preliminar en llenguatge MySQL⁷ i interfície en Java⁸ de la qual s'ensenyà un exemple de pantalla a la figura 3.14. (Masllorens,

⁷ <http://www.mysql.com/products>

⁸ <http://java.sun.com>

1998). Posteriorment en el període 2001-2002, vaig participar en la recopilació i entrada d'imatges que faltaven en alguns casos, i després, en part del control de qualitat requerit per als casos que fan part de l'anomenat "prototip industrial", eina d'ajuda a la decisió clínica que, per a la seva industrialització, necessitava la certificació de la Comunitat Europea.

3.10.1 Protocol d'entrada de dades a la ipDB: dades històriques i dades noves.

Com ja s'ha esmentat en la introducció, el projecte INTERPRET tenia diversos objectius, i per assolir-los, un dels passos inicials era la recopilació d'una sèrie d'espectres i dades clíniques en una base de dades, que permetria el desenvolupament posterior de classificadors automàtics basats en patrons espectrals. Per a les dades noves s'ha establert una sèrie d'informacions i dades essencials, i per a les dades històriques s'ha entrat el que inicialment estava disponible; posteriorment s'ha intentat completar la informació que mancava.

Les dades que es requerien eren dades clíniques, referències de l'hospital, anatomia patològica i també dades relatives als paràmetres d'adquisició de les dades espectroscòpiques.

De les dades històriques s'han hagut de cercar les informacions pertinents, ja sigui als fitxers on estaven emmagatzemades, a les capçaleres dels fitxers o en contacte amb l'hospital d'origen. Per a les dades que no tenien diagnosi d'anatomia patològica consensuada per INTERPRET, s'han intentat aconseguir preparacions histològiques a l'hospital d'origen per a anàlisi dels patòlegs del projecte INTERPRET. Pels casos que no disposaven de fitxer informàtic de IRM s'han escanejat les imatges existents en la placa fotogràfica al Servei de Fotodocumentació i Anàlisi de la UAB.

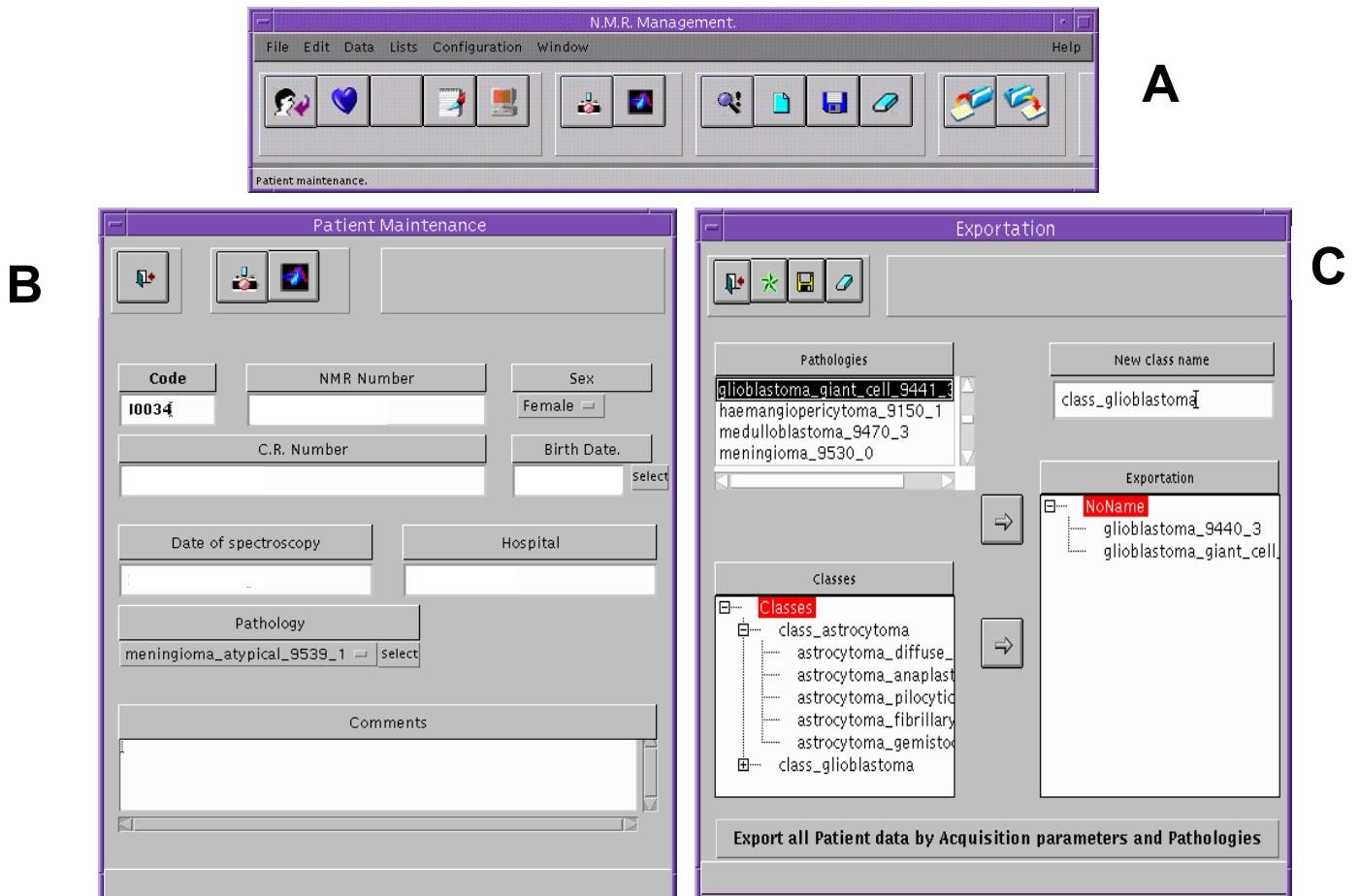


Figura 3.14: Exemple de pantalles A) del menú principal, B) de la pantalla d'entrada de dades dels pacients a la ipDB i C) de la pantalla d'exportació de casos.

El protocol d'entrada de dades era el següent:

- Incorporar les dades del pacient a la base de dades, per tal d'assignar-li un número INTERPRET. El número tenia quatre dígit.
- Omplir el “Full de control d'entrada de dades” (annex II d'aquesta Tesi).
- Crear un nou directori anomenat “I<nnnn>”, on n era un número de l'1 al 9. El número de quatre xifres resultant correspondria al número INTERPRET de la base de dades. Traslladar els arxius dels directoris antics al nou directori, en el cas de pacients antics. En el cas de pacients nous, guardar l'e-mail/fitxer que conté les noves dades.
- Crear un arxiu <nom>.zip a partir dels FIDs

- Renomenar els fitxers d'acord amb el n° INTERPRET. Els fitxers d'imatges eren convertits prèviament a <nom>.jpg i també es renomenaven seguint la mateixa regla de nomenclatura.

Nota: Si només hi havia un arxiu per cada pacient, l'arxiu portava una A, per si n'apareguéssim més amb posterioritat. Els fitxers posteriors rebien el mateix nom amb l'afegit 'B', 'C', etc.

- Processar els fitxers FID renomenats amb MRUI i exportar-los al directori de destí ja anomenat al punt 3.
- Importar els <nom>.zip, <nom>.jpg, <nom>.dat, <nom>.asc, dins la base de dades.

Aquests fitxers s'han emmagatzemat en aquesta base de dades preliminar, fins que ha estat disponible la base de dades definitiva, quan s'han migrat de forma automàtica a aquesta nova base de dades (BD). S'han emmagatzemat tots els casos, tant els que disposaven d'informació completa com els que no. La falta d'informació considerada substancial determinava la classe assignada als diferents casos, i la participació o no d'aquests casos en el desenvolupament dels classificadors per reconeixement de patrons.

3.10.2 Cerca i introducció de les imatges de referència absents de la iDB

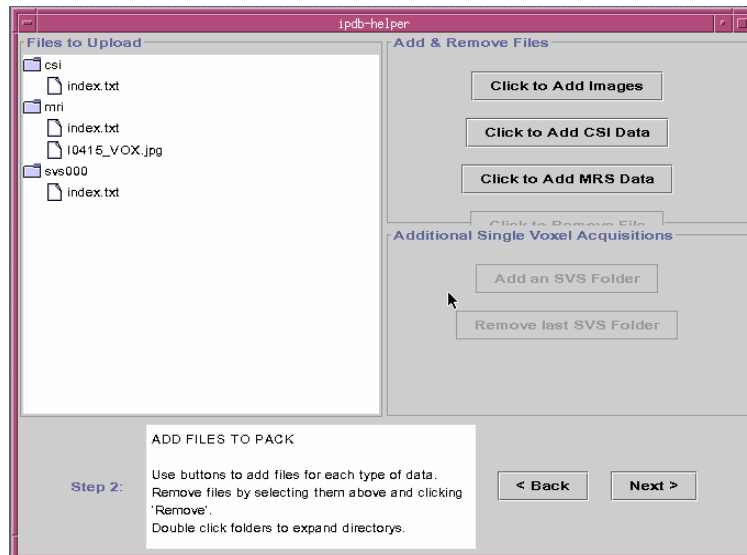
Quan un gran percentatge de les dades ja estaven degudament migrades a la BD definitiva, s'ha procedit a examinar les imatges de referència (amb el vòxel d'interès sobreimprès) que no estaven presents, buscant-les i introduint-les a la BD. La imatge de referència és molt important, ja que senyala la part del tumor de la qual s'ha realitzat la espectroscòpia, donant informació respecte si era una part cística, si incloïa part de teixit normal, edema, etc. També s'han aprofitat per cercar altres tipus d'imatge que faltessin (ponderades en T_1 , T_2). Les imatges s'han aconseguit per diferents mitjans: quan estaven disponibles, el centre que adquiria les dades les enviava. Quan no era possible obtenir-les en format informàtic, s'escanejaven. El format informàtic d'elecció, sempre que fos possible, era el *Digital Imaging Communication In Medicine* (DICOM). Aquest format transporta la imatge original adquirida a l'espectròmetre (sense alteracions) conjuntament amb informació demogràfica, característiques d'adquisició i dades de l'escàner. Per visualitzar aquest tipus

d'imatges es requereixen programes especials, que en el nostre cas va ser el MRICro (versió 1.28 <http://www.psychology.nottingham.ac.uk/staff/cr1/mricro.html>).

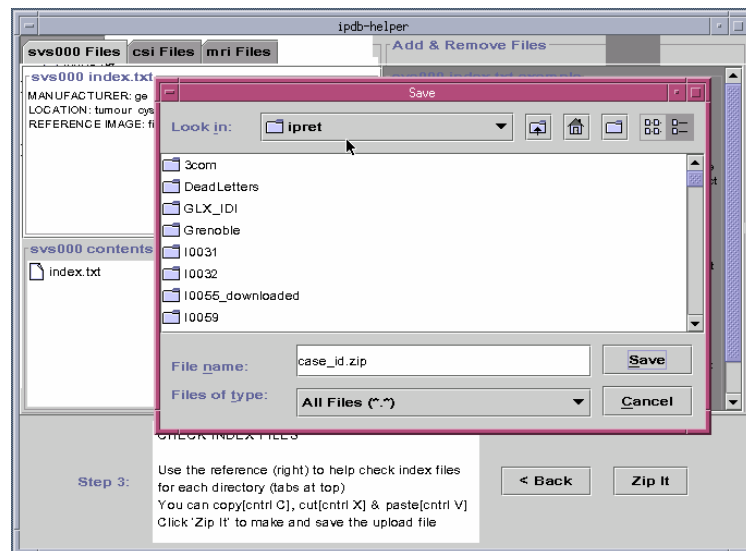
Les imatges aconseguides van ser introduïdes en la iDB. El format d'introducció era de "paquet", amb l'estructura de dades adequada per a que la imatge fos correctament posicionada. Els paquets podien ser construïts manualment o amb l'ajut d'un programa d'interfície desenvolupat per a aquesta finalitat (exemple de pantalla a la figura 3.15).

3.10.3 Control de qualitat de les dades als prototips científic i industrial

A més del prototip científic, un dels objectius del projecte era la integració i industrialització dels prototips i interfícies gràfiques. Per a obtenir això, era necessari que el futur producte passés per un procés de certificació per a la Comunitat Europea. El procés de certificació del prototip industrial desenvolupat requeria determinats criteris de control de qualitat que s'han establert amb l'ajut de Pharma Quality Europe (PQE, <http://www.pqe.it/>). S'inclouen requeriments del producte, beneficis clínics, comprovacions de software i processos de validació. La finalitat era avaluar la fiabilitat, precisió i correcció entre les dades emmagatzemades a la base de dades utilitzada en aquest prototip i les dades originals. Òbviament hi havia altres apartats del projecte igualment sotmesos al control de qualitat, però esmentar-los aquí està més enllà dels objectius d'aquest treball.



A



B

Figura 3.15: A i B: Exemples de pantalla del programari per la construcció dels paquets per introduir imatges a la iDB

En el control de qualitat dels prototips, s'han avaluat les següents fases del procés:

- Selecció i inclusió dels casos
- Recollida de dades clíniques
- Dades de ressonància magnètica
- Diagnòstic histopatològic
- Validació de les dades i inclusió de la base de dades al prototip

L'objectiu general d'aquest control era avaluar totes les activitats involucrades en la generació, monitorització, control i manteniment de la informació present en la base de dades.

S'han establert els següents grups de dades segons el grau d'importància i s'han fixat els percentatges mínims de comprovació d'aquestes dades (Carson i Dent, 1990).

1) Dades Crítiques:

Dades imprescindibles per al desenvolupament dels classificadors i la correspondència entre les dades emmagatzemades i fitxers/dades clíniques originals. S'havien de comprovar el 100% dels casos.

2) Dades Principals

Dades que podien influenciar, en alguna manera, les dades crítiques. S'havien de comprovar el 20% dels casos, de manera aleatòria.

3) Altres dades

Les dades remanents. Es va fer un mostreig de les dades per control de qualitat, un 5% dels casos, de manera aleatòria.

L'estructuració del control de qualitat de les dades està representada, de forma senzilla, a la figura 3.16. La descripció completa de les dades (crítiques, principals i altres) es troba a l'annex III d'aquesta Tesi.

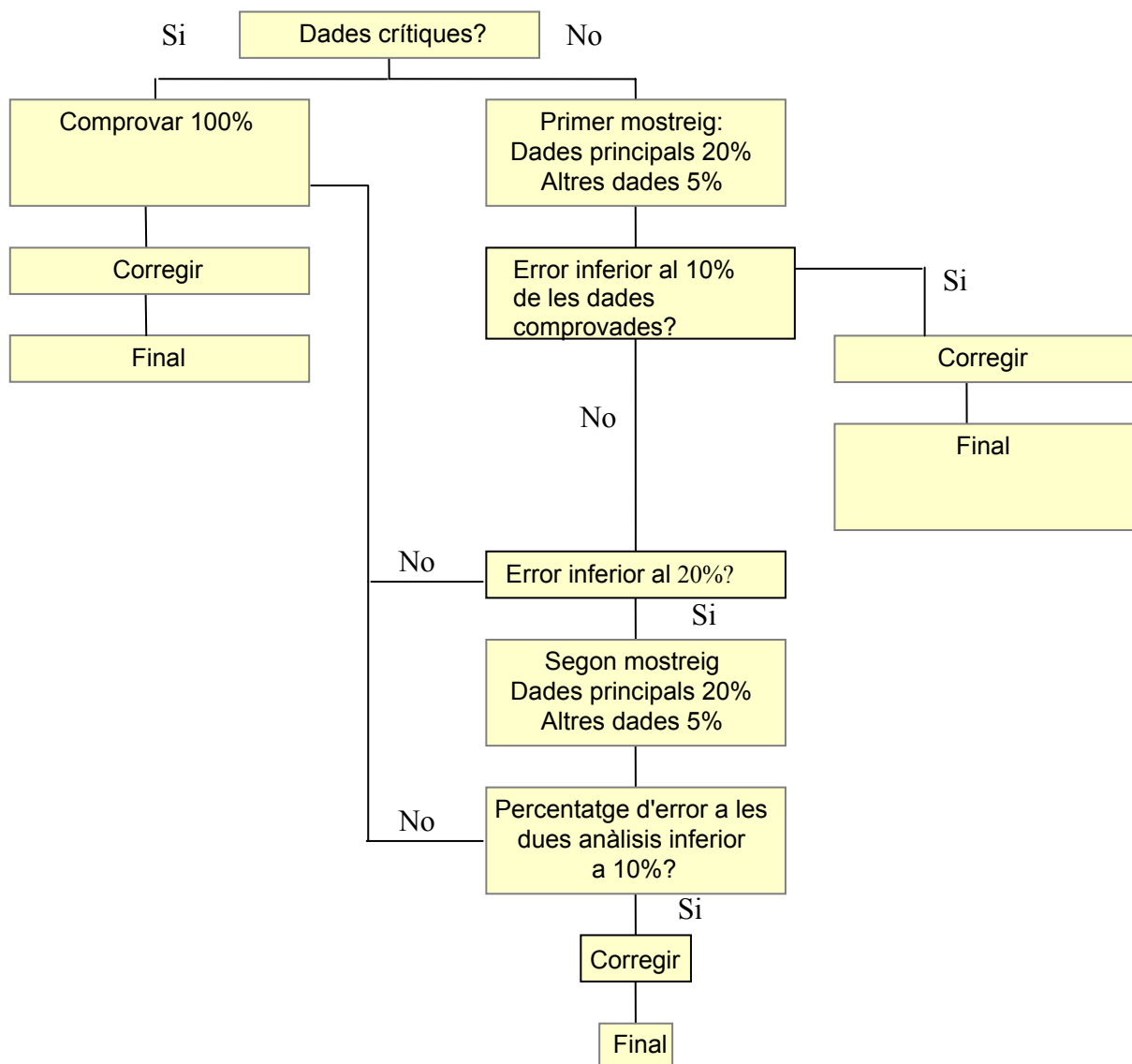


Figura 3.16: Organigrama de les directrius seguides en el control de qualitat de les dades

3.11 Tècniques de reconeixement de patrons

Les tècniques de reconeixement de patrons han estat utilitzades amb els espectres *in vivo* i *in vitro*. S'ha buscat reproduir els procediments desenvolupats per Tate i col (2003), donant continuïtat i també inserint nous paràmetres com el quocient $R_{mI, gly/Cr}$ als dos temps d'eco per avaluar si el percentatge d'incert de la classificació dels tumors millorava.

3.11.1 Espectres *in vivo*

3.11.1.1 GRUPS DE PATOLOGIES

Els grups utilitzats amb els espectres *in vivo* van ser els mateixos que van utilitzar Tate i col (2003): MEN= meningiomes, LGG= tumors glials de baix grau i AGG= tumors agressius, indistintament glioblastomes i metàstasis; aquests són els grups que fan part del prototip científic i també de l'industrial desenvolupat al projecte INTERPRET. No es van poder utilitzar, però, tots els casos per la introducció de la variable del quocient RmI, gly/Cr ja que es necessitaven els espectres dels dos TE, i amb una bona relació senyal/soroll. Per als líquids cístics, els grups de patologies triats van ser *benignes* (tumors astrocítics de baix grau, craniofaringiomes, hemangioblastomes), *malignes* (glioblastomes, metàstasis) i *abscessos*.

3.11.1.2 FORMAT DELS ESPECTRES

Els espectres originals han estat processats a partir de la FID amb un mòdul de processament automàtic desenvolupat al nostre laboratori. Aquest mòdul corregeix la fase de les ressonàncies a partir de l'espectre de l'aigua sense suprimir, filtra l'aigua residual amb l'algorisme HLSVD (van den Boogaart i col, 1994), fa una multiplicació exponencial de la FID equivalent a un eixamplament de 0,8 Hz, executa la transformació de Fourier, fa correcció de l'*offset* (com ja ha estat descrit a l'apartat 3.5.4), porta a zero els punts entre 4,33 i 5,1 ppm (zona de possibles artefactes per proximitat a aigua residual), executa la normalització com s'ha descrit a l'apartat 3.5.4 i fa l'alineament de freqüències usant, per ordre decreixent de prioritat, creatina (3,03 ppm), colina (3,21 ppm) o lípids (1,29 ppm). Els espectres dels tres grups per als quals hi ha classificadors desenvolupats es guardaven en format ASCII, en el qual cada punt representava una variable.

3.11.1.3 TRIA DE LES VARIABLES

A efectes de simplificació, no s'han introduït totes les variables al SPSS versió 11.5.1 (SPSS Inc, Chicago, IL) per la seva anàlisi, ja que el rang de ppm cobert pels espectres és gran i en moltes zones no hi ha cap informació d'interès. Així, es van restringir les variables analitzades a l'interval on s'observen els metabòlits d'interès. En aquest cas, el rang va estar entre 0,848 i 4,242 ppm, d'aquesta manera suprimint també la regió de l'aigua. En total, aquesta regió de l'espectre va representar un total de 177 variables. Per triar les variables que

més correlació presentaven amb la caracterització de la patologia, s'utilitzaven els fitxers ASCII en el rang ja descrit anteriorment, i s'atribuïa a cada patologia un nombre, ja que és necessari per efectuar el test de correlació. Aquests valors s'emmagatzemaven a un fitxer de dades llegible pel programa SPSS, i es realitzava el test de la correlació bivariada de Pearson (Lizasoain i Joaristi, 1997).

S'ha controlat que les variables triades tinguessin determinades característiques:

- que no fossin variables degudes a l'atzar, o sigui, que les variables anterior i posterior també tinguin un grau de correlació alt;
- que no fossin variables repetides; les variables que s'han repetit en dues comparacions diferents s'han considerat només un cop.

És important remarcar que, donat un conjunt de dades d'aprenentatge del classificador (*training set*) del qual el grup més petit té un nombre de representants de 'n', el nombre de variables utilitzat no hauria de sobrepassar aproximadament $n/3$, ja que s'estaria donant pas a un possible sobreentrenament (*overtraining*) del classificador. Un entrenament excessiu del sistema proporcionaria una excel·lent classificació dels casos del conjunt d'aprenentatge, però una classificació dolenta amb casos nous. En aquest cas, es preferible tenir una classificació amb un índex d'encert inicial més baix, però que classifiqui acceptablement casos nous i de diferents centres.

3.11.1.4 ANÀLISI DISCRIMINANT LINEAL (LDA, LINEAR DISCRIMINANT ANALYSIS)

Les variables de més elevat valor de 'r' en el test de correlació de Pearson van ser utilitzades per entrenar el sistema de classificació. Amb el mateix programa SPSS i a partir del mateix fitxer, s'executa una classificació discriminant, amb les següents opcions:

- Inclusió de les variables per passos; el que deixa que el propi programa triï les variables amb major grau de variabilitat i descarti les altres;
- Matriu de covariança intra-grups;
- Probabilitat segons el tamany del grup, el que atribueix ponderació diferents segons el nombre de representants que tingui cada grup;

- Distància de Mahalanobis entre punts i centroids (com a opció de mètode per a la inclusió de variables per passos).

Quan s'ha introduït la variable RmI,gly/Cr s'ha forçat la inclusió de les variables.

En el cas dels líquids cístics, no totes les variables seleccionades pel programa han estat utilitzades, per evitar el *overtraining* ja comentat en l'apartat anterior. Considerant el nombre ideal suggerit de variables, que es 1/3 del nombre de casos del grup més petit a ser classificat, hem intentat apropar-nos el màxim possible del valor ideal. S'han utilitzat, d'una banda els espectres de líquids cístics dividits en;

- líquids cístics de tumors benignes
- líquids cístics de tumors malignes
- abscessos

En una altra aproximació, s'han dividit els espectres a TE llarg de la següent manera:

- espectres de voluntaris (cervell normal)
- espectres de tumors
- espectres de líquids cístics combinats (benignes+ malignes+ abscessos)

3.11.2 Espectres *in vitro*

L'anàlisi discriminant lineal amb els espectres d'extracte PCA de biòpsies *in vitro* s'ha fet de manera enfocada a les preguntes de discriminacions bilaterals que s'han formulat en aquesta tesi. Es tracta en tot cas d'un anàlisi preliminar que necessita més aprofundiment. Mentre que amb els espectres *in vivo* s'utilitzaven les variables d'alçades del vector espectral analitzat, als espectres *in vitro* es van utilitzar els valors calculats de metabòlits en $\mu\text{mol/gtf}$, ja que el nombre de variables seria massa elevat si consideréssim els punts espectrals, i haurien de passar per una reducció prèvia. Els metabòlits quantificats van ser m-inositol, glicina, s-inositol, taurina, creatina, GABA, colina, fosfocolina, glicerofosfocolina, alanina, n-acetil aspartat, glutamat i glutamina. La normalització feta amb aquests valors es fa de manera similar a l'equació 3.2, secció 3.5.4, adaptada a l'equació 3.13, amb l'objectiu de fer càlculs semblants als duts a terme *in vivo*.

$$\text{metabolit normalitzat} = \frac{\text{metabolit } (\mu\text{mol} / \text{gjf})}{\sqrt{\sum \text{metabolits} (\mu\text{mol} / \text{gjf})^2}} \quad \text{eq. 3.13}$$

3.11.2.1 TRIA DE LES VARIABLES I LDA

L'anàlisi inicialment s'ha fet deixant que el sistema triés lliurement les variables, i respectant aquesta decisió. En determinats casos s'ha intentat forçar l'entrada d'alguna variable per veure el resultat sobre el percentatge d'encert final. En les anàlisis en que el sistema no considerava cap variable apta per a la discriminació, s'ha realitzat una LDA forçant l'entrada de totes les 13 variables (12, si algun dels casos no disposava de quantificació de GABA). Els demés paràmetres van ser els mateixos que al punt 3.11.1.4.

3.12 Anàlisis estadístics

Tots els anàlisis mencionats en aquest treball es van dur a terme amb el programa SPSS versió 11.5.1 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Per comprovar normalitat de la distribució dels valors s'ha realitzat el test de Kolmogorov-Smirnov (K-S); s'ha considerat 0,05 com a valor crític, i valors de p superiors a 0,05 es van considerar com distribucions normals. A partir del resultat obtingut en el test de K-S, s'ha procedit a una forma o altra de comparar les mitges i determinar la possible significació estadística de la diferència entre aquestes.

3.12.1 Distribució normal dels valors: test t i ANOVA

Quan els valors a ser analitzats obeïen a una distribució normal, es podia procedir al test 't' de student, si es tractava de dos grups a comparar o a l'ANOVA si hi havia 3 grups o més per comparar. També s'aplicava el test de Levene per investigar si les variàncies eren homogènies; valors de significació superiors a 0,05 indicaven una homogeneïtat de les variàncies.

3.12.1.1 TEST T DE STUDENT

El test t s'aplicava quan hi havia dos grups d'igual variància per comparar, o bé quan hi havia més grups però les variàncies eren diferents. El nivell de significació s'ha situat al 0,05.

3.12.1.2 ANOVA

El test de ANOVA s'ha aplicat quan hi havia tres o més grups per comparar, suposant una distribució normal i una homogeneïtat de les variàncies. S'ha optat per analitzar el test posteriorment amb el post-hoc de Tukey; el nivell de significació s'ha situat al 0,05%.

3.12.2 Distribució no normal dels valors: test no paramètric

Quan la distribució de valors no corresponia a una distribució normal, s'ha aplicat un test no paramètric de comparació. En aquest treball, el test no paramètric aplicat és el U de Mann Withney; el nivell de significació s'ha situat en 0,05.