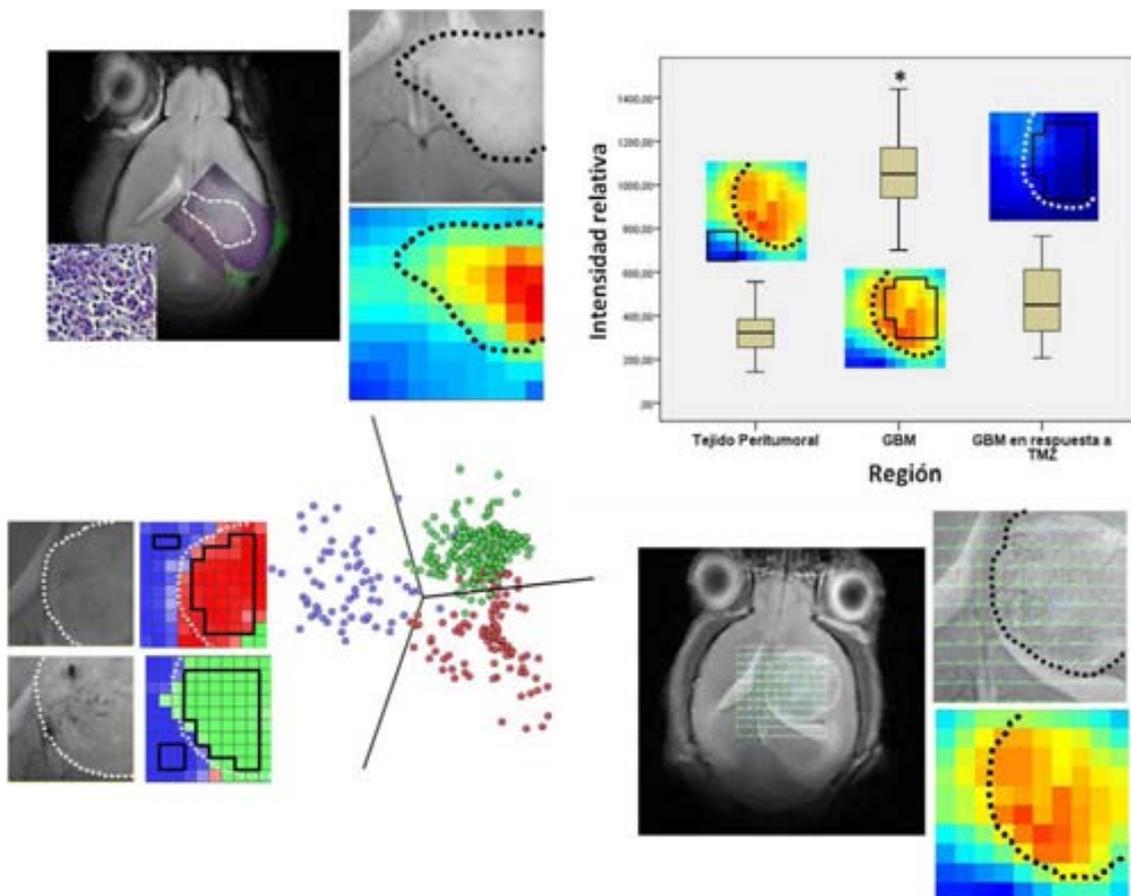


Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Aproximación a la caracterización morfológica y molecular por IRM y ERM de la respuesta a la terapia en modelos pre-clínicos de glioma.



Teresa Delgado Goñi

Diciembre de 2011



Universitat Autònoma de Barcelona

Aproximación a la caracterización morfológica y molecular por IRM y ERM de la respuesta a la terapia en modelos pre-clínicos de glioma.

Teresa Delgado Goñi

Diciembre de 2011

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Universitat Autònoma de Barcelona.

Memoria presentada por Teresa Delgado Goñi para optar al grado de Doctor dentro del programa de doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona.

El abajo firmante, Dr. Carles Arús Caraltó, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, certifica que la presente tesis ha sido realizada bajo su dirección por Teresa Delgado Goñi.

Firmado: Dr. Carles Arús Caraltó

Firmado: Teresa Delgado Goñi

Cerdanyola del Vallès, 22 de Diciembre de 2011.

A mi madre, por estar siempre a mi lado, por ser mi luz en el camino.

“Serendipity. Look for something, find something else, and realize that what you’ve found is more suited to your needs than what you thought you were looking for”.

Lawrence Block.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Carles Arús, por haberme aceptado en su grupo de investigación y haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección; por su apoyo ante las dificultades, por su dedicación y, en definitiva, por todas las cosas que he aprendido de él a lo largo de estos años y que han contribuido a mi formación científica y personal.

A todos los compañeros del GABRMN que me han visto reír, llorar y vivir la tesis, porque han estado a mi lado cuando lo necesitaba y juntos hemos compartido momentos muy importantes para mí. A Ana Paula Candiota y Margarida Julià-Sapé, las primeras que me acogieron en el laboratorio y que han estado siempre presentes y dispuestas a guiarme y a ofrecerme su experiencia. Ana Paula, gracias por hacer lo posible y lo imposible para ayudarme siempre que lo necesité y por los buenos momentos que hemos compartido durante este tiempo. Marga, gracias por tu asesoramiento y por el buen humor siempre presente. A Rui Simoes, por ser mi “gurú”, por contribuir a los cimientos de esta tesis, por haberme guiado y ayudado a lo largo del experimental, aquí y en la distancia, por los consejos y por estar siempre dispuesto a colaborar y por la confianza depositada en mi trabajo. A Juana Martín, porque desde mi segundo día en el laboratorio ha sido mucho más que una compañera, ha sido mi amiga y con ella he crecido como científica y como persona y he compartido innumerables experiencias que de otro modo no habrían sido posibles. A Milena Acosta por hacer que el trabajo en equipo sea un placer, por todo lo que he aprendido de la vida junto a ella y por la energía positiva indispensable. A Myriam Dávila, por su dulzura, por su interminable sonrisa tan necesaria y por estar siempre dispuesta a colaborar en todo lo posible. A Elena Jiménez, por la empatía y la paz que siempre lleva consigo, por ser capaz de combinar como nadie la parte de responsabilidad con la de diversión. A Magda, por su apoyo y por los imprescindibles momentos de desconexión y risa en el último tramo de la tesis. A Alina, por su sinceridad sin “medias tintas” ante las cosas. Y a todos los que estuvieron en el

grupo y compartieron una valiosa parte de si mismos conmigo: A M^a Rosa Quintero, Silvia Ferrer, Oscar Tibaduisa, Edgar Villarraga, Iván Olier, Sandra Ortega, Alexander Pérez, Sergi Torralba y Josep Alemany, ha sido un placer teneros como compañeros.

A todos los componentes del *Servei de Ressonància Magnètica Nuclear* de la UAB, en especial a Miquel Cabañas, por su valiosa colaboración para resolver cuestiones pertenecientes a este y a otros trabajos y por su sentido del humor, que tanto me ha hecho reir. Y a Silvia Lope, por su esfuerzo y dedicación para ayudarme a entender numerosos conceptos y problemas relacionados con la RMN y por los buenos momentos dentro y fuera de la universidad.

Al personal del *Servei d'Estabulari* de la UAB que ha estado presente durante estos años, en especial a Jordi Cantó, Javier Benito, Francisco Cabello, Ignacio Segovia y Carlos Grau. Y por supuesto un especial agradecimiento al personal técnico, sin el cual el experimental de esta tesis no habría sido posible, especialmente a Juan Ramón García, Rafi Gascón, Carlos Baldellou y Mar López.

A Martí Pumarola, por su inestimable colaboración e interés en el trabajo del grupo y su asesoramiento con el diagnóstico histopatológico y a Ester Blasco, por todo el trabajo realizado.

A la gente del *Departamento de Bioquímica i Biologia Molecular* que han puesto su granito de arena: Helena Carbó y Salvador Bartolomé y a los que siempre han tenido una sonrisa y una frase de apoyo cuando lo he necesitado, en especial Geovanny Rivera, que desde que llegó siempre ha estado a mi lado, me ha hecho sonreír en los peores días y que me ha enseñado cosas increíbles dentro y fuera del mundo de la ciencia.

A Ramón Mangues y M^a Virtudes Céspedes del Grupo de Oncogénesis y Antitumorales del *Institut d'Investigacions Sant Pau*, por su estrecha colaboración en una parte importante de este trabajo y por su ayuda y disposición.

Y finalmente a mi familia y amigos, porque han estado y sé que siempre estarán conmigo, porque me han apoyado y han aguantado momentos de locura y de mal humor, porque se han preocupado por mi y sobre todo porque han creído en mi. A todos, muchas gracias por vuestra paciencia y por estar a mi lado.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE ECUACIONES	XII
ABREVIATURAS	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	1
1.1.1 Historia	1
1.1.2 Fundamentos físicos y conceptos básicos.....	2
1.1.3 Aplicaciones biomédicas de la RMN	7
1.1.3.1 Imagen de resonancia magnética (IRM).....	7
1.1.3.2 Espectroscopía de resonancia magnética (ERM)	15
1.1.3.3 Imagen espectroscópica de resonancia magnética (IERM).....	21
1.1.3.4 <i>High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS)</i>	22
1. 2 TUMORES CEREBRALES	25
1.2.1 Epidemiología, clasificación y etiología	25
1.2.2 Diagnóstico.....	28
1.2.3 Terapia	38
1.2.4 Modelos animales	48
2. OBJETIVOS	51
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
3.1 CULTIVOS CELULARES – CÉLULAS GL261	53
3.2 MODELOS ANIMALES.....	55
3.2.1 Ratones C57BL/6.....	55
3.2.2 Colonia de animales transgénicos.....	55
3.2.3 Ratones <i>Swiss nude</i>	56
3.3 TUMORES CEREBRALES	57
3.3.1 Modelo ortotópico de GBM murino.....	57

3.3.2 Modelo <i>xenograft</i> de GBM humano.....	58
3.4 PROTOCOLOS DE TERAPIA.....	60
3.4.1 MODELO ORTOTÓPICO DE GBM.....	60
3.4.1.1 TEMOZOLOMIDA (TMZ):	60
3.4.1.1.1 Protocolos de tolerancia:.....	61
3.4.1.1.2 Protocolo de terapia de cinco dosis (un ciclo)	62
3.4.1.1.3 Protocolo de terapia de tres ciclos	64
3.4.1.2 TEMOZOLOMIDA Y METFORMINA	64
3.4.1.3 DICLOROACETATO	65
3.4.1.4 MINERVAL	65
3.4.2 MODELO <i>XENOGRAFT</i> DE GBM HUMANO	66
3.5 PREPARACIÓN DE GOTÍCULAS LIPÍDICAS ARTIFICIALES	67
3.6 ESTUDIOS POR RMN	68
3.6.1 <i>In vivo</i>	68
3.6.1.1 Estudios por IRM.....	68
3.6.1.2 Estudios por ERM	71
3.6.1.3 Estudios por IERM	72
3.6.2 <i>In vitro</i>	75
3.7 POST-PROCESAMIENTO	76
3.8 ANÁLISIS DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES	80
3.9 HISTOPATOLOGÍA	84
3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
4.1 CULTIVOS CELULARES: CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS GL261	87
4.2. AGENTES TERAPÉUTICOS	88
4.2.1 MODELO ORTOTÓPICO DE GBM.....	88
4.2.1.1 Grupo Control.....	88
4.2.1.2 Respuesta a la terapia: Evolución del crecimiento tumoral y supervivencia. ...	91

4.2.1.2 a) TEMOZOLOMIDA	91
4.2.1.2 b) TEMOZOLOMIDA Y METFORMINA	105
4.2.1.2 c) DICLORACETATO	106
4.2.1.2 d) MINERVAL	106
4.2.1.3 Respuesta a la terapia: Cambios en el patrón espectroscópico.....	107
4.2.1.4 Discusión de los resultados obtenidos con terapia en el modelo de GBM murino	113
4.2.2. MODELO <i>XENOGRAFT</i> DE GBM HUMANO	117
4.2.2.1 Estudio de crecimiento de las muestras de GBM humano en animales <i>Swiss nude</i>	117
4.2.2.2 Respuesta a la terapia: Efectos en el crecimiento tumoral y la supervivencia.	118
4.2.2.3 Respuesta a la terapia: Estudio del patrón obtenido por IERM en animales inoculados con muestras de pacientes respondedores y no respondedores a TMZ.	120
4.2.2.4 Discusión de los resultados obtenidos con el modelo <i>xenograft</i>	123
4.3 ESTUDIOS DE PERTURBACIÓN DEL PATRÓN ESPECTRAL Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE TUMORES CEREBRALES.....	124
4.3.1 EFECTO DEL DMSO EN EL MODELO ORTOTÓPICO DE GBM MURINO Y EN UN MODELO GEM.	124
4.3.1.1 Estudios con ERM.....	124
4.3.1.2 Estudios de la perturbación con DMSO mediante IERM.	128
4.3.1.2 a) Tumores GL261.....	128
4.3.1.2 b) Animales GEM.....	131
4.3.1.3 Discusión de los resultados obtenidos con los estudios ERM/IERM en los modelos GL261 y ODG-II.....	135
4.3.1.4 Experimentos con gotículas artificiales in vitro	137
4.3.1.5 Estudios con IERM en tumores en tratamiento	141
4.3.1.6 Discusión de los resultados obtenidos por IERM en los tumores tratados con tres ciclos de TMZ	144

4.3.2 OBTENCIÓN DE CLASIFICADORES DE TUMORES CEREBRALES BASADOS EN LOS EFECTOS DE LA HIPERGLICEMIA (MODELO ORTOTÓPICO DE GBM MURINO Y MODELO GEM) Y DEL TRATAMIENTO CON TMZ (MODELO ORTOTÓPICO DE GBM MURINO).....	148
4.3.2.1 Clasificadores de gliomas alto y bajo grado (GL261, GEM) mediante PE-IERM con glucosa.....	148
4.3.2.2 Clasificadores de GBM y GBM respondiendo a terapia con TMZ.	152
4.3.2.3 Discusión de los resultados obtenidos con clasificadores para GBM, GBM en respuesta a terapia y ODGs.....	154
5. DISCUSIÓN GENERAL.....	159
6. CONCLUSIONES	163
7. REFERENCIAS	165
8. ANEXOS.....	185

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Distribución de los núcleos en los diferentes estados energéticos al aplicar un campo magnético; caso del espín 1/2	4
FIGURA 1.2: Sistema de coordenadas antes y después de la perturbación del equilibrio	5
FIGURA 1.3: Procesado de la FID.....	6
FIGURA 1.4: Selección de un <i>voxel</i> para IRM	9
FIGURA 1.5: Imágenes ponderadas en T_1 , T_2 y densidad protónica	10
FIGURA 1.6: Gráfico de la recuperación de la magnetización longitudinal (T_1).....	11
FIGURA 1.7: Gráfico de la pérdida de magnetización transversal (T_2)	12
FIGURA 1.8: Imágenes de tumor cerebral ponderadas en T_1 pre y post-contraste.....	15
FIGURA 1.9: Desplazamiento químico de hidrógeno según su entorno químico en el rango de 0 a 10 ppm	17
FIGURA 1.10: Espectros PRESS con y sin supresión de agua de un tumor GL261	20
FIGURA 1.11: Bandas de saturación y VOI de una secuencia de IERM en parénquima cerebral normal de ratón.....	22
FIGURA 1.12: Espectros de HR-MAS (9,4T, 3000 Hz y 37°C) en biopsias de meningiomas humanos benignos y atípicos	24
FIGURA 1.13: Tasa de incidencia de los tumores cerebrales en mujeres y hombres a nivel mundial estimada por GLOBOCAN.....	25
FIGURA 1.14: Imagen ponderada en T_2 de absceso piogénico e imagen ponderada en FLAIR de metástasis y lesiones de esclerosis múltiple	28
FIGURA 1.15: Espectros de ^1H (TE=30ms; TR=2000ms) de materia blanca sana y de GBM con referencias metabólicas	32
FIGURA 1.16: Pantalla de la DSS (Decision Support System) v.2.0 de INTERPRET	35
FIGURA 1.17: Mapa de IERM de tumor cerebral y espectros SV individuales extraídos del <i>grid</i>	37
FIGURA 1.18: Conversión química de la TMZ a pH fisiológico	42
FIGURA 1.19: Temozolomida: dianas de acción y vías de regulación con sus agentes correspondientes	42
FIGURA 3.1: Inyección estereotáctica de células GL261 en el estriado de un ratón C57BL/6	58
FIGURA 3.2: Tumor subcutáneo en el flanco de un ratón Swiss nude inoculado a partir de células de una biopsia de GBM humano.....	59
FIGURA 3.3: Diagrama del protocolo de tres ciclos de terapia con TMZ.....	63

FIGURA 3.4: Esquema del cálculo del volumen tumoral en las imágenes T_{2w} -HR.....	70
FIGURA 3.5: Ejemplo de VOI de IERM con espectros individuales extraídos del <i>grid</i>	74
FIGURA 3.6: Esquema de las bandas de saturación en las secuencias de IERM	75
FIGURA 3.7: Esquema de post-procesamiento de las secuencias de IERM.....	79
FIGURA 3.8: Ejemplo de selección de spv para el desarrollo de clasificadores.....	81
FIGURA 3.9: Mapas nosológicos extraídos de un sistema de clasificación para tumores GL261 control y tratados con TMZ	83
FIGURA 3.10: Ilustración gráfica de la composición de color HSB de un determinado spv....	83
FIGURA 4.1: Curva de crecimiento de las células GL261	88
FIGURA 4.2: Imágenes de RM de un tumor GL261 adquiridas con secuencia RARE y 3D ...	89
FIGURA 4.3: Curva de crecimiento de tumores GL261 control.....	90
FIGURA 4.4: Curva Kaplan-Meier de supervivencia de animales control inoculados con células GL261I	91
FIGURA 4.5: Espectros SV a TEC y TEL adquiridos en el estriado de un ratón C57BL/6 WT.....	92
FIGURA 4.6: Espectros SV a TEC y TEL adquiridos en un tumor GL261 estándar.....	94
FIGURA 4.7: Espectros estándar de tumores GL261 y parénquima cerebral normal de ratón	95
FIGURA 4.8: Imágenes de alta resolución ponderadas en T2 de animales afectados por tumores GL261 y tratados con un ciclo de TMZ a partir del día dos y 10 post- implantación.....	97
FIGURA 4.9: Curva de evolución de los tumores GL261 control y tratados con un ciclo de TMZ	98
FIGURA 4.10: Curvas de crecimiento de tumores GL261 control y dos grupos tratados con un ciclo de TMZ	99
FIGURA 4.11: Curva Kaplan-Meier del grupo de animales tratados con un ciclo de TMZ....	100
FIGURA 4.12: Gráfico de evolución de tumores GL261 control y tratados con tres ciclos de TMZ. Curvas Kaplan-Meier de ambos grupos	102
FIGURA 4.13: Evolución tumoral de los dos grupos de animales tratados con tres ciclos de TMZ. Representación individual.....	103
FIGURA 4.14: Imágenes y curva de crecimiento tumoral del animal C355	104
FIGURA 4.15: Supervivencia y evolución tumoral de animales tratados con tres ciclos de TMZ y metformina.....	105
FIGURA 4.16: Curvas Kaplan-Meier de los animales GL261 control y los grupos tratados con DCA y Minerval	107
FIGURA 4.17: Espectros a TEC y TEL pre y post-terapia de animales tratados con uno y tres ciclos de TMZ.....	109

FIGURA 4.18: Espectros representativos de un tumor GL261 pre y post-terapia (tres ciclos)	110
FIGURA 4.19: Box-plots de las ratios analizadas en los patrones espectrales SV promedio de los animales tratados con uno y tres ciclos de TMZ, antes y después de la terapia	112
FIGURA 4.20: Imágenes T _{2w} HR y espectros representativos de tumores humanos en animales <i>Swiss nude</i>	117
FIGURA 4.21: Imágenes T2w pre y post-terapia de ratones nude y curva de evolución tumoral del grupo tratado con TMZ y del tratado con el vehículo de administración	119
FIGURA 4.22: Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de los animales <i>Swiss nude</i> tratados con TMZ y vehículo	120
FIGURA 4.23: Espectros promedio adquiridos a partir de los espectros individuales de los <i>grid</i> de IERM en animales <i>Swiss nude</i> inoculados con muestras respondedoras y no respondedoras a TMZ	122
FIGURA 4.24: Curva de supervivencia Kaplan-Meier de los animales inoculados con la muestra no respondedora	123
FIGURA 4.25: Espectros a TEC y TEL del estriado de un animal WT y de un tumor GL261 tras la administración intragástrica de DMSO. La señal de DMSO es visible en ambos casos a 2,72 ppm	125
FIGURA 4.26: Cinética de lavado del DMSO en parénquima cerebral normal y en tumores GL261	126
FIGURA 4.27: Ajuste exponencial decreciente de la cinética de lavado del DMSO en parénquima cerebral normal (vida media)	127
FIGURA 4.28: VOI seleccionado para un experimento de IERM en un tumor GL261 con su correspondiente mapa en escala de color de concentración de DMSO. Espectros individuales extraídos de la matriz en regiones de tejido peritumoral e intratumoral antes y 88 min después de la administración del DMSO	129
FIGURA 4.29: Detección de DMSO por IERM en tumores GL261	130
FIGURA 4.30: Imágenes T _{1w} -CE pre y post contraste en ODG. Análisis histopatológico	132
FIGURA 4.31: Detección de DMSO por IERM en tumores ODG	134
FIGURA 4.32: Espectros <i>in vitro</i> de dos <i>phantoms</i> de TMZ disuelta en DMSO a pH ácido y básico	138
FIGURA 4.33: Imagen de microscopía óptica y espectro de HR-MAS de una muestra de AOBs. Ajuste por AMARES de los espectros adquiridos en una muestra de AOBs y en una de <i>minimal buffer</i>	140
FIGURA 4.34: Mapas de intensidad de DMSO en tumores GL261 tratados con TMZ a lo largo del protocolo de tres ciclos	142

FIGURA 4.35: Evaluación del clasificador en hiperglicemia e hipotermia a TEC y mapas nosológicos..... 151

FIGURA 4.36: Clasificador para GBM control y GBM respondiendo a terapia con TMZ..... 153

ÍNDICE DE ECUACIONES

eq. 1.1 Momento magnético de un núcleo.....	3
eq. 1.2 Frecuencia de precesión de Larmor	3
eq. 1.3 Energía desprendida por los núcleos sometidos a B0 tras la aplicación de una RF	5
eq. 1.4 Desplazamiento químico.....	16
eq. 1.5 Cociente señal/ruido.....	18
eq. 3.1 Contaje de células GL261 por frasco	54
eq. 3.2 Resuspensión de células GL261 para la implantación	57
eq. 3.3 Cálculo del volumen tumoral en imágenes T _{2w} de alta resolución	69
eq. 3.4 Cálculo del volumen tumoral en imágenes 3D	70
eq. 3.5 Concentración de metabolitos cerebrales en µg/g de agua.....	77
eq. 3.6 Intensidad normalizada a <i>unit length</i>	78
eq. 3.7 <i>Balanced Error Rate</i>	82

ABREVIATURAS

AOB	<i>Artificial Oil Bodies</i>
AML	Lípidos móviles apoptóticos
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ASCII	<i>American Standard Code for Information Interchange</i>
AUC	Área bajo la curva
BER	<i>Base Excision Repair</i>
BHE	Barrera Hematoencefálica
CCC	<i>Correctly classified cases</i>
CIC	<i>Cancer Initiating Cell</i>
CTC	Células tumorales circulantes
CSI	<i>Chemical Shift Imaging</i>
DCA	Dicloroacetato
DMEM	Medio modificado por Dulbecco
DMPM	<i>Dynamic MRSI Processing Module</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSS	<i>Decision Support System</i>
EGF	Factor de crecimiento endotelial
EPI	<i>Echo Planar Imaging</i>
ERM	Espectroscopía de Resonancia Magnética
FID	<i>Free Induction Decay</i>
FOV	Campo de vista
GAP	Espacio entre cortes
GBM	Glioblastoma multiforme
GBMr	Glioblastoma multiforme respondedor
GEM	<i>Genetically Engineered Mice</i>

GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
GIC	<i>Glioma Initiating Cell</i>
GRE (F)	<i>Gradient Echo (Fast)</i>
HR	Alta resolución
HR-MAS	<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i>
IERM	Imagen espectroscópica de Resonancia Magnética
I.P.	Intraperitoneal
IR	Inversión Recuperación
IRM	Imagen de Resonancia Magnética
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LDA	Análisis Lineal Discriminante
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LOO	<i>Leave one out</i>
MGMT	Metil-guanin metiltransferasa
ML	Lípidos móviles
MMR	<i>Miss Match Repair</i>
MTIC	Metil-triaceno-imidazol-carboxamida
MTX	Matriz
MV	<i>Multivoxel</i>
NAA	N-acetil aspartato
NA	Número de promedios
NS	Número de cortes
NSC	Células madre neurales
NT	Tejido normal
OA	Ácido oleico
OHOA	Ácido 2-hidroxioléico
ODG	Oligodendroglioma
PARP	Poli-ADP ribosa polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE-IERM	IERM con perturbación metabólica
PKC	Protein kinasa C
PNET	Tumor neuroectodérmico primitivo
P.O.	Vía oral
PPM	Partes por millón
PRESS	<i>Point resolved spectroscopy</i>
Q.D.	Cada día
RARE	<i>Rapid Acquisition with Refocused Echoes</i>
RF	Radiofrecuencia
RM	Resonancia Magnética
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROI	Región de Interés
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SD	Desviación estándar
SE (F)	<i>Espin-Echo (Fast)</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SeRMN	Servicio de Resonancia Magnética
SFFS	<i>Sequential forward feature selection</i>
S/N	Señal/Ruido
SNC	Sistema Nervioso Central
SPV	Vector espectral
ST	Grosor del corte
STEAM	<i>Stimulated Echo Acquisition Mode</i>
SV	<i>Single Voxel</i>
SW	Amplitud espectral
TAC	Tomografía Axial Computerizada
TAT	Tiempo total de adquisición
T_{1w}-CE	Imagen ponderada en T1 con contraste
TE	Tiempo de eco

TF	Transformada de Fourier
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TK	Timidinkinasa
TMZ	Temozolomida
TR	Tiempo de reciclaje
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VOI	Volumen de interés
UAB	<i>Universitat Autònoma de Barcelona</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WT	<i>Wild type</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

1.1.1 Historia

El fenómeno de la resonancia magnética nuclear fue descrito por Isidor Rabi en sustancias gaseosas en 1938 (1). Ocho años después, en 1946, dos grupos científicos liderados por los físicos Edward Mills Purcell (Harvard) y Félix Bloch (Standford) aplicaron la técnica descrita por Rabi al estudio de líquidos y sólidos, por lo que compartieron el Premio Nobel de física en 1952. Durante las décadas de los años 50 y 60, la RMN fue utilizada para evaluar un amplio conjunto de sustancias y tejidos (2).

En 1970, Raymond Damadian (médico investigador en la Universidad Estatal de Nueva York) investigó las diferencias existentes entre tumores y tejido normal detectables por RMN, basándose en los tiempos de relajación transversal y longitudinal del agua de cada tejido (ver apartado 1.1.2 de la introducción). Su descubrimiento fue publicado en Science en 1971 (3) y supuso el primer paso en la aplicación de la RMN para la detección y diagnóstico de tumores. Por otra parte, Paul Lauterbur, un físico coetáneo de Damadian, implementó la técnica de RMN utilizando diferentes gradientes magnéticos en las tres direcciones del espacio para poder aplicar campos magnéticos de diferente intensidad a los distintos puntos espaciales de un objeto en estudio (4). Esto posibilitaba el registro de señales de diferente radiofrecuencia procedentes de cada punto espacial, generando una imagen en escala de grises que contenía la información de cada punto espacial registrado, lo que dio nacimiento a la técnica de Imagen por Resonancia Magnética (IRM). En 1975 Richard Ernst introdujo la adquisición mediante codificación en fases y en frecuencias, reduciendo significativamente los tiempos de adquisición y, para procesar los datos obtenidos por imagen de resonancia (IRM), aplicó por primera vez los conceptos de la transformada de Fourier, que se utilizaban tradicionalmente para la evaluación de espectros de RMN (5). Peter Mansfield utilizó los gradientes descritos por

Lauterbur y contribuyó al desarrollo de las secuencias EPI (*Echo Planar Imaging*) permitiendo que las imágenes de RM pudieran ser obtenidas en menos de un segundo. Con motivo de sus descubrimientos ambos, Lauterbur y Mansfield, compartieron el Premio Nobel de fisiología y medicina en el año 2003.

En resumen, el desarrollo de la técnica de RMN ha sido paralelo al desarrollo de la tecnología electromagnética y actualmente se utiliza como método no invasivo y no destructivo de obtención de imágenes clínicas y de estudio del metabolismo *in vivo* (6).

1.1.2 Fundamentos físicos y conceptos básicos

La RMN se basa en la propiedad de espín que tienen determinados núcleos atómicos: El protón (^1H) es, exceptuando el tritio (^3H), el más sensible de los núcleos detectables por RMN, ya que produce un elevado cociente señal/ruido dadas sus características magnéticas y su abundancia natural. Por otro lado, un núcleo muy utilizado para estudios metabólicos es el ^{31}P , presente en el ATP, fosfocreatina y fosfato inorgánico (elementos clave de la energética tisular), entre otras sustancias fosforiladas. Asimismo, el ^{13}C tiene una abundancia natural del 1,1%, por lo que la sensibilidad de los estudios que involucran a éste isótopo es muy baja y normalmente se enriquece la muestra artificialmente en ^{13}C o se estudian protones acoplados con dicho núcleo. Otro núcleo que suele estudiarse por RMN biomédica es el ^{19}F , que no está presente *in vivo* de manera natural y se utiliza para estudios de compuestos exógenos y su farmacocinética.

Dichos núcleos tienen un número de espín distinto de cero, el cual les confiere un determinado momento magnético, que les permite adoptar diferentes orientaciones, dos en el caso de núcleos con espín $\frac{1}{2}$ como los anteriores, al verse sometidos a un campo magnético B_0 :

$$\vec{\mu} = \gamma * \vec{P} \quad \text{eq. 1.1}$$

Donde $\vec{\mu}$ es el momento magnético de un núcleo, γ es la constante giromagnética (propiedad intrínseca de este tipo de núcleo) y \vec{P} el momento nuclear angular, que depende del valor del espín.

El estado de menor energía es el correspondiente a la orientación del momento magnético $\vec{\mu}$ en el mismo sentido que B_0 , por lo que en un sistema en equilibrio habrá un ligero exceso de núcleos con $\vec{\mu}$ orientados de dicha manera. Cuanto mayor es la intensidad de B_0 , más aumenta la separación energética entre las diferentes orientaciones y mayor será el número de núcleos en el estado de menor energía, en el mismo sentido que B_0 (Figura 1.1). La diferencia poblacional entre estos estados energéticos (ΔE) crea una magnetización global neta macroscópica (M_0) paralela a la dirección del campo magnético B_0 y se define como:

$$\Delta E = h \cdot \gamma \cdot B_0 = h \cdot \omega_0 \quad \text{eq. 1.2}$$

Donde h es la constante de Plank y ω_0 la velocidad angular correspondiente a la frecuencia de precesión de Larmor.

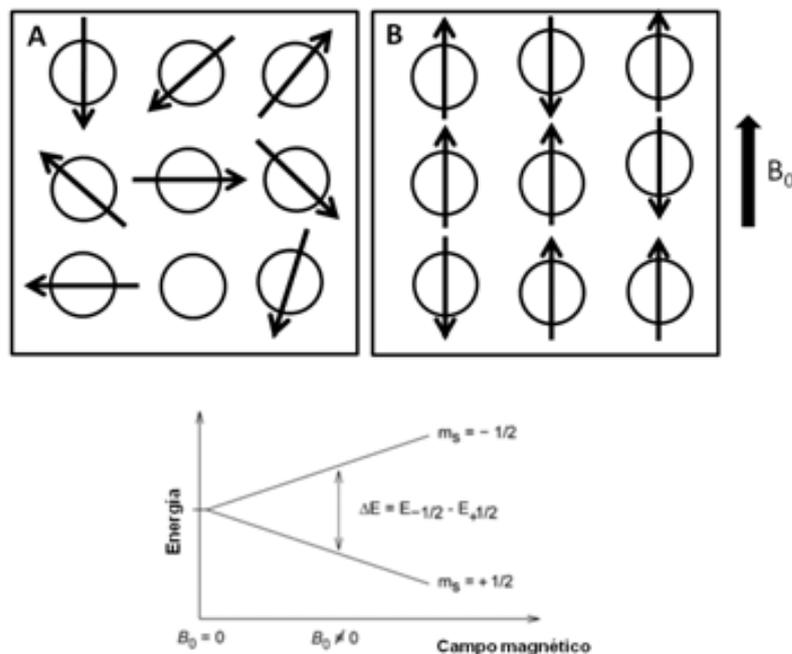


FIGURA 1.1: En la parte superior se observa una población de espines con distintas orientaciones espaciales (A) que, tras verse sometidos a un campo magnético B_0 , se orientan en dos direcciones diferentes con distinto nivel energético (B), debido a sus momentos magnéticos. En el estado de equilibrio, habrá más espines orientados en el mismo sentido que B_0 . En la parte inferior se muestra el caso del ^1H , que puede ocupar dos niveles energéticos diferentes (estados de espín, m_s) tras experimentar un campo magnético distinto de cero.

A parte de los aspectos de diferencia poblacional de la RMN, hay que tener en cuenta que la presencia de un B_0 , además de orientar el momento magnético de los núcleos presentes en una muestra determinada, les obliga a girar alrededor del eje de B_0 en un movimiento conocido como precesión de Larmor. La frecuencia de dicho movimiento (ν_0) o su velocidad angular (ω_0), vienen determinadas por la constante giromagnética (γ) que es característica de cada núcleo y por la intensidad del campo magnético aplicado B_0 , ω_0 viene dada por :

$$\omega_0 = -\gamma \cdot B_0 \quad \text{eq. 1.3}$$

Si se aplica una radiación electromagnética a la frecuencia de Larmor (RF) sobre un sistema en presencia de un campo magnético, la magnetización global neta (M_0) se desplaza un cierto ángulo respecto al estado inicial (tránsito espectroscópico), adoptando una orientación que ya no es paralela a B_0 , y seguidamente comienza a precesar entorno a B_0 , lo que la hace detectable. Eso es debido a que la RF aplicada generará un campo magnético secundario (B_1) que actúa sobre el sistema. La aplicación de B_1 durante un período de tiempo corto es lo que se denomina “pulso de excitación” (ver Figura 1.2). Cuando la RF cesa, la magnetización vuelve a recuperar su orientación inicial desprendiendo la energía absorbida durante la transición mediante los procesos de relajación descritos más adelante en esta sección.

El tránsito espectroscópico se produce cuando la frecuencia de la radiación aplicada es igual a la frecuencia del movimiento de precesión del núcleo en estudio (Figura 1.1).

Para simplificar el sistema de estudio de este fenómeno, se introduce un sistema de coordenadas donde queden reflejadas las orientaciones y componentes de la magnetización global tanto en equilibrio como al introducir una perturbación en el sistema (Figura 1.2).

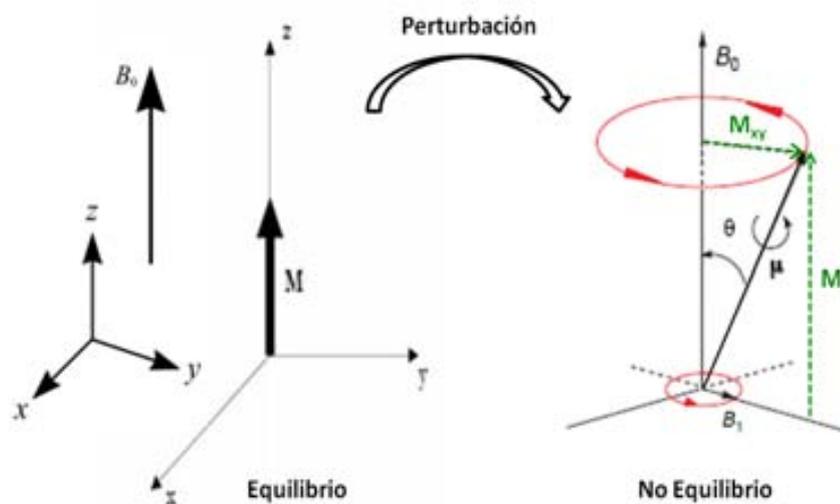


FIGURA 1.2: Representación de la perturbación de la magnetización macroscópica de una muestra por parte de un campo magnético externo aplicado adicional (B_1) perpendicular a B_0 . En la parte izquierda de

la figura se representa el sistema en equilibrio sometido a un campo magnético con la magnetización global (M_0) en la dirección y sentido de B_0 . A la derecha se observa el efecto de aplicar una radiación electromagnética sobre el sistema en equilibrio: la magnetización global se desplaza un cierto ángulo θ respecto al estado inicial (tránsito espectroscópico), adquiriendo componentes longitudinal (M_z) y transversal (M_{xy}). μ es el momento magnético que se aparta de B_0 al mismo tiempo que mantiene su precesión.

El componente transversal de la magnetización de la muestra (M_{xy}) gira en torno a B_0 a la frecuencia de Larmor e induce una pequeña corriente alterna en una bobina de detección que rodea la muestra. Así, la señal detectada se obtiene en forma de senoide atenuada (*free induction decay*, FID) y debe ser procesada matemáticamente mediante la Transformación de Fourier (TF), que descompone la FID en todas las componentes frecuenciales diferentes que la conforman, representándolas en el dominio de las frecuencias en vez de en el del tiempo. Así se obtiene un espectro de RMN (Figura 1.3). Los estudios de RMN detectan una señal proporcional a la magnetización inicial de la muestra.

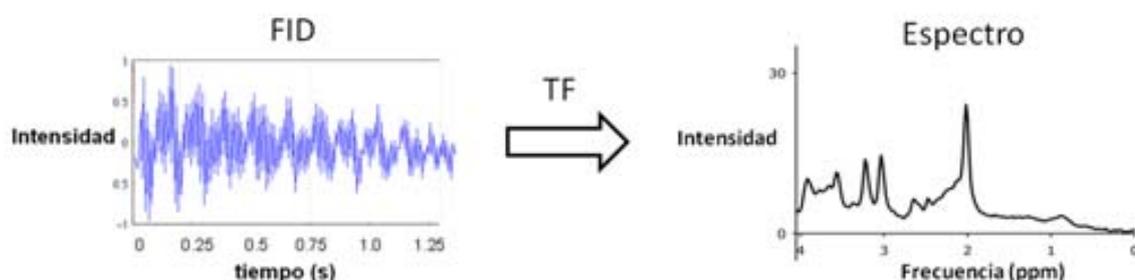


FIGURA 1.3: Esquema de la transformación de la FID (dominio del tiempo) registrada en un experimento de RMN, en un espectro (dominio de la frecuencia), tras la aplicación de la transformada de Fourier.

Tiempos de relajación longitudinal y transversal

La señal detectable de RMN decrece conforme el sistema va recuperando su estado de equilibrio mediante procesos de relajación. La relajación transversal es el proceso que describe la pérdida de coherencia de fase de la componente transversal (M_{xy}) de la magnetización M_0 . La constante que indica el tiempo que tarda el sistema en perder el 63,2% de la magnetización transversal es el T_2 (tiempo de relajación transversal) y es característico de cada sistema de spin. Este proceso de pérdida de señal es ocasionado principalmente por las interacciones entre espines vecinos (relajación espín-espín). Las inhomogeneidades en el campo magnético B_0 también contribuyen a la pérdida de magnetización transversal; la constante que engloba las interacciones entre espines y la contribución de la falta de homogeneidad en B_0 es el T_2^* .

El proceso de relajación longitudinal hace referencia al aumento paulatino de la magnetización longitudinal, debido al intercambio energético entre los espines nucleares y el entorno molecular. El T_1 es la constante que mide el tiempo que tarda el sistema en recuperar el 63,2% de la magnetización longitudinal tras la aplicación de un pulso de 90° o el 26,4% de ese valor tras la aplicación de un pulso de 180° .

Ambos procesos de relajación se dan de manera simultánea aunque por mecanismos distintos, siendo siempre $T_2 \leq T_1$.

1.1.3 Aplicaciones biomédicas de la RMN

1.1.3.1 Imagen de resonancia magnética (IRM)

La IRM se basa en los principios de la RMN para obtener señales de resonancia localizadas espacialmente mediante el uso de gradientes para formar una imagen. El Hidrógeno es el núcleo más utilizado por su abundancia en el cuerpo humano y el gran momento magnético que posee. Las imágenes se obtienen a partir de la señal de los ^1H presentes en el tejido,

dependiendo de su concentración y movilidad. La mayoría de la señal procede del agua y en una proporción mucho menor de la grasa corporal. El resto de metabolitos con ^1H visibles por RMN no contribuyen significativamente a la obtención de las imágenes debido a que se encuentran en una proporción mucho menor a la de la grasa y el agua. El contraste obtenido en las imágenes de IRM se consigue fundamentalmente gracias a las diferencias en densidad protónica (de hidrógenos) entre los tejidos de la muestra en estudio, así como a sus tiempos característicos de T_1 y T_2 . En general se definen tres tipos de imágenes según el parámetro en el que se basa la generación de contraste durante su adquisición: ponderadas, en T_1 , en T_2 o en densidad protónica.

En resumen, para la adquisición de imágenes por IRM, la muestra, o el paciente en estudios clínicos, son estudiados en presencia de un elevado campo magnético que permite la orientación preferencial de los momentos magnéticos de los hidrógenos de sus moléculas de agua en la dirección del campo B_0 . Se aplican gradientes en tres direcciones ortogonales en el espacio durante breves períodos de tiempo durante la adquisición de las secuencias, para determinar el volumen y la región de la muestra que se debe excitar y codificar para obtener la imagen correspondiente. El primer gradiente se denomina gradiente de selección de corte (*slice-selection*), que determina la orientación del plano en el que se desea obtener la imagen bidimensional. Las dos dimensiones de este plano son codificadas en frecuencias y fases. La codificación en frecuencia se lleva a cabo mediante la aplicación de un gradiente de lectura (*readout gradient*) durante la adquisición de la señal de RMN. Entre los gradientes de selección de corte y de lectura se aplica un tercer gradiente para la codificación en fase (*phase encoding*). Como resultado de la aplicación de los tres gradientes se obtiene una matriz de datos en la que cada punto tiene una frecuencia y una fase únicas. La imagen obtenida consiste en un conjunto de elementos digitales de imagen (*pixels*) que representan elementos de volumen del tejido original (*voxels*) (Figura 1.4).

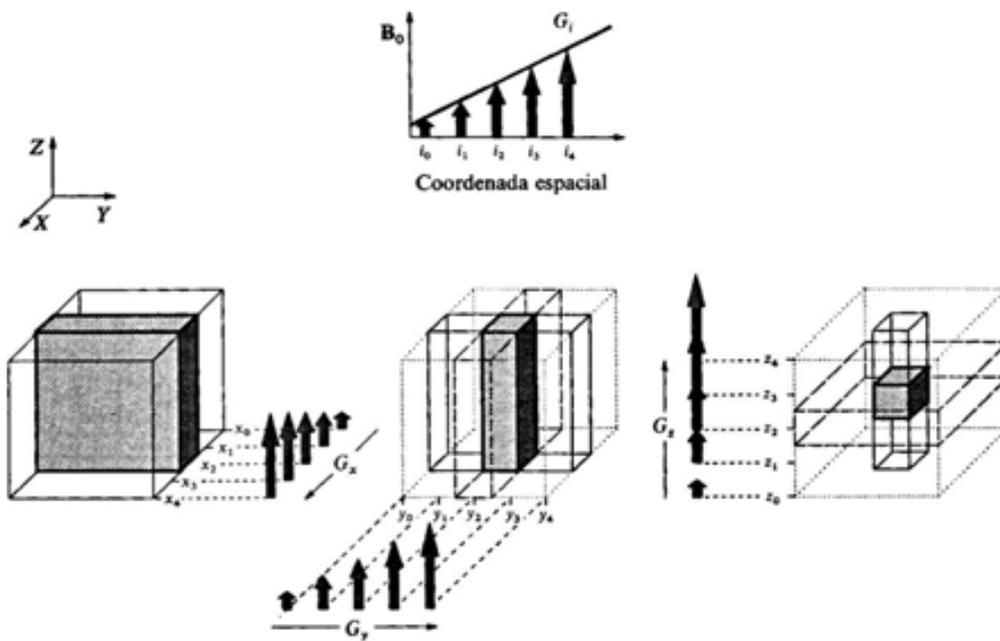


FIGURA 1.4: Diagrama de una de las estrategias de selección de un voxel de excitación determinado dentro del tejido explorado por RMN, mediante el uso de tres gradientes ortogonales en el espacio.

Existe una gran variedad de secuencias de pulsos para IRM que combinan de diferentes maneras los pulsos de RF, variando el tiempo de reciclaje (TR) (tiempo transcurrido entre pulsos de excitación de RF) y el tiempo de eco (TE) (tiempo transcurrido desde la aplicación del pulso de excitación hasta la obtención de la señal de RMN (FID)). De esta manera se obtiene contraste (diferencia de intensidad en la imagen entre dos regiones contiguas) y se puede seleccionar el parámetro en el que se va a ponderar la imagen obtenida, por ejemplo una imagen ponderada en T_1 , que es más sensible a los detalles anatómicos estándar, o ponderada en T_2 , que es más sensible al contenido de agua y a la presencia de patología (7). En general, para que una imagen esté ponderada en T_1 se utilizan TR y TE cortos en su adquisición y por el contrario, para que esté ponderada en T_2 se emplean TR y TE largos. En el caso de la densidad protónica, se aplican TR largos y TE cortos (Figura 1.5).

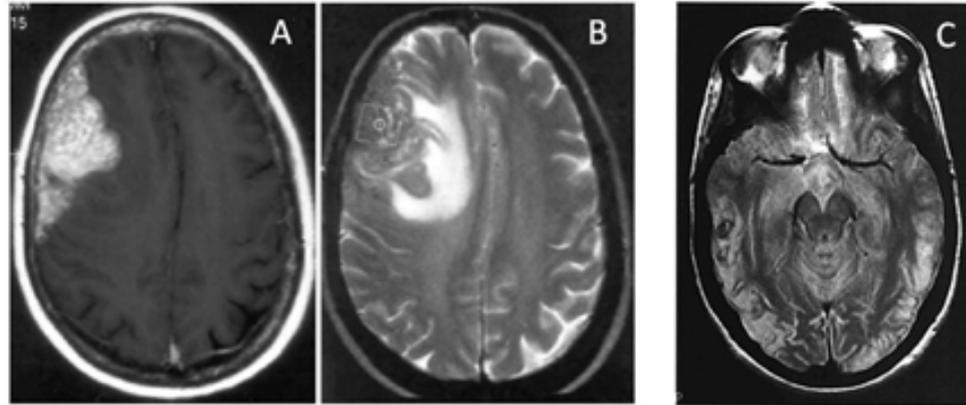


FIGURA 1.5: Las imágenes A y B, obtenidas a 1,5 T, muestran un corte en el plano axial del encéfalo de un paciente afectado por una metástasis en el lóbulo frontal derecho. La imagen ponderada en T_1 (A) muestra un contraste intenso (más blanco) en la lesión, relativamente heterogéneo, mientras que la imagen ponderada en T_2 (B) muestra edema (blanco) y efecto de masa en el tejido circundante (8). La figura C muestra un corte en el plano axial a un nivel inferior que A y B de un encéfalo normal ponderado en densidad protónica (9).

Imágenes ponderadas en T_1

Se basan en los distintos tiempos de relajación longitudinal según el tipo y región del tejido estudiado y aprovechan para ello el tiempo que tardan los núcleos en alcanzar de nuevo el estado de equilibrio poblacional tras la aplicación de un pulso de RF (Figura 1.6). Los núcleos con T_1 cortos cederán a su entorno molecular la energía recibida en la excitación por RF más rápidamente que los núcleos con T_1 largo, y eso dependiendo de su tipo y movilidad relativa dentro de la muestra. Por ejemplo, los núcleos del agua libre tienen un T_1 relativamente largo debido a que su elevada movilidad se encuentra en el rango que dificulta la relajación cruzada longitudinal. En cambio, los núcleos de agua asociados a macromoléculas tienen una movilidad restringida, lo que facilita normalmente la relajación cruzada longitudinal, produciendo un acortamiento del T_1 efectivo. En muchas patologías aumenta el agua intersticial libre produciendo un aumento del T_1 . En una imagen estándar ponderada en T_1 , la intensidad de señal es inversamente proporcional al valor de T_1 de cada molécula, porque para adquirirla se

emplean tiempos muy cortos después de la aplicación de la RF de excitación y las sustancias con T_1 corto están llegando ya al máximo de recuperación de la magnetización longitudinal, mientras que las de T_1 largo sólo han recuperado una pequeña parte. Hay que destacar que las secuencias utilizadas para medir T_1 son las de pulso adquisición con un ángulo de 90° , en las que la magnetización se mide a diferentes TR y las de inversión-recuperación (IR), que constan de un pulso de 180° seguido (tras un cierto tiempo denominado tiempo de inversión) de otro pulso de 90° , el cual vuelca la magnetización restante en el plano transversal para así poder detectarla. En estas últimas la magnetización se mide tras diferentes tiempos de inversión.

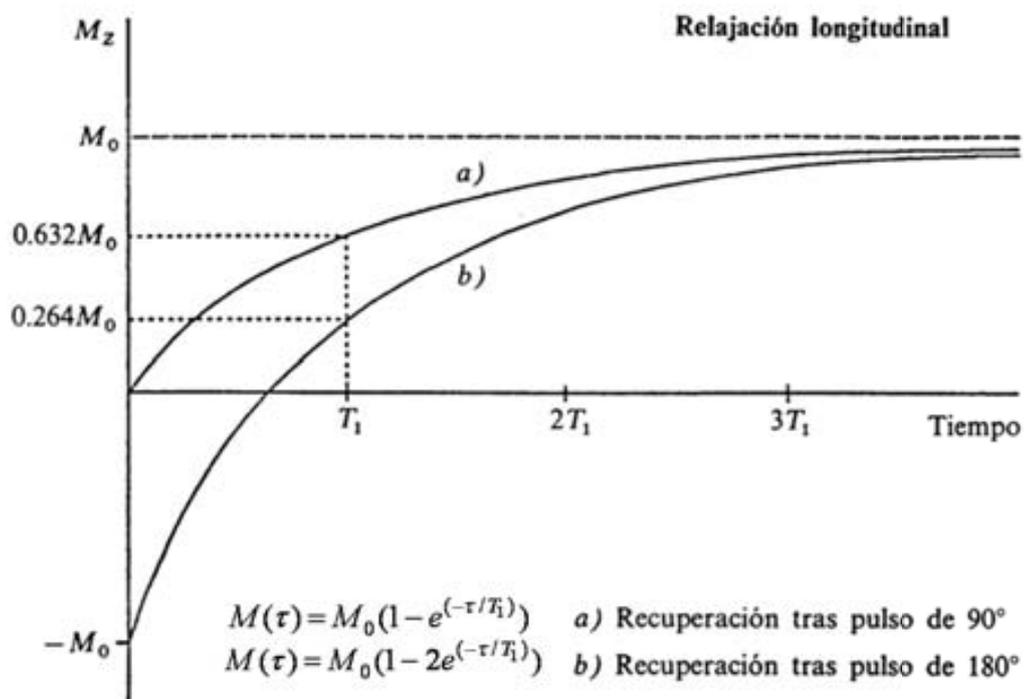


FIGURA 1.6: Gráfico que representa la recuperación de la magnetización longitudinal de una sustancia a lo largo del tiempo. El T_1 se ve representado como el punto temporal en el cual se ha recuperado el 63,2% de la magnetización. Debajo del gráfico se muestra la fórmula para calcular el T_1 tras la aplicación de un pulso de 90° (a) o de 180° (b), siendo $M(\tau)$ la magnetización longitudinal a un tiempo τ tras la aplicación de la RF de excitación y M_0 la magnetización inicial antes de aplicar el pulso.

Imágenes ponderadas en T_2

Se basan en los distintos tiempos de relajación transversal según el tipo y región del tejido estudiado (Figura 1.7). Dichos tiempos dependen de la presencia de heterogeneidades a nivel molecular y macroscópico en el entorno de los núcleos de la muestra excitada por la RF y de su efecto en la frecuencia de precesión efectiva de dichos núcleos. En el caso del agua libre, debido a la elevada movilidad de sus moléculas, el promedio de las variaciones magnéticas locales es prácticamente nulo, por lo que hay una gran coherencia en la frecuencia de precesión de los núcleos y el T_2 es en consecuencia relativamente largo. Sin embargo, en estructuras que mantienen el agua ligada, los núcleos del agua perciben ligerísimas diferencias de campo magnético en función de las moléculas circundantes, lo cual implica una gran incoherencia en su frecuencia de precesión y un acortamiento del T_2 . En las imágenes ponderadas en T_2 la intensidad de la señal es directamente proporcional al valor de T_2 .

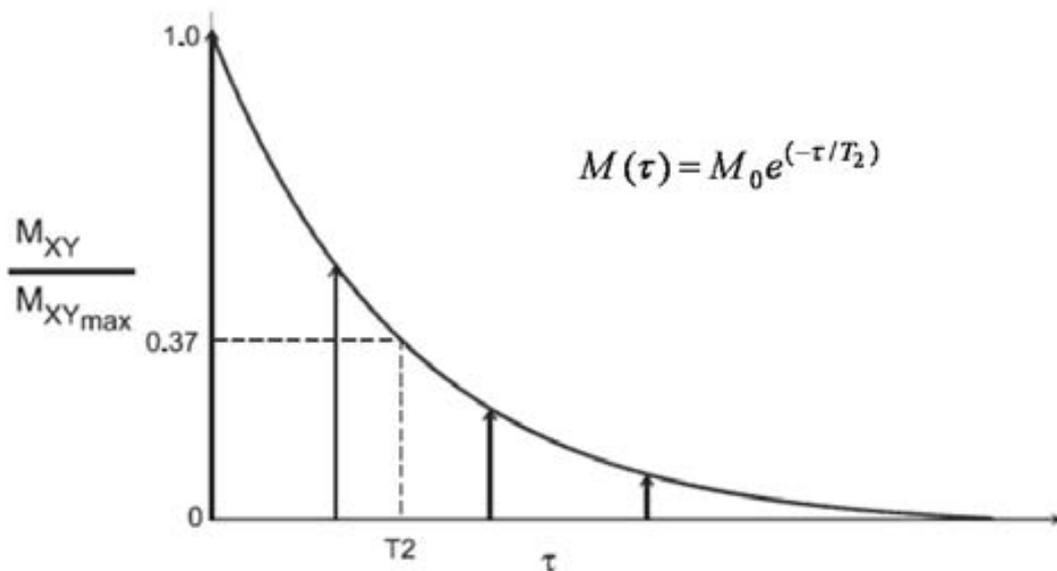


FIGURA 1.7: Gráfico que representa la pérdida de magnetización transversal en función del tiempo. El T_2 se representa como el punto temporal en el que sólo se detecta el 37% de la magnetización y sobre la gráfica se muestra la fórmula para calcularlo (10).

Algunas de las secuencias clásicas de pulsos que se utilizan en IRM son las siguientes:

- SPIN-ECHO (SE): Consiste en un pulso de 90° seguido de otro de 180° , dejando transcurrir un tiempo $TE/2$ después de cada uno de ellos. La señal (FID) se registra una vez transcurrido el $TE/2$ después del pulso de 180° . El proceso completo se repite una vez transcurrido el TR establecido. La ventaja de esta secuencia es que permite recuperar la magnetización transversal perdida por efectos de T_2^* durante el TE. Una posible modificación de esta secuencia consiste en obtener varios ecos dentro del mismo TR (ej. secuencia RARE) añadiendo más pulsos de 180° , teniendo en cuenta que la señal en cada eco a TE creciente es cada vez más pequeña.
- GRADIENT-ECHO (GRE): Constan de un pulso inicial de menor amplitud que el pulso de 90° ($\alpha^0 < 90^\circ$) y un gradiente bipolar. El gradiente bipolar consiste en aplicar un gradiente de desfase que potencie el desfase natural de los espines y a continuación un gradiente de refase. El efecto global sobre la fase de los espines es nulo pero permite volver a tener todos los núcleos en fase y es entonces cuando se registra el eco de la señal. Permiten recoger señales a TE muy cortos y además aplicar TR muy cortos, porque el ángulo en el que se aplica la RF es pequeño y la magnetización puede volver antes a su posición de equilibrio. Por ello los tiempos de adquisición son mucho menores que en las secuencias SE. Además son más sensibles que las SE a los cambios en la susceptibilidad magnética, por lo que se usan en estudios del sistema músculo-esquelético para contrastar adecuadamente el hueso trabecular (hipointenso) y el cartílago. La presencia de trabéculas genera variaciones locales del campo magnético que se traducen en pérdida de señal en las secuencias GRE. Si las trabéculas se rompen o desaparecen en una zona la señal aparece hiperintensa respecto al resto de tejido trabecular.

Estos tipos de secuencia han sido modificados, gracias al desarrollo de la tecnología aplicada a la RMN, para diseñar secuencias rápidas que optimicen la obtención de imágenes

de buena resolución en tiempos totales de segundos, como por ejemplo las secuencias *fast spin echo* (FSE) o *fast gradient echo* (FGRE).

Una manera de optimizar las imágenes obtenidas por IRM es la aplicación de agentes de contraste (ver también apartado 1.2.2 de la Introducción), que pueden considerarse como trazadores magnéticos que proyectan la RM más allá de sus posibilidades morfológicas, siendo capaces de valorar una respuesta dinámica incorporando una dimensión temporal en la caracterización tisular (Figura 1.8). Lo que caracteriza a estas sustancias es la presencia de un ion metálico con propiedades magnéticas, el cual constituye el agente activo que se une a una sustancia quelante para reducir su toxicidad y facilitar su transporte. Dichos agentes afectan a la relajatividad del agua de los tejidos, en contacto con dichos agentes, generalmente disminuyendo el T_1 y el T_2 , para potenciar la imagen con contrastes positivos (T_1) o negativos (T_2) en aquellas regiones donde ha penetrado el agente. El alcance de su acción dependerá de la estructura bioquímica del agente, de la movilidad del agua (sustancia que interacciona en mayor medida con los agentes) y de la compartimentalización del tejido. En general puede decirse que existen agentes de contraste paramagnéticos (por ejemplo el gadolinio) y superparamagnéticos (como los óxidos de hierro). En este trabajo el agente de contraste utilizado es el Magnevist[®], aprobado para uso clínico y con gran capacidad para disminuir el T_1 del agua del tejido. Es un compuesto iónico paramagnético (está compuesto por gadopentato Dimeglumine (Gd-DTPA)) con estructura de quelato lineal y se distribuye inicialmente por el espacio intravascular, difundiendo posteriormente al espacio intersticial. Actualmente existen numerosos agentes de contraste que utilizan el Gd como base de su composición y que se combinan con otras estructuras para alcanzar determinadas dianas en el tejido e incluso actuar como *carriers* de algunas sustancias terapéuticas, como en el caso de las nanopartículas (11).

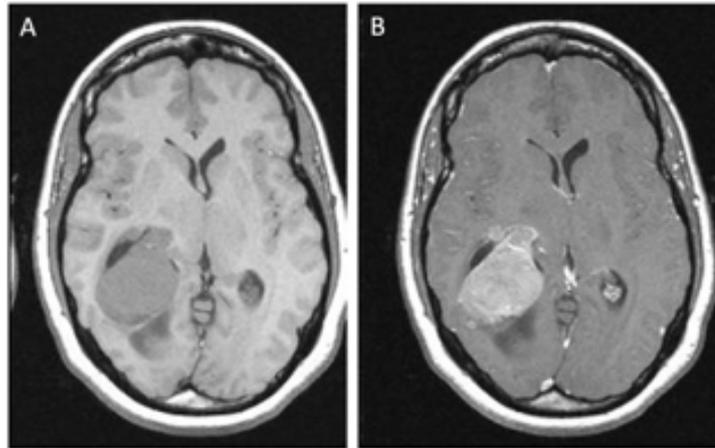


FIGURA 1.8: Imágenes de IRM SE ponderadas en T1 en plano axial de un tumor cerebral, antes (A) y después (B) de la administración de un agente de contraste basado en Gadolinio (10).

En resumen puede decirse que la IRM es una técnica de diagnóstico y seguimiento muy útil porque permite obtener imágenes en cualquier dirección del espacio, es muy sensible a los cambios patológicos, logra una gran discriminación de los tejidos blandos, es fácilmente dimensionable (el campo de visión (FOV) puede variar de tamaño según la zona en estudio y el centro de imagen puede desplazarse a casi cualquier punto del campo magnético siempre que tenga suficiente homogeneidad), permite el uso de agentes de contraste y puede aplicarse a un amplio rango de estructuras y tejidos (12). Actualmente existen numerosas técnicas especiales en IRM como son la difusión, la perfusión, la angiografía, la imagen funcional... diseñadas para el diagnóstico y seguimiento de patologías concretas.

1.1.3.2 Espectroscopía de resonancia magnética (ERM)

La ERM es una técnica que permite medir de manera no invasiva la concentración de metabolitos presentes en una muestra o tejido. Además aporta información referente al metabolismo tisular, por lo que puede aplicarse al estudio de diversas enfermedades, como por ejemplo tumores cerebrales, para determinar el tipo y grado de la lesión, así como para detectar respuesta a terapia a nivel molecular (13).

Los parámetros esenciales para interpretar la información contenida en un espectro son:

- El desplazamiento químico:

Los núcleos presentes en la muestra analizada forman parte de estructuras atómicas y moleculares, por lo que se encuentran rodeados de electrones que también están sometidos al campo magnético externo B_0 . Los electrones responden a B_0 induciendo diminutos campos magnéticos alrededor del núcleo, contrarrestando o “apantallando” el efecto global de B_0 . Por tanto, el campo neto experimentado por un núcleo determinado depende de la densidad electrónica de sus inmediaciones. Así, en una muestra concreta, los núcleos de la misma especie responderán de manera diferente en función de la posición que ocupen en la estructura molecular, originando tantas frecuencias de resonancia como entornos químicos diferentes ocupen en la muestra. Los núcleos menos apantallados tienen una frecuencia de resonancia mayor y sus señales aparecen a la izquierda del espectro, y los más apantallados tienen una frecuencia de resonancia menor y aparecen a la derecha. Se dice entonces que el desplazamiento químico (δ) de un núcleo es la posición que ocupa en el espectro, debido a su frecuencia de resonancia característica (Figura 1.9). Para hacer comparables los desplazamientos del mismo tipo de núcleos a distintos campos magnéticos se definen las posiciones de las distintas resonancias mediante una escala relativa de valores respecto a un valor de referencia, expresado en partes por millón (ppm):

$$\delta = \frac{\nu_s - \nu_R}{\nu_R} \times 10^6 \quad \text{eq. 1.4}$$

Donde ν_s es la frecuencia de resonancia (Hz) de un núcleo a un campo magnético concreto (B_0) y ν_R es la frecuencia de la referencia.

Las referencias más utilizadas en experimentos *in vitro* para ^1H -ERM son el tetrametilsilano (TMS) o el 3-trimetilsilil[2,2,3,3- ^2H]propionato sódico (TSP), y se les asigna el valor de 0 ppm. Se ha observado que utilizando estos compuestos como

referencia, el grupo metilo de la creatina/fosfocreatina aparece a 3,03 ppm y el del NAA a 2,01 ppm, por lo que estos dos valores se utilizan como referencia en los estudios *in vivo*, en los que no pueden añadirse TMS o TSP.

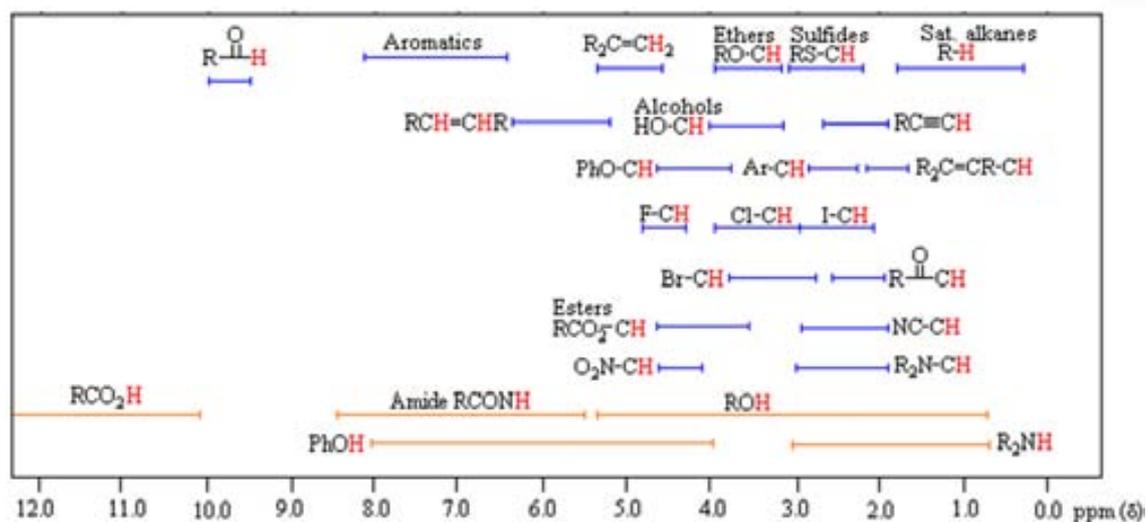


FIGURA 1.9: En esta figura se muestra la posición que ocupan los protones en el espectro de una muestra según su entorno químico, dentro del rango de 0 a 12 ppm. Por ejemplo, entre 9 y 10 ppm se encuentran los de los grupos aldehído; los picos en la región entre 6 y 8 ppm indican protones que pertenecen a grupos aromáticos; las resonancias entre 5 y 6,5 ppm pertenecen a los alquenos; entre 3,5 y 4,5 ppm se encuentran los grupos éster y entre 3 y 4 ppm los éter. Los protones unidos a nitrógeno y oxígeno pueden tener un desplazamiento químico diferente dependiendo del pH, la temperatura, el solvente de la muestra y la concentración.

- La intensidad y la anchura de la señal:

Entendemos por intensidad el área de la señal, que está relacionada directamente con la concentración de núcleos que la originan. La anchura a media altura nos da una idea de las condiciones instrumentales de adquisición del espectro, siendo de mejor calidad cuanto más estrechas sean las señales. Este último parámetro se puede optimizar experimentalmente, pero se ve también influenciado por factores como la temperatura, el campo magnético y la relajación transversal, que provocan que distintas señales procedentes de la misma muestra puedan tener anchuras de banda distintas. En el caso de experimentos en los que la anchura de la señal puede considerarse constante, cambios en la altura de las señales pueden considerarse proporcionales a cambios de intensidad y, por tanto, de concentración.

- Relación señal/ruido:

La señal detectada por RMN tiene muy poca intensidad en relación al ruido térmico y eléctrico generado durante la adquisición. Una manera de elevar el cociente señal/ruido es sumar diferentes registros de una misma muestra, de manera que las señales presentes irán aumentando de manera proporcional al número de registros, mientras que el ruido por ser de naturaleza aleatoria no se adicionará de manera coherente y su contribución no aumentará tanto como la de las señales de interés. Teniendo en cuenta que la intensidad del ruido aumenta proporcionalmente a la raíz cuadrada del número de registros, vemos que el cociente señal/ruido (S/N) mejorará con el número (n) de registros según:

$$\frac{S}{N} \propto \frac{n}{\sqrt{n}} \propto \sqrt{n} \quad \text{eq. 1.5}$$

Por lo tanto, para aumentar 10 veces la ratio señal/ruido es necesario adquirir 100 registros.

Para obtener los espectros de muestras biológicas se aplican sobre la muestra en estudio secuencias de pulsos de RF y gradientes de campo magnético que se activan a tiempos determinados para obtener la señal de resonancia. Hay que considerar que en la mayoría de tejidos el compuesto más abundante es el agua, siendo la concentración aproximada de protones de 80-100 M, mientras que los protones en los metabolitos suelen estar a una concentración de 1-20 mM. Para observar adecuadamente los metabolitos intracelulares se suprime o por lo menos se atenúa la señal del agua siendo el método más utilizado la aplicación de uno o más pulsos largos de baja potencia a la frecuencia de resonancia del agua combinados con gradientes de campo magnético para desfazar la señal (CHESS) con lo que se consigue suprimir la resonancia de la señal del agua en el momento de la detección final de la FID.

Las secuencias más utilizadas en $^1\text{H-ERM}$ *in vivo* son la secuencia espín-eco (PRESS) y la de eco estimulado (STEAM). La secuencia PRESS se compone de tres pulsos selectivos de sección: 90° - 180° - 180° que se aplican perpendicularmente en las tres direcciones del espacio para seleccionar un volumen concreto. Gradientes adicionales alrededor de los pulsos de 180° ayudan a destruir la magnetización de regiones externas al volumen de interés (VOI). Esta secuencia está precedida por un módulo CHESS para suprimir o por lo menos atenuar al máximo la señal del agua (Figura 1.10). La secuencia STEAM se compone de tres pulsos de 90° también precedidos por pulsos selectivos de supresión de la resonancia del agua. Ambas secuencias de espectroscopia localizada tienen sus pros y sus contras, la secuencia PRESS genera espectros con un cociente señal/ruido que es el doble que la obtenida con las secuencias STEAM, aunque la segunda permite trabajar con TEs más cortos.

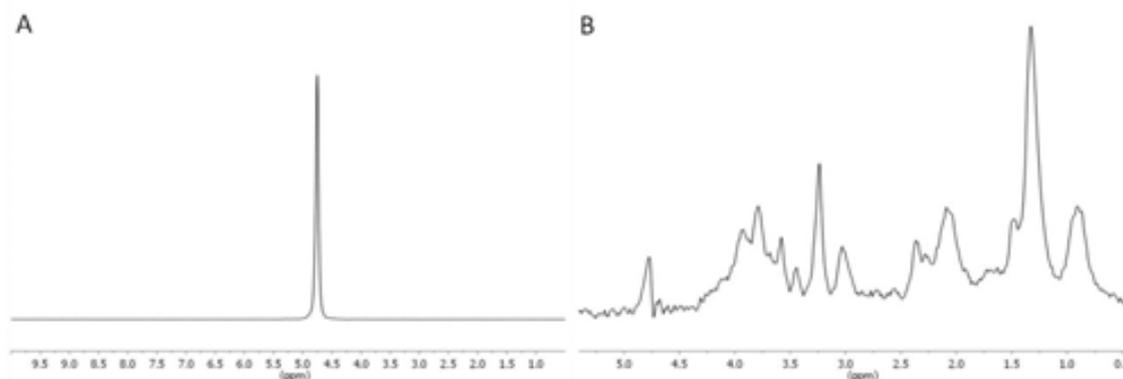


FIGURA 1.10: Espectros adquiridos con el método PRESS y un TE de 12 ms *in vivo* a 7T en un glioma inducido por inoculación de células GL261 en cerebro de ratón (día 16 post-implantación). El voxel de adquisición era de 2,5 mm³ y ocupaba exclusivamente volumen tumoral sin contaminación de parénquima peritumoral/normal. En A se muestra un espectro sin supresión de agua en el que sólo puede apreciarse la resonancia correspondiente a los protones del agua a 4,75 ppm. En B se muestra un espectro adquirido en el mismo tumor pero con supresión de la señal de agua. En este caso las señales de los metabolitos del tejido son perfectamente visibles entre 0,5 y 4,5 ppm (Datos extraídos de la sección 4.2.1.2.a de este trabajo).

Actualmente el núcleo más utilizado en los estudios de ERM *in vivo* en humanos es el de hidrógeno, principalmente en casos de seguimiento de terapia en cáncer, hipoxia neonatal, errores metabólicos congénitos, esclerosis múltiple, adrenoleucodistrofias, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), etc. La mayoría de estudios se realizan sobre el cerebro aunque también se analizan otros órganos como próstata, hígado, mama, músculo etc. En resumen, esta técnica está en continuo desarrollo tecnológico y es de gran utilidad como complemento para los estudios de IRM, aportando información metabólica a los resultados anatómicos.

1.1.3.3 Imagen espectroscópica de resonancia magnética (IERM)

La IERM es una técnica que permite la adquisición de múltiples espectros ERM localizados de manera simultánea (14,15). Se aplica principalmente al estudio de cerebro, próstata y mama y puede ser mono, bi o tridimensional según el modo de obtención de la señal: de columnas (o filas) en un plano, de filas y columnas en un plano o de filas y columnas en un volumen respectivamente. En el caso del cerebro, se preselecciona el volumen de interés previamente para suprimir la señal procedente de la grasa subcutánea. Esto puede complementarse con la aplicación de múltiples bandas de saturación (Figura 1.11). La principal ventaja de la IERM es que permite obtener en una misma exploración espectros de zonas patológicas y normales (ver apartado 1.2.2 de la Introducción). Sin embargo, la adquisición de las secuencias de IERM es mucho más compleja que la de los espectros *single voxel* (SV), debido a las numerosas inhomogeneidades de campo magnético presentes en toda la muestra, a la contaminación de los espectros individuales debida a los *voxels* vecinos, a los largos tiempos de adquisición y a la mayor complejidad del procesamiento de datos multidimensionales. En lo referente a la corrección de los efectos de las inhomogeneidades de campo, se han desarrollado métodos que automatizan el proceso y permiten obtener excelentes resultados en tiempos muy reducidos (16). En cuanto a las contaminaciones de los *voxels* por parte de sus vecinos, se han investigado métodos basados en la codificación de la información registrada que mejoran sustancialmente este problema sin perjuicio de la sensibilidad o resolución espacial (17).

Las matrices de espectros obtenidas por IERM pueden post-procesarse para obtener mapas de concentraciones absolutas o relativas de metabolitos concretos o imágenes nosológicas derivadas de los datos espectroscópicos (18).

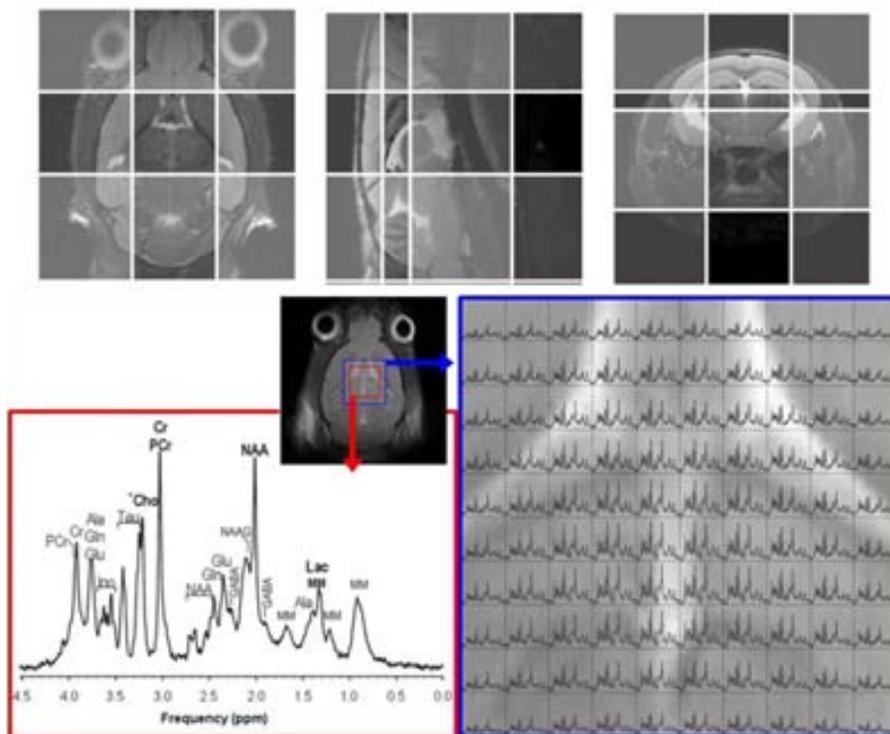


FIGURA 1.11: En la parte superior se muestran las bandas de saturación del volumen externo utilizadas para delimitar el VOI en una secuencia de IERM adquirida en parénquima cerebral normal de ratón C57BL/6 a 7 Teslas. En la parte inferior derecha se muestra el *grid* de adquisición con los espectros individuales contenidos en él (recuadro azul) y a la izquierda se representa un espectro representativo (recuadro rojo) con las resonancias principales indicadas(19), descritas en (20).

1.1.3.4 High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS)

La espectroscopía de alta resolución con giro en ángulo mágico (HR-MAS) se ha utilizado para estudiar muestras de tejido intacto *ex vivo* desde 1996, y los primeros estudios que la aplicaron al estudio de cáncer en humanos fueron el de Cheng y col. y el de Millis y col. un año después (21,22). Esta técnica posee un alto grado de reproducibilidad y su naturaleza no destructiva permite el estudio por microscopía de las muestras analizadas previamente por HR-MAS y, por tanto, la comparación de datos espectroscópicos y morfológicos (23).

Andrew y Newing (24) y Lowe (25) describieron de manera independiente que la adquisición de espectros de RMN de una muestra sólida girando rápidamente (normalmente entre 4 y 6 kHz) en un ángulo de $54,7^\circ$ (ángulo mágico) relativo al campo magnético principal (B_0), reduce

la anchura de los picos detectados en el espectro. Ello evita la pérdida de información causada por este fenómeno, que es originado por la heterogeneidad de la muestra y parámetros residuales anisotrópicos que no pueden ser promediados por el movimiento Browniano en muestras sólidas. La técnica de HR-MAS requiere una preparación manual de la muestra que evita el paso de extracción de los metabolitos (por ejemplo extractos con ácido perclórico para metabolitos solubles) aunque los experimentos de resonancia son prácticamente los mismos que se llevan a cabo con ERM en soluciones *in vitro*. Las secuencias de pulsos más comunes pueden aplicarse en estos casos para estudiar cambios metabólicos, deducir estructuras moleculares y llevar a cabo estudios moleculares dinámicos. Los espectros obtenidos son comparables a los adquiridos por ERM pero con mayor resolución y sensibilidad (Figura 1.12).

Una velocidad de giro moderada es suficiente para evitar efectos de ensanchamiento de señal y obtener espectros de alta resolución (26). Sin embargo velocidades demasiado bajas pueden producir “*sidebands*” de intensidad considerable en el rango de estudio que pueden enmascarar las señales de los metabolitos de interés. Por ello se ha determinado la velocidad óptima de giro (que depende del campo magnético externo) para evitar este problema (26), por ejemplo de 3000Hz para 9,4 T.

Numerosos estudios en muestras de cerebro, próstata, mama y cáncer cervical han demostrado que la técnica de HR-MAS es una herramienta importante de diagnóstico y monitorización de la respuesta al tratamiento en el estudio del cáncer (27-30). El tipo de información obtenido a partir del tejido tumoral estudiado con este método depende de los detalles del protocolo aplicado, desde la recolección y almacenamiento de la muestra hasta el post-procesamiento de los espectros adquiridos. El desarrollo tecnológico en la primera década de uso de la técnica ha permitido la fabricación de mejores sondas, sistemas de control de temperatura más eficaces y rotores con nuevos diseños que permiten el análisis de muestras de tan solo 12 μ l de volumen (31). La metodología de HR-MAS sigue en constante optimización y desarrollo, pero cada vez se reconoce más el potencial de esta técnica como herramienta para estudios clínicos (23).

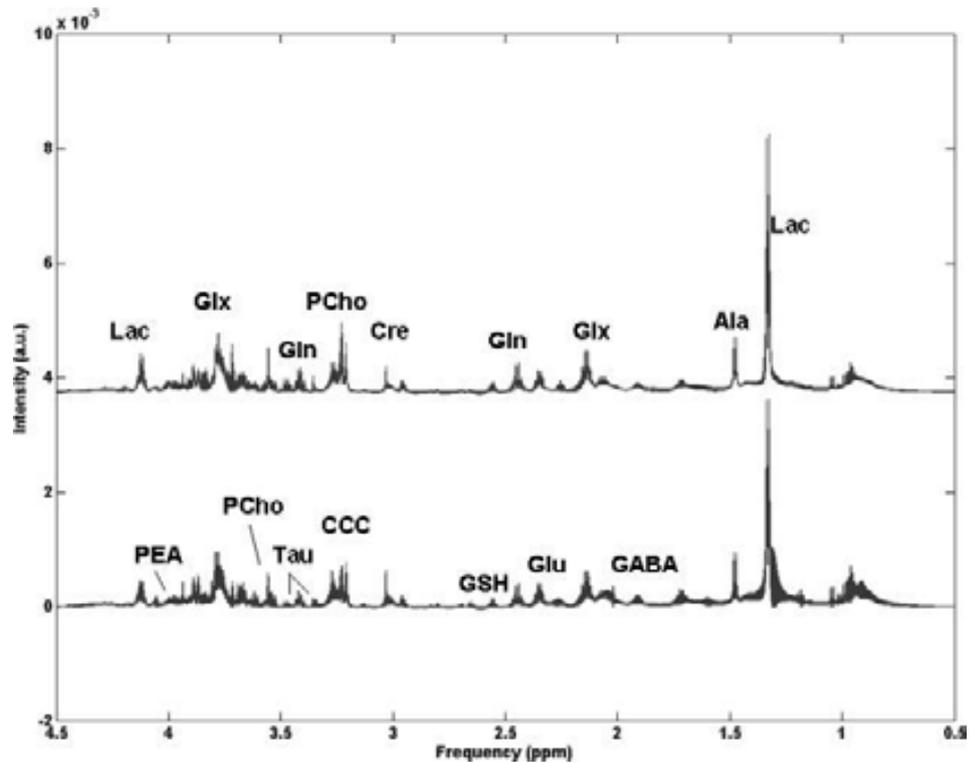


FIGURA 1.12: Espectros promedio de biopsias de meningiomas benignos (arriba) y atípicos (abajo) con su desviación estándar (banda gris oscura) obtenidos a partir de secuencias de ¹H HR-MAS con presaturación de agua. Las resonancias más relevantes se muestran marcadas sobre los espectros: Lac, lactato; Ala, alanina; GABA, ácido γ-aminobutírico; Glu, glutamato; Gln, glutamina; GSH, glutatión; Cre, creatina; PCho, fosfocolina; CCC, compuestos que contienen colina; Tau, taurina; Glx, glutamato + glutamina; PEA, fosfoetanolamina (32).

1. 2 TUMORES CEREBRALES

1.2.1 Epidemiología, clasificación y etiología

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) abarcan menos de un 2% del total de casos de cáncer diagnosticados cada año a nivel mundial (aproximadamente 175.000) (Figura 1.13), pero a pesar de ello, constituyen una fuente importante de mortalidad y discapacidad.

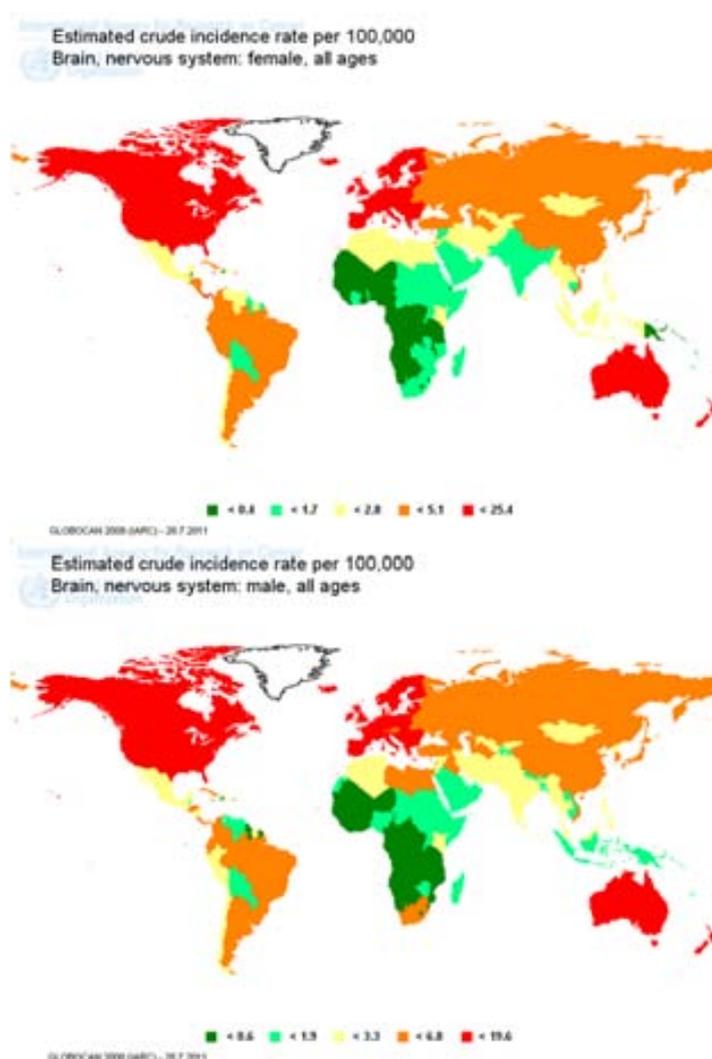


FIGURA 1.13: Tasa de incidencia de los tumores cerebrales en mujeres (parte superior) y hombres (parte inferior) a nivel mundial estimada por GLOBOCAN (33).

De todos los tumores intracraneales primarios, la mayoría (60%) están originados por células gliales; el 28% derivan de las meninges y un 7,5% tienen localización en los nervios

espinales y craneales. Los linfomas y tumores de líneas germinales constituyen aproximadamente un 4% y un 1% del total respectivamente (34). En el Anexo 1 (35) se muestra un resumen de los tumores del SNC más frecuentes. La Organización Mundial de la Salud (World Health Organization (WHO)) clasifica los tumores del sistema nervioso en diferentes grados de malignidad basándose en cuatro criterios histopatológicos (atipía nuclear, actividad mitótica, hiperplasia endotelial y necrosis) y en datos de supervivencia, correspondientes a las entidades tumorales y a los pacientes respectivamente (36,37). Todo esto se combina dando como resultado una escala de cuatro grados de malignidad, que conforman el sistema de clasificación más aceptado actualmente:

- GRADO I: Tumores con bajo potencial proliferativo, naturaleza difusa y posibilidad de cura mediante resección quirúrgica (Ejemplo: Astrocitoma pilocítico).
- GRADO II: Tumores infiltrantes con bajo índice mitótico pero con potencial de recidiva. Algunos tienden a progresar hacia lesiones de alto grado (Ejemplo: Astrocitomas bien diferenciados, oligodendrogliomas (ODG) y ependimomas).
- GRADO III: Evidencia histológica de malignidad generalmente en forma de actividad mitótica, clara expresión de capacidad infiltrativa y anaplasia.
- GRADO IV: Elevada actividad mitótica, necrosis y rápida evolución pre y post-operatoria.

Los gliomas se clasifican en diferentes grupos según el tipo celular que los origina y la localización que ocupan, siendo los principales grupos astrocitomas (derivados de astrocitos), oligodendrogliomas (ODGs, formados por oligodendrocitos) y oligoastrocitomas (OAs, derivados de astrocitos y/o oligodendrocitos). Los astrocitomas constituyen la mayor parte de los gliomas y se dividen en: astrocitoma pilocítico (grado I), astrocitomas difusos de bajo grado (grado II) y astrocitomas anaplásicos (grado III). Los astrocitomas pilocíticos son tumores de crecimiento lento con pronóstico favorable y tasas de supervivencia superiores a cinco años en más del 85% de los casos. Los astrocitomas difusos, sin embargo, no pueden ser

reseccionados quirúrgicamente en su totalidad y tienden a evolucionar a estadios más agresivos (grado III) siendo la tasa de supervivencia mayor o igual a 5 años del 60%. Por otro lado, los ODG se clasifican en ODG de bajo grado (II) y ODG anaplásicos (III). Tienen un pronóstico menos favorable que los astrocitomas difusos pero también una menor tendencia a progresar hacia estadios más agresivos. La incidencia de los oligoastrocitomas puede variar de un 1,8 a un 19% del total de gliomas, porque el diagnóstico varía según los diferentes laboratorios de análisis y muchas veces son considerados bien como ODGs o bien como astrocitomas. Su pronóstico y tendencia a la malignización dependen de las proporciones de los distintos tipos celulares que los constituyen.

Cualquiera de los tres tipos principales de glioma puede transformarse en glioblastoma multiforme (GBM) (grado IV) (36). El GBM es el tumor maligno más frecuente en el SNC: es muy resistente a la quimio y radioterapia y sólo un 3% de los pacientes afectados sobrevive más de tres años, siendo la supervivencia media de 90 días (38,39). Entre sus características histopatológicas cabe destacar: atipía nuclear, pleomorfismo celular, trombosis vascular, proliferación microvascular y necrosis.

Un caso particular dentro de los tumores del SNC son las metástasis, ya que no son tumores primarios sino que proceden de neoplasmas originados en otros tejidos, en su mayoría carcinomas de pulmón o mama. Algunos se originan a partir de melanomas, coriocarcinomas y carcinomas de células claras de riñón (35).

La etiología de los tumores del SNC no está clara todavía. No se han descrito factores ambientales y/o estilos de vida concretos como causas directas de dicha enfermedad, a excepción de síndromes hereditarios como por ejemplo neurofibromatosis tipo 1 y 2, síndrome de von Hippel-Lindau, esclerosis tuberosa y síndromes de Li-Fraumeni y Turcot (36).

1.2.2 Diagnóstico

Los síntomas más comunes entre los pacientes de tumor cerebral suelen ser: dolor de cabeza, mareos, cambios cognitivos no específicos o signos neurológicos focales, dependiendo de la localización, tamaño y tasa de proliferación del tumor. El diagnóstico debe permitir distinguir estos casos de otras patologías que pueden presentar síntomas similares, como por ejemplo hematomas subdurales, abscesos cerebrales, hidrocefalia, esclerosis múltiple, malformaciones vasculares, infartos cerebrales y otros. Muchas de estas patologías presentan características radiológicas que permiten diferenciarlas de los tumores, por lo que las herramientas más utilizadas en el diagnóstico diferencial de dicha enfermedad son la tomografía axial computerizada (TAC) y la IRM. Una de las limitaciones más importantes de estas herramientas no invasivas es la dificultad para distinguir los tumores del SNC de otras patologías, como abscesos o enfermedades desmielinizantes, que precisan un estudio más detallado y que, en muchos casos, terminan requiriendo una biopsia del tejido anómalo (Figura 1.14).

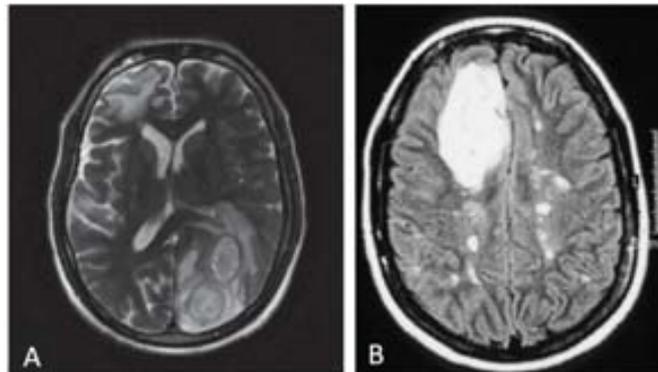


FIGURA 1.14: En A puede verse una imagen de RM ponderada en T_2 y adquirida en el plano axial de un paciente afectado por una lesión hiperintensa en la región occipito-parietal del cerebro. Aparentemente dicha lesión podría confundirse con una metástasis, a pesar de que resultó ser un absceso piogénico (40). La imagen B muestra un corte axial adquirido con el método FLAIR (Fluid attenuated inversion recovery), similar a una ponderación en T_2 , en un paciente afectado por esclerosis múltiple. La gran masa en el lóbulo frontal derecho muestra características de intensidad y homogeneidad similares a las

de las lesiones pequeñas centrales (placas de esclerosis múltiple), lo cual, unido al historial del paciente, podría sugerir que se trata de una placa de tamaño anormalmente grande. Sin embargo una biopsia estereotáctica demostró que la lesión frontal era un OA de grado II, a pesar de lo poco habitual que es la concurrencia de ambas enfermedades (41).

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

Un estudio rutinario de una masa cerebral anómala por IRM se compone de imágenes ponderadas en T_2 (TR y TE largos) (T_{2w}), imágenes ponderadas en T_1 (TR y TE cortos) (T_{1w}) y secuencias FLAIR (TR largo y TE variable), que atenúan la señal del líquido cefalorraquídeo. La detección, caracterización y delimitación precisa de las lesiones requiere la obtención de un buen contraste entre tejido tumoral y tejido circundante. Por ello la administración de agentes de contraste durante los estudios por IRM es un método de diagnóstico establecido en los centros clínicos (ver también apartado 1.1.3.1 de la Introducción). Este tipo de compuestos acentúan la diferencia de intensidad de señal entre los tumores y el tejido normal, alcanzando el espacio extracelular del tejido a través de lesiones en la barrera hematoencefálica (BHE) (42). El grado de contraste alcanzado depende del nivel de rotura de la BHE, la concentración intravascular de agente de contraste y de sus propiedades magnéticas, la vascularización de la lesión (perfusión) y el flujo sanguíneo, entre otros factores.

Actualmente existen muchos agentes de contraste aplicables a la detección de tumores cerebrales, siendo los más utilizados aquellos cuya composición base es el gadolinio, y que se denominan agentes de contraste de primera generación. Éstos sólo cruzan la BHE en caso de lesión o rotura, por lo que normalmente no son captados por tumores de bajo grado (43). Los GBM sí que presentan rotura de BHE y aparecen como nódulos hipointensos en su centro

necrótico que captan el contraste de manera irregular (normalmente siguiendo un patrón en forma de anillo hiperintenso que bordea los límites de la masa) al estudiarlos con secuencias ponderadas en T_1 post-contraste (44). El problema principal de este sistema de diagnóstico es que entre 9-37,5% de los gliomas de alto grado no muestran captación de contraste y un 34-50% de los gliomas de bajo grado sí captan contraste, por lo que en esos casos un diagnóstico limitado únicamente a los resultados obtenidos mediante el contraste por IRM sería erróneo (45). Existe una segunda generación de agentes de contraste que difiere de la anterior en la concentración de gadolinio y en las propiedades de relajatividad. Además se están sintentizando nuevos agentes para mejorar la detección, seguimiento y estudio de respuesta a terapia de este tipo de lesiones (46).

Además de las secuencias de IRM se han incluido secuencias de difusión, de imagen funcional y angiografía dentro del protocolo de diagnóstico de tumores cerebrales para evaluar el tipo de tumor, extensión de la lesión y características vasculares de la misma (47).

En resumen, puede decirse que el diagnóstico no invasivo de un tumor cerebral comprende diferentes etapas, siendo la última de ellas la orientación radiológica del grado y tipo de la lesión. El primer paso es la detección, que normalmente se lleva a cabo mediante las imágenes T_{2w} , ya que los tumores aparecen como masa hiperintensa respecto al parénquima cerebral normal. Las secuencias T_{1w} con contraste producirán diferentes tipos de imagen dependiendo de la vascularización del tumor y de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE). A continuación se evalúa el impacto de la lesión en el resto del encéfalo así como en los ventrículos y se determina con la mayor precisión posible la localización espacial del tumor y su extensión. Es importante analizar si las estructuras vasculares propias del cerebro como la arteria carótida o la arteria cerebral media se ven afectadas por la masa. Finalmente se procede a determinar el tipo y grado de la lesión, si es primaria o metastásica, benigna o maligna, con el fin de aplicar el tratamiento más adecuado según el caso. Normalmente la confirmación del diagnóstico se realiza a partir de un análisis histopatológico de una biopsia del tejido anómalo, bien sea estereotáctica o parte de una resección mayor. Esto conlleva riesgos

tanto a nivel de mortalidad/morbilidad del paciente (48,49) como de diagnóstico, ya que se puede subestimar el grado del tumor dependiendo de la zona de la que se haya extraído la biopsia. En resumen, disponer de una herramienta eficaz de diagnóstico no invasivo constituiría un importante avance para mejorar en lo posible el tratamiento de este tipo de lesiones.

Espectroscopía (ERM) e Imagen Espectroscópica de Resonancia Magnética (IERM)

Un método no invasivo prometedor para el diagnóstico de tumores cerebrales es la ERM de protón (^1H -ERM), que está considerada como un complemento muy útil de la IRM y que actualmente se utiliza de manera rutinaria en los estudios de tumores cerebrales de diversos centros clínicos del mundo, requiriendo solamente unos pocos minutos para la adquisición de espectros SV en imanes de 1,5 T (50). Los espectros se obtienen normalmente de volúmenes conocidos como voxels de aproximadamente $2\text{-}4\text{ cm}^3$ y contienen información sobre metabolitos cerebrales importantes, como por ejemplo colina, creatina, mioinositol, glutamato, N-acetil aspartato (NAA), lactato y lípidos móviles (Figura 1.15). El NAA se considera como un marcador de viabilidad neuronal que suele ver disminuida su concentración en el caso de los tumores cerebrales, reflejando la ausencia de neuronas y axones. La resonancia de la colina (colina total) procede de un grupo de moléculas involucradas en la degradación y síntesis de membrana celular, principalmente de fosfocolina, glicerofosfocolina y colina libre, por lo que se considera como un marcador de proliferación. La creatina total (creatina + fosfocreatina) hace referencia a compuestos involucrados en el metabolismo energético de tejidos con demanda fluctuante de energía y se ve disminuida en los tumores. El lactato en condiciones normales presenta valores no detectables en el parénquima cerebral normal, pero en el caso de lesiones tumorales su concentración suele elevarse asociándose a regiones de alta actividad glicolítica. La función del mioinositol no es bien conocida aunque se considera un marcador glial, pero se sabe que la intensidad relativa de su resonancia se altera en determinadas patologías cerebrales. Las resonancias correspondientes a los lípidos móviles aumentan en algunos tipos de tumores, especialmente en los de alto grado, y cuando constituyen las resonancias más

intensas son un indicador de necrosis (muerte celular). El glutamato es un importante neurotransmisor excitador en el SNC y se ve elevado en los oligodendrogliomas. La alanina suele ser detectable en los meningiomas aunque no está muy claro cuál es su significado funcional (12,51). En el anexo 2 se detallan los principales metabolitos detectables en parénquima cerebral humano, normal y/o patológico.

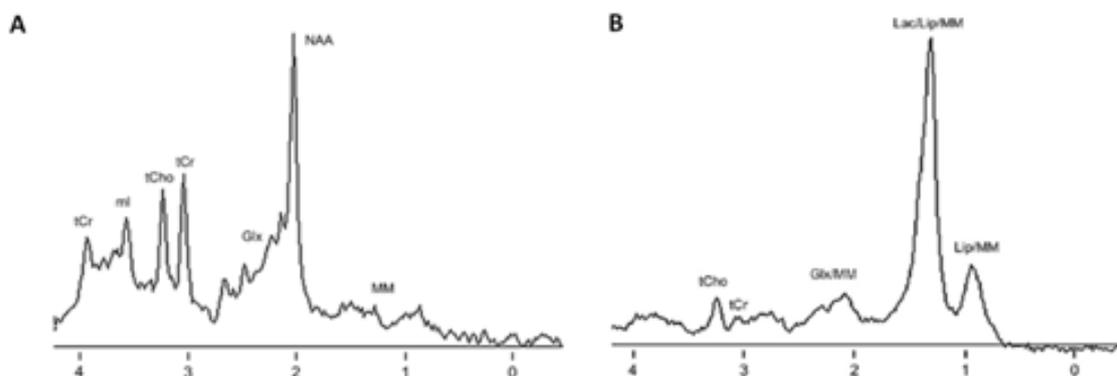


FIGURA 1.15: A) Espectro de ^1H (TE=30ms; TR=2000ms) de materia blanca de un voluntario sano. **B)** Espectro adquirido con los mismos parámetros que en A) en un GBM. Los principales metabolitos están marcados sobre sus resonancias correspondientes: creatina total (tCr) a 3,03 y 3,94 ppm; colina total (tCho) a 3,22 ppm; NAA a 2,01 ppm; mio-inositol (ml) a 3,56 ppm; glutamato y glutamina (Glx) entre 2 y 2,4 ppm; lípidos (Lip) y macromoléculas (MM) a 0,9 y 1,3 ppm y lactato (Lac) a 1,3 ppm (Figura adaptada de (52)).

Los radiólogos pueden así correlacionar la información anatómica obtenida con la IRM con la información metabólica obtenida mediante la ^1H -ERM. Los espectros aportan información bioquímica que, una vez caracterizada para cada tipo de tumor y utilizando el sistema de soporte informático adecuado, pueden ayudar a la clasificación no invasiva de este tipo de tumores, aportando un soporte adicional al actual sistema de diagnóstico (8). Con la debida experiencia, los patrones de niveles relativos de metabolitos se pueden interpretar visualmente para llegar a una orientación radiológica, pero el resultado más robusto se obtiene a partir de

un análisis cuantitativo de los espectros y la utilización de métodos de reconocimiento de patrones. Sin embargo, dichos métodos no se incluyen en el *software* estándar de los sistemas de escáner de RM de los centros clínicos.

Análisis de reconocimiento de patrones

El análisis por reconocimiento de patrones llamado también lectura de patrones, consiste en el reconocimiento de patrones de señales. Los patrones se obtienen a partir de los procesos de segmentación, extracción de características y descripción, dónde cada objeto queda representado por una colección de descriptores. El sistema de reconocimiento debe asignar a cada objeto su categoría o clase (conjunto de entidades que comparten alguna característica que las diferencia del resto). En el caso de los espectros de tumores cerebrales obtenidos por ERM/IERM, el análisis de reconocimiento de patrones engloba dos conceptos: la categoría o clase a la que se asocia cada espectro tumoral, y el proceso matemático que cuantifica determinadas características de los espectros para asociarlas a una determinada categoría o clase (53). El-Derey aporta una completa explicación sobre el uso del reconocimiento de patrones en ERM (54).

En esta tesis el análisis utilizado como herramienta para el reconocimiento de patrones es el Análisis Lineal Discriminante (LDA), el cual está dirigido a dos objetivos principales: un objetivo descriptivo que permita discriminar las diferencias entre grupos y un objetivo predictivo que permita asignar un nuevo elemento en estudio (espectro) a una de las categorías previamente establecidas. La función discriminante en este análisis pretende maximizar la separación entre patrones espectrales de clases de tumor diferentes y minimizar la separación ente patrones pertenecientes al mismo tipo tumoral. Un ejemplo de este tipo de aplicación es el proyecto INTERPRET:

El sistema INTERPRET *Decision Support System* v3.1.0 (DSS) (<http://azizu.uab.es/INTERPRET/>) es un sistema de apoyo al diagnóstico desarrollado

inicialmente en el proyecto INTERPRET, financiado por la comisión europea. El objetivo de este proyecto era desarrollar nuevas metodologías que permitiesen automatizar la clasificación de tumores cerebrales humanos utilizando datos de IRM y ERM. Se realizó un estudio multicéntrico utilizando datos de ^1H -ERM, validados mediante un procedimiento de control de calidad, de 304 pacientes (entre ellos 22 voluntarios sanos) para conseguir un análisis robusto. El sistema permite asignar un espectro procedente de la lesión de un paciente concreto a una categoría diagnóstica mediante un análisis de reconocimiento de patrones, y que además permite comparar el nuevo espectro introducido con los que se encuentran en la base de datos del proyecto (Figura 1.16). Los clínicos pueden consultar también las imágenes asociadas a los espectros del sistema, así como los datos clínicos correspondientes, para comparar con el nuevo caso de una manera más exhaustiva. Por todo esto puede decirse que la DSS fue diseñada para facilitar la incorporación de resultados de análisis de espectros de ERM en el proceso global de diagnóstico establecido para tumores cerebrales. El sistema de Análisis Lineal Discriminante (LDA) incluido en la DSS fue diseñado para distinguir entre tres tipos principales de tumores: meningiomas (grados I y II de la WHO); gliomas de bajo grado (astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas, todos de grado II) y tumores malignos de alto grado (GBM y metástasis). Sin embargo, el prototipo está preparado para un uso más generalizado en el diagnóstico de tumores cerebrales, porque también contiene casos de pacientes afectados por otros tipos de tumor así como los patrones cerebrales normales de voluntarios sanos. Gracias a este sistema los clínicos pueden mejorar el diagnóstico por ERM de una masa de posible origen maligno (55) antes de que el paciente se someta a la resección quirúrgica, por lo que la evaluación neuroradiológica es enriquecida con información adicional funcional y metabólica (50). El uso extendido de este sistema permitiría, por ejemplo, en pacientes afectados por un GBM, con un estatus funcional limitado y una localización desfavorable de la lesión, un diagnóstico preciso sin necesidad de realizar una biopsia, evitando el riesgo que esto conlleva (56).

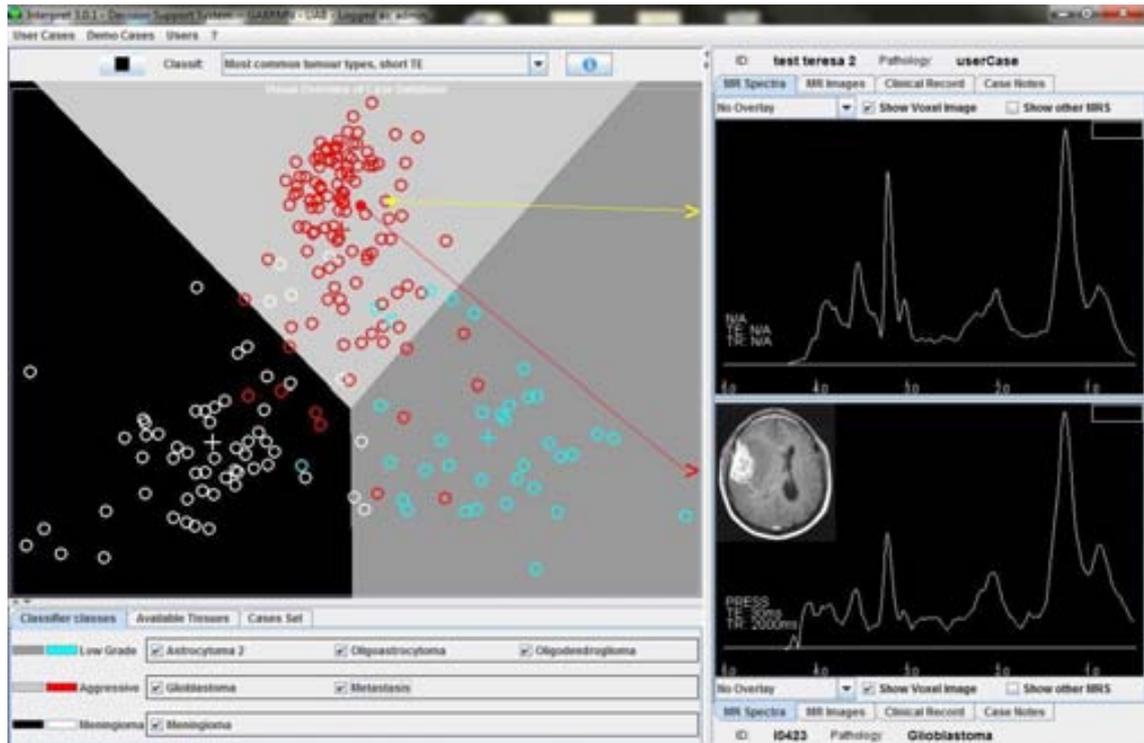


FIGURA 1.16: Pantalla de la DSS (Decision Support System) v.3.0.1 de INTERPRET donde se muestra un ejemplo de clasificación de un espectro de glioblastoma. En la pantalla de la izquierda se observa el universo de la interfaz con tres de los tipos tumorales principales de los que se obtuvieron casos en INTERPRET. Se muestran en rojo los casos de glioblastomas, en blanco los meningiomas y en azul claro los astrocitomas de bajo grado. El caso en amarillo es el caso problema. A la derecha, en la región superior se ve el espectro en estudio y en la región inferior un espectro de GBM vecino (con la imagen del voxel del que se obtuvo) (57).

La IERM es una técnica no invasiva, al igual que la ERM, que proporciona información metabólica del tejido en estudio. En el caso de los tumores cerebrales, la IERM aporta información que puede traducirse en mapas de intensidad o concentración relativa de diversos metabolitos, como colina, creatina, mio-inositol, lípidos o lactato. Estos mapas muestran la distribución espacial de los metabolitos en los tumores, que normalmente suelen ser heterogéneos en composición, y también permiten determinar el borde de la lesión (importante para la resección quirúrgica) de una manera más precisa que las imágenes de T_1 y T_2 , detectando patrones de anomalía metabólica en zonas que no muestran anomalías

morfológicas por IRM (Figura 1.17). La IERM también permite estudiar posibles infiltraciones de células tumorales en el tejido normal, monitorizar respuesta de los tumores a terapia y controlar la progresión de la lesión (58). Este examen permite obtener información sobre la celularidad tumoral (colina), el metabolismo energético celular (creatina), la densidad neuronal (NAA), el nivel de hipoxia (lactato) y la necrosis (lípidos móviles). Por ello ha sido una técnica muy utilizada en el estudio de gliomas de grado alto, combinando estos resultados con la información anatomopatológica correspondiente, aunque no en todos los centros clínicos pueden adquirirse secuencias de IERM de calidad suficiente. Los mapas más utilizados son los que representan el cociente colina/NAA (59). En el caso de GBM y metástasis, estudios de la región peritumoral por IERM han demostrado que en los gliomas de alto grado estas zonas presentan cocientes NAA/colina menores de 1 y valores elevados de creatina y colina, mientras que esto no sucede en las metástasis. Estos resultados probablemente reflejan la presencia de edema vasogénico en el caso de las metástasis e infiltración de células tumorales más allá del límite de la masa tumoral detectable por IRM en los GBM. Este hecho puede aplicarse también en la distinción de tumores infiltrativos de lesiones más circunscritas como los abscesos, que no presentan espectros de patrón patológico en el tejido adyacente a la lesión (52). Recientemente se han combinado los resultados obtenidos por IERM con los extraídos de estudios de difusión para gliomas de alto grado, relacionando zonas de patrón metabólico anómalo con aquellas en las que la infiltración tumoral es más probable debido a las características de difusión del tejido (60). Por otro lado, se está trabajando en el desarrollo de clasificadores que combinen datos de IERM e IRM (51). Además, la IERM es muy útil para diferenciar radionecrosis de recidiva tumoral en pacientes sometidos a ciclos de radioterapia. Los estudios por IRM no permiten distinguir entre tumor recurrente o progresión tumoral y cambios de necrosis o inflamatorios debidos a efectos secundarios de la radioterapia. Estudios con IERM han demostrado que existen diferencias en los cocientes colina/creatina y colina/NAA calculadas en tumor recurrente, parénquima cerebral normal y zonas de radionecrosis (61).

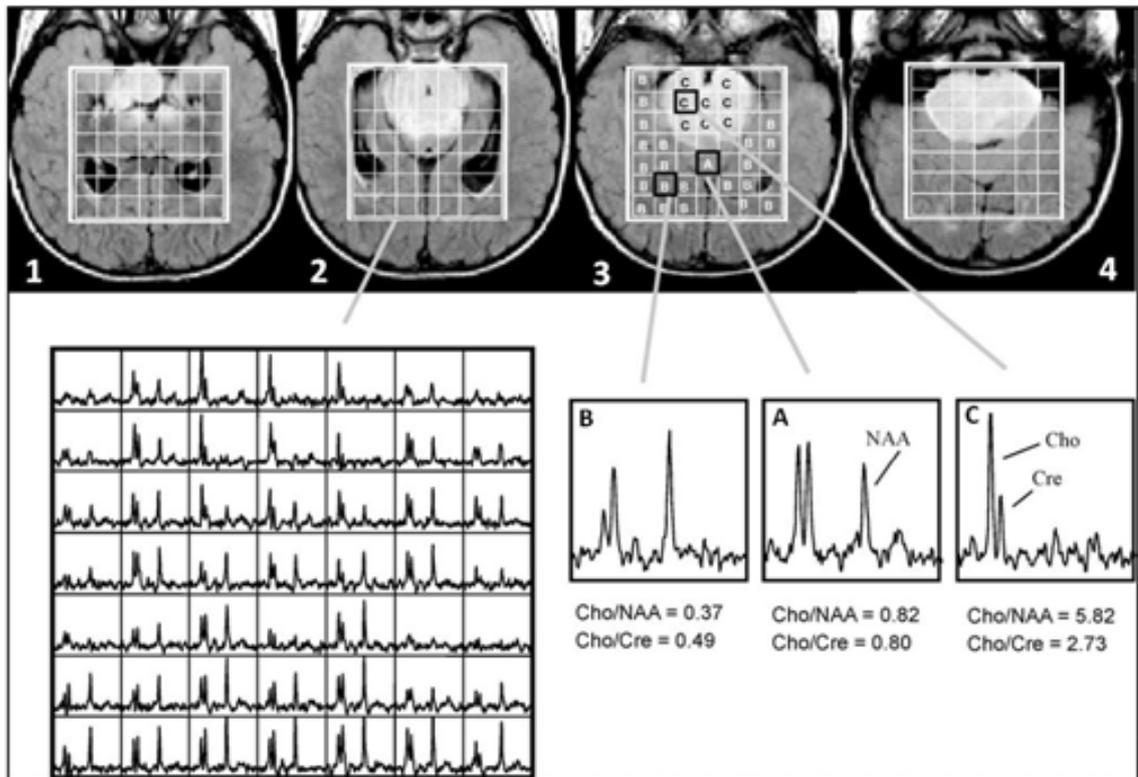


FIGURA 1.17: Estudio por IERM de un glioma difuso de tronco cerebral en un niño. En la parte superior se muestran los cuatro cortes de IRM en los que se ha adquirido la secuencia de IERM con el *grid* en el VOI de adquisición. En la parte inferior izquierda puede observarse un *grid* conteniendo todos los espectros individuales adquiridos en el VOI. A la derecha se muestran tres espectros individuales extraídos de diferentes regiones espaciales de uno de los *grids*: A y B) Espectros adquiridos en regiones de tejido normal; C) Espectro adquirido en el tumor (Adaptación de (59)).

Actualmente se están desarrollando e implementando métodos de clasificación de tumores cerebrales que incluyen datos de ERM e IERM y se basan en el sistema de reconocimiento de patrones, al igual que la DSS descrita anteriormente. Un ejemplo es el *Spectra Classifier v3.0* (62), utilizado en este trabajo (ver también Materiales y métodos, 3.8). Este programa es una aplicación en Java que permite a los usuarios crear clasificadores basados en LDA, utilizando diferentes tipos de datos pre-procesados de ERM e IERM y representando la información de una manera sencilla de interpretar mediante sus herramientas de visualización.

1.2.3 Terapia

Resección quirúrgica

Normalmente, después del diagnóstico, la primera estrategia terapéutica que se lleva a cabo es la resección quirúrgica del tumor, ya sea completa, parcial o limitada a una biopsia estereotáctica. Esta técnica es la mejor opción en el caso de los meningiomas pero suele ser insuficiente por si sola o incluso impracticable en el caso de gliomas de alto grado, debido a la extensión y/o localización del tumor y a la elevada capacidad infiltrativa de estas lesiones, ya que se pueden detectar células malignas en regiones bastante alejadas de la masa anómala detectada por IRM. Es por esto que se suelen aplicar estrategias de terapia combinada para el tratamiento de dichos tumores. En el caso de los linfomas, la resección no mejora la supervivencia del paciente y está desaconsejada en muchos casos, siendo mucho más efectivas la radio y quimioterapia.

Radioterapia

La radioterapia constituye una herramienta muy importante en el tratamiento y mejora del pronóstico y supervivencia de pacientes con determinados tumores cerebrales, como son los linfomas. El objetivo principal de esta técnica es conseguir un efecto diferencial entre el tejido afectado y el tejido sano circundante, de manera que las funciones vitales y la calidad de vida del paciente no se vean afectadas significativamente. Actualmente se está avanzando a este respecto, por ejemplo mediante la técnica de radiocirugía estereotáctica, que trata de controlar la enfermedad de manera más localizada, aumentando la supervivencia y disminuyendo los riesgos, siendo especialmente utilizada en el caso de las metástasis (63). En algunos casos, como los gliomas de alto grado, la dosis de radioterapia necesaria para detener la progresión de la enfermedad conlleva un cierto riesgo de daño del tejido normal. Por ello es necesario complementar la IRM con otras técnicas de diagnóstico no invasivas, como son la ERM/MRSI, la difusión o la perfusión, que permitan discernir adecuadamente entre tejido sano/tumoral y

permitan elaborar el protocolo de terapia más adecuado en cada caso para una mejora en el pronóstico y un aumento de la supervivencia (59,64). La perfusión es una técnica considerada como candidata para predecir supervivencia en pacientes con glioma. Los datos obtenidos con ella se pueden utilizar para calcular el volumen de sangre cerebral, el cual está asociado con la microvasculatura del tumor y que permite distinguir entre tumor residual/recurrente, y necrosis inducida por radioterapia. La técnica de difusión refleja el grado de estructuración del tejido, su contenido en agua y la proporción de espacio intra y extra celular, permitiendo aproximar el contenido celular del tumor. La ^1H -ERM permite cuantificar los metabolitos presentes en el tejido afectado y circundante. La combinación de todas estas técnicas ha demostrado ser verdaderamente eficaz en el pronóstico de supervivencia en el caso de los gliomas y en la detección de respuesta a la terapia (65).

Un caso particular que debe ser considerado es el de la radionecrosis. Un 20% de los pacientes diagnosticados de glioma y tratados con radioterapia desarrolla lesiones en el tejido cerebral sano como consecuencia de la terapia. El principal problema reside en que dichas lesiones son difícilmente distinguibles de recidiva y progresión tumoral por IRM y esto dificulta el correcto seguimiento de la enfermedad. Estudios recientes demuestran que la ^1H -ERM es una herramienta de gran utilidad no sólo en el diagnóstico sino en el seguimiento post-terapéutico de los pacientes con gliomas, ya que se ha demostrado un alto grado de correlación entre los datos obtenidos mediante esta técnica y los hallazgos histopatológicos en cuanto a la diferenciación de recidiva y radionecrosis (66,67).

Quimioterapia

El uso de agentes terapéuticos representa un importante reto para los neuro-oncólogos, debido a que los tumores del SNC constituyen un amplio grupo con diferentes patrones de crecimiento y de respuesta a la terapia, además de presentar características invasivas que dificultan el hallazgo de una diana terapéutica concreta (36). La quimioterapia prolonga la supervivencia y se recomienda en el caso de gliomas anaplásicos, oligodendrogliomas, meduloblastomas, PNETs, tumores de células germinales y linfomas. El objetivo principal de estos agentes no es únicamente la curación, sino la estabilización de la enfermedad, controlando el crecimiento del tumor y garantizando la calidad de vida del paciente. Uno de los principales problemas en la administración de agentes quimioterapéuticos es la presencia de la BHE intacta en muchos casos (tumores de bajo grado), que dificulta la llegada de los fármacos a la diana correspondiente. Además este tipo de tratamiento también genera resistencia en algunas de las células tumorales, que pueden seguir regenerando el tumor a pesar del tratamiento (37).

En el caso de los GBM, que serán el modelo principal utilizado en el presente trabajo, la Temozolomida (TMZ) es considerada como el fármaco más efectivo para su tratamiento. La TMZ es un agente alquilante de administración oral que actúa como una droga tolerable y efectiva, alcanzando concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR) equivalentes al 30-40% de los niveles detectados en plasma. En el caso de la TMZ, la especificidad relativa a la distribución en el SNC de pacientes con tumores cerebrales es desconocida. Una vez administrada, la TMZ se descompone de manera espontánea a pH ligeramente básico dando lugar a su forma activa: metil-triaceno-imidazol-carboxamida (MTIC). MTIC se transforma en 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC, molécula inactiva) y en el catión metil-diazonio, responsable de la transferencia de un grupo metilo al DNA (Figura 1.18). Dichas metilaciones son las que provocan la citotoxicidad en las células tumorales: la metilación de la posición O₆ de la guanina se da solamente en un 5% de los casos, pero es la responsable principal del efecto citotóxico, provocando roturas en la doble cadena del DNA, debidas a la incompleta

reparación de la lesión por el complejo MMR, y la consiguiente muerte celular por apoptosis o autofagia (Figura 1.19). En cambio, el N₇ de la guanina y el N₃ de la adenina constituyen la mayoría de metilaciones ocasionadas en el DNA como resultado del tratamiento con TMZ. La proteína Metil-guanin-metil transferasa (MGMT), de expresión variable en células normales y tumorales repara las metilaciones en el O₆ de la guanina transfiriendo el grupo metilo introducido en el DNA a su propio residuo de cisteína. La MGMT metilada es degradada, por lo que se considera como una enzima de reparación “suicida”. Unos niveles altos de MGMT en las células tumorales contribuyen a potenciar la resistencia a la TMZ. Sin embargo, una metilación en el promotor del gen que codifica para esta proteína silenciaría su expresión y favorecería la respuesta de los tumores a los agentes alquilantes. Esta metilación se da en aproximadamente en un 40% de los gliomas de alto grado (68). En particular, la metilación de regiones del DNA hipometiladas en condiciones normales, como los islotes CpG (citosina fosfato guanina) en el promotor de los genes reparadores del DNA, se correlaciona con una falta de expresión de los mismos en las células tumorales. En el caso del gen MGMT dicha metilación se asocia a un aumento significativo de la supervivencia como respuesta a terapia con TMZ (69). Actualmente se están intentando desarrollar mecanismos de inactivación del promotor MGMT para conseguir un tratamiento más eficaz en los gliomas de alto grado, como por ejemplo con fármacos como la O⁶-bencilguanina, aunque por el momento los resultados no han conseguido superar a los obtenidos con la TMZ (70). Sin embargo estas sustancias tienen también acción supresora sobre el MGMT de médula ósea, por lo que su aplicación en combinación con la TMZ debe estar estrictamente controlada. Además se ha comprobado que la eficacia de estas sustancias se ve disminuida en los casos en que las células tumorales tienen un sistema de reparación de “mis-match” (MMR) defectuoso o un sistema de reparación por excisión de bases funcional (BER), por lo que estos factores también deberían ser investigados en profundidad (71). Por todo esto se han desarrollado y se siguen investigando estrategias de terapia combinatoria que utilizan TMZ junto a inhibidores

enzimáticos (72,73), inmunoterapia (74) o radioterapia (75) para evitar inducir resistencia a la terapia en las células tumorales.

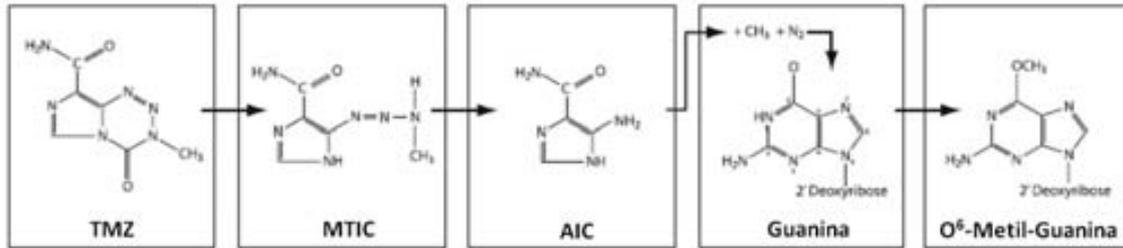


FIGURA 1.18: Conversión química de la TMZ a pH fisiológico en sus metabolitos derivados (MTIC y AITC) y efecto del metil-diazonio sobre la guanina.

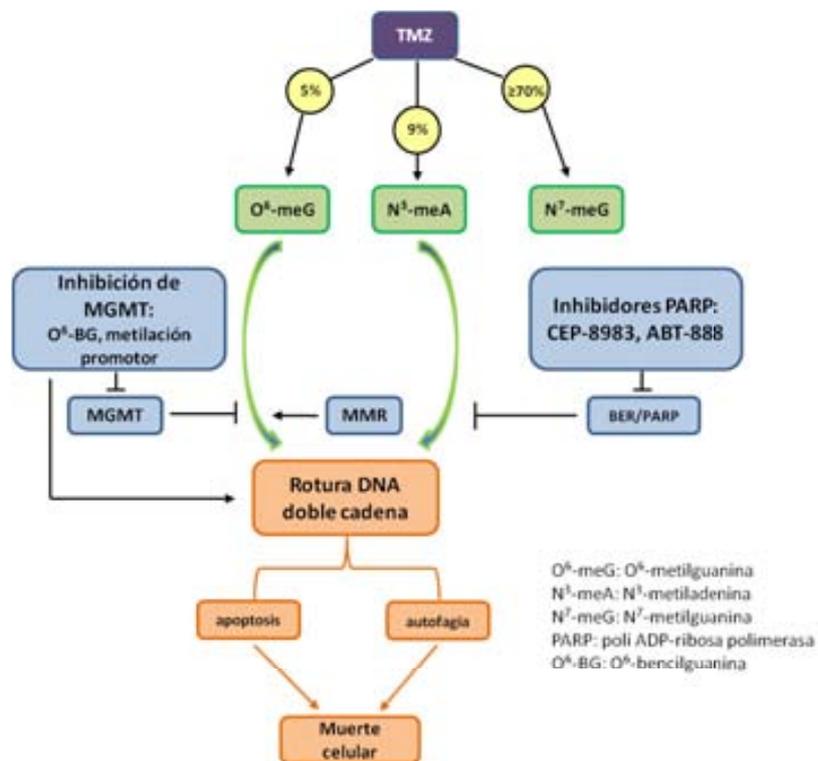


Figura 1.19: Temozolomida: dianas de acción y vías de regulación con sus agentes correspondientes. Las mutaciones O^6 -meG constituyen solo un 5% de las lesiones inducidas por la TMZ, pero son responsables del efecto citotóxico. La MGMT repara estas lesiones confiriendo a la célula resistencia a la TMZ. Cuando la MGMT es inactivada (por ejemplo por O^6 -BG u otras vías) o inactivada por metilación de su promotor, la citotoxicidad provocada por la TMZ se ve aumentada. El sistema MMR reconoce las

mutaciones O⁶-meG en la cadena “molde” del DNA, pero como sólo actúa sobre las hebras de nueva síntesis no puede eliminar el error, lo cual termina provocando roturas en la cadena doble del DNA y por tanto la muerte celular. Las mutaciones N³-meA también son citotóxicas pero habitualmente son reparadas por el sistema BER. La inhibición farmacológica de PARP conlleva a la inhibición del sistema BER aumentando el potencial citotóxico de la TMZ (figura adaptada de (71)).

En estudios preclínicos con modelos animales, la TMZ se disuelve habitualmente en DMSO (antes de ser administrada intragástricamente) (72,75,76), un solvente que disuelve tanto compuestos polares como apolares y que tiene muchas aplicaciones en biología y medicina. Así, el DMSO se utiliza para inhibir la formación de estructuras secundarias en la cadena de DNA o en los cebadores durante la PCR; se utiliza como crioprotector para conservar órganos, tejidos y suspensiones celulares para procedimientos de congelación (77,78); se emplea como analgésico tópico para reducir el dolor causado por lesiones musculares y neutraliza los radicales libres (grupos hidroxilo) (79). Este compuesto también tiene la capacidad de atravesar cualquier membrana celular del organismo (80) aunque no los componentes sólidos extracelulares como es el caso de los dientes, las uñas y el pelo.

A parte de la TMZ, existen otras estrategias terapéuticas basadas en las vías de señalización intracelular que determinan los aspectos clave de la biología de los tumores (proliferación, apoptosis, angiogénesis). Así, la actividad tirosinkinasa (TKs) de los receptores de membrana involucrados en dichos procesos se ve alterada frecuentemente en cáncer, por lo que son una de las principales dianas en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Dos vías destacan como las más prometedoras para frenar el desarrollo tumoral: la vía angiogénica que involucra al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la vía del factor de crecimiento endotelial (EGF) y su receptor EGFR que es promotor de numerosos efectos a nivel de proliferación celular, invasión y angiogénesis. Entre los fármacos desarrollados para actuar sobre dichas vías de señalización están Bevacizumab para el primer caso y Gefitinib y

Erlotinib para el segundo (81). El Bevacizumab ha sido aprobado por la *Food and Drug Administration* (USA) para su administración en casos de GBM recurrente debido a los resultados positivos obtenidos a nivel de supervivencia en estudios clínicos de fase II (82).

Otros fármacos están siendo investigados a nivel preclínico en cuanto a su potencial anti-tumoral, como por ejemplo la Metformina. Su uso se basa en la hipótesis de que en el tejido tumoral existen células madre resistentes a la quimioterapia que son capaces de regenerar íntegramente los tumores (ver también más adelante en este mismo apartado). La metformina actuaría atacando y destruyendo dichas células madre a través de la vía de señalización de la quinasa hepática B1 (LKB1) y de mTOR, que son vías centrales para la regulación de la bioenergética y la homeostasis y juegan un papel crucial en el control de la división celular y la proliferación. Su aplicación, combinada con un agente quimioterapéutico eficaz, sería capaz de destruir la masa tumoral e impedir su recidiva (83). Tradicionalmente la metformina se ha administrado a pacientes diabéticos de tipo II con el fin de reducir la hiperglicemia y los niveles de LDL y triglicéridos en sangre. Actualmente hay estudios que han demostrado su eficacia como coadyuvante de la quimioterapia en algunos tipos de cáncer de mama, mostrando una clara sinergia con el agente quimioterapéutico (83).

Por otra parte, el dicloroacetoato (DCA), es un inhibidor de las cuatro isoformas de la familia de la piruvato deshidrogenada quinasa (PDK) que ha sido utilizado durante muchos años como tratamiento para la acidosis láctica hereditaria (84). Este compuesto es capaz de desviar el metabolismo celular desde la glicolisis hacia el metabolismo oxidativo (mediante la inhibición de PDK) revirtiendo el efecto Warburg además de restaurar vías de apoptosis que se encuentran truncadas en algunas células tumorales (85). La característica que diferencia al DCA de otros compuestos anticancerígenos es el hecho de que muestra más eficacia en experimentos *in vivo* que *in vitro* (con cultivos celulares). Esto puede ser explicado por el hecho de que reproducir el microambiente tumoral con todas sus características (concentración de glucosa, tensión de oxígeno, acidosis etc) es bastante complejo y por tanto los resultados con cultivos *in vitro* no se ajustan exactamente a la situación *in vivo* (84).

El Minerval[®] es un fármaco comercial cuyo principal componente es el ácido 2-hidroxioléico (2OHOA), derivado del ácido oleico, cuya acción hipotensora modula los niveles de proteínas de señalización de membrana en tejidos cardiovasculares así como la estructura de las membranas celulares (86). Estudios recientes han demostrado que el Minerval interacciona con las membranas celulares induciendo cambios de composición y estructura, favoreciendo la traslocación de la proteinquinasa C (PKC) a la membrana plasmática e influyendo por tanto en la actividad del factor de transcripción E2F1, importante regulador del ciclo celular. Dichos cambios tienen un claro efecto anticancerígeno, como la inhibición del ciclo celular en células humanas de cáncer de pulmón de la línea A549, o la inducción a apoptosis en células Jurkat de leucemia humana (87),(88). Sin embargo, estos cambios no afectan al crecimiento de las células normales estudiados por los autores de los trabajos citados y por tanto puede decirse que el Minerval no es un compuesto tóxico para el organismo. Este compuesto ha resultado ser eficaz en el tratamiento de gliomas en modelos preclínicos e incluso en ensayos clínicos (89).

Viroterapia e Inmunoterapia. Terapia combinada.

El principal problema en el tratamiento de los GBM es la presencia de células resistentes o que responden poco a los tratamientos actualmente existentes. La mayoría de estos tumores recidivan en humanos en menos de 12 meses y por ello se está trabajando en la investigación y desarrollo de nuevas terapias capaces de eliminar estas células tumorales residuales. Algunas de estas nuevas propuestas están en fase pre-clínica y clínica de evaluación y comprenden la terapia génica y la viroterapia. Un ejemplo de terapia génica es la introducción de transgenes citotóxicos en las células tumorales, como por ejemplo el que codifica para la timidinkinasa (TK) del virus herpes simplex. La TK permite la conversión del compuesto ganciclovir en su derivado nucleotídico trifosforilado, análogo a la desoxiguanosina trifosfato, que resulta letal para las células en proliferación activa al incorporarse al DNA impidiendo su correcta replicación. Por ello se han llevado a cabo diversos estudios en los que se pretende que las células del GBM incorporen el transgén de interés para poder tratarlas posteriormente con

ganciclovir. Otra opción es la introducción en las células tumorales de vectores adenovirales que codifiquen para proteínas de elevada toxicidad, como una exotoxina del género bacteriano *Pseudomonae* que interrumpe la síntesis de proteínas, lo cual provoca la muerte celular. En este caso los vectores deben producir una diana terapéutica que sólo se exprese en las células tumorales, para evitar la destrucción del tejido sano. En cuanto a las estrategias comprendidas en viroterapia, todas se basan en la síntesis de oncovirus modificados capaces de replicarse en las células tumorales y eliminarlas, ejerciendo un efecto tóxico mínimo en el tejido sano circundante. Los virus más utilizados para esto son el Herpes simplex, los Adenovirus, los Retrovirus y los Reovirus (90). Estas estrategias pueden combinarse con la inmunoterapia, que propone el reclutamiento de células T o células dendríticas, por ejemplo, hacia la zona del tumor para desencadenar una respuesta inmune contra las células tumorales (91).

Células madre

Otro aspecto a considerar dentro de las estrategias terapéuticas contra los gliomas es la presencia de células madre de origen tumoral (“cancer initiating cells” (CICs) o más concretamente en este caso “glioma initiating cells” (GICs)). Se ha demostrado que las GICs tienen un papel clave en el crecimiento, capacidad invasiva, angiogénesis y capacidad de evadir el sistema inmune de los gliomas. Además han sido identificadas como el origen de la resistencia de estos tumores a la quimio y radioterapia. El nicho de las GICs determina las características de dichas células y controla el comportamiento del tumor, mediante el reclutamiento de microglia y macrófagos asociados al tumor, que son componentes indispensables del microambiente neoplásico. Estas células inflamatorias promueven el crecimiento y la evasión del sistema inmune de los gliomas y estudios recientes han demostrado que su poder infiltrativo está correlacionado directamente con el número de GICs en el caso de los gliomas humanos (92). El TGF- β es una citoquina relevante en el desarrollo embrionario y en la homeostasis tisular, que desencadena una respuesta pleiotrópica

dependiente del estado y contexto celular. Esta molécula es un importante factor oncogénico en tumores gliales de grado alto y unos niveles elevados de TGF- β se asocian con una mala prognosis, ya que está involucrada en los procesos de angiogénesis, inmunosupresión, invasión y proliferación celular (93). El TGF- β aumenta la capacidad de autorrenovación de las GICs, las cuales tienen capacidad para generar nuevos tumores que reproduzcan las características y diversidad celular del tumor inicial. Las GICs serían por tanto responsables del inicio del tumor y de su propagación, recurrencia y resistencia a los agentes terapéuticos, y una manera de frenar su actividad podría ser inhibir el efecto de las moléculas de TGF- β que se expresan de manera aberrante en el tumor. Estudios preclínicos en animales inoculados con neuroesferas (formadas a partir GICs) procedentes de gliomas humanos y previamente tratadas con un inhibidor de TGF- β han demostrado que los animales inoculados con GICs tratadas desarrollan tumores más pequeños que los animales control y tienen una tasa de supervivencia mayor, por lo que puede decirse que los inhibidores de TGF- β disminuyen la capacidad de autorrenovación y recidiva de los tumores derivados de las GICs (93).

Por otro lado, se ha demostrado que las células madre neurales (NSCs), en parénquima cerebral normal humano, son capaces de migrar a regiones de tejido lesionado, por lo que se está estudiando su potencial como *carriers* para transportar genes terapéuticos y/o sus productos a regiones afectadas por tumores. Incluso hay estudios preclínicos que han comprobado la capacidad de NSCs exógenas transplantadas en el cerebro de animales afectados por tumores cerebrales, de migrar y diseminar moléculas bioactivas y vectores retrovirales. Las NSCs son capaces de infiltrar la masa tumoral en respuesta a señales complejas compuestas por una mezcla de factores quimioatrayentes, quemoquinas, moléculas adhesivas etc. y situarse en los límites del tumor para expresar el gen terapéutico con el que han sido transformadas (94-96).

En el caso de las metástasis cerebrales, las células gliales activadas (glía reactiva) del propio organismo, en concreto los astrocitos, rodean a las células tumorales produciendo

factores de transcripción como TGF- β e interleuquinas como IL-6 que favorecen el desarrollo de la lesión (97). El marcador más utilizado para detectar la presencia de estas células en modelos pre-clínicos es la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que se observa especialmente sobre-expresada en la región peritumoral y en menor cantidad en el centro del tumor (98). El fenómeno de la astrogliosis también ha sido descrito en casos de infarto cerebral (99).

Otro factor a tener en cuenta en el caso de las metástasis cerebrales es el fenómeno de “self-seeding” de algunos tumores como los de colón y mama y el melanoma, que consiste en que células circulantes de un tumor primario (CTCs) capaces de generar metástasis en otros órganos (como por ejemplo el cerebro) puede volver a la masa originaria del tumor primitivo y re-infiltrarla, acelerando su crecimiento y promoviendo la angiogénesis. El fenómeno de “self-seeding” puede acelerar el crecimiento del tumor y los procesos de angiogénesis, entre otros, y podría explicar la relación entre anaplasia, volumen tumoral, vascularidad, prognosis y recidiva local (100).

1.2.4 Modelos animales

Actualmente, muchos de los avances en la caracterización de los tumores cerebrales, así como en la mejora del diagnóstico y tratamiento se están llevando a cabo en modelos animales que desarrollan la enfermedad de manera muy semejante al ser humano. En el caso de los GBMs, los modelos más utilizados son aquellos inducidos por inyección estereotáctica de células de glioma en el parénquima cerebral, bien de líneas celulares de ratón (modelos *allograft*) o de muestras obtenidas de biopsias de tumores humanos (modelos *xenograft*). La línea GL261 de glioma de ratón es una de las más utilizadas para el estudio de GBM y se inocula normalmente en animales de la cepa singénica C57BL/6, dando lugar a tumores con características invasivas e infiltrativas similares a las de los GBMs humanos (101). Dichos tumores crecen de manera exponencial durante, aproximadamente, cuatro semanas, ocasionando la muerte de los animales por efecto de masa al final de este período de tiempo.

Además, estudios que correlacionan los hallazgos sobre angiogénesis tumoral obtenidos por IRM (volumen sanguíneo cerebral relativo) e histopatología (marcadores de densidad vascular) en este modelo, han demostrado que la RM es una técnica no invasiva capaz de caracterizar la evolución de este modelo y por tanto aplicable en estudios de mejora del diagnóstico y de respuesta a terapia (102). Estudios sobre alteraciones génicas, características inmunológicas y sensibilidad a la radiación demuestran la utilidad del modelo GL261 para investigar el efecto anti-tumoral de diversas estrategias terapéuticas: inmunoterapéuticos, terapia génica, quimioterapia, radioterapia o terapia antiangiogénica, teniendo en cuenta la moderada inmunogenicidad intrínseca de las células GL261 en la cepa C57BL/6 (103).

Por otro lado, es cierto que los modelos inducidos, a pesar de tener la ventaja de presentar un rápido desarrollo tumoral y de ser muy reproducibles no representan exactamente las características de angiogénesis e invasividad de los tumores cerebrales humanos. Por ello, se han desarrollado modelos transgénicos en los cuales los tumores aparecen de manera espontánea a lo largo de la vida de los animales, emulando de una manera más precisa la evolución de la enfermedad en humanos (104),(105). Estos modelos se basan en la expresión de transgenes o el silenciamiento *knock-out* de determinados genes involucrados en el desarrollo de tumores cerebrales humanos primarios, por lo que son capaces de reproducir sus patrones de progresión (106).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo era detectar respuesta temprana morfológica y/o metabólica a terapia en tumores cerebrales de modelos animales murinos por resonancia magnética nuclear. Los objetivos concretos planteados para ello fueron:

- Caracterización global de la respuesta a diversos agentes moduladores del crecimiento tumoral por IRM/ERM. Análisis de la supervivencia post-tratamiento y selección del agente más eficaz.
- Estudio por IERM de cambios debidos al tratamiento en el patrón espectral tumoral y peritumoral en animales tratados con el agente terapéutico previamente seleccionado.
- Perturbación del patrón espectral cerebral obtenido mediante IERM de animales tratados, en el momento de respuesta detectable por RM, para así optimizar el sistema de detección de respuesta a terapia.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CULTIVOS CELULARES – CÉLULAS GL261

Las células de la línea GL261 de glioma murino fueron obtenidas del *Tumor Bank Repository*, situado en el *National Cancer Institute-Frederick* en Frederick, USA. Esta línea fue seleccionada por haber sido previamente caracterizada en el grupo (107,108) y por tener un comportamiento altamente reproducible en la generación de gliomas de alto grado (grado IV) en modelos animales de GBM (101).

Condiciones estándar de cultivo

Las células se cultivaron en frascos de 75 cm² (Nunc, LabClinics SA, Barcelona) utilizando medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma, Madrid) suplementado con 2,0 g/l de Bicarbonato de sodio, 0,285 g/l de Glutamina, un 10% de Suero Fetal Bovino y un 1% de penicilina-estreptomicina. Todos los suplementos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, Madrid, excepto el suero, que procedía de Gibco, Invitrogen Corporation, Reino Unido. El período de tiempo necesario para alcanzar la fase de confluencia (75-85% de la superficie del frasco cubierta de células) era de 7 días a partir del momento del subcultivo (ver también sección 4.1 de Resultados). El cambio de medio se estableció en los días 3 y 5 de cultivo. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera estéril con un 5% de CO₂ y humedad del 95% en un incubador (HeraCell, 150i, Thermo Scientific). En el momento del subcultivo, el medio era eliminado por aspiración con una bomba de vacío y las células se lavaban con 10ml de PBS estéril. A continuación, después de eliminar el PBS, se añadían 2ml de tripsina-EDTA (0,5 g/L y 0,2 g/L respectivamente) (Sigma, Madrid) para desprenderlas de las paredes del frasco y se resuspendían en 8 ml de medio RPMI (10ml de volumen total de resuspensión). Dos gotas de esta resuspensión (7×10^5 células aproximadamente) eran sembradas en los nuevos frascos. Las células fueron adquiridas del NCI en viales en pase tres de cultivo y se subcultivaron sucesivamente hasta el pase cuarenta, momento en el cual se descartaban para evitar posibles

alteraciones en la capacidad de reproducir adecuadamente el modelo ortotópico de GBM utilizado en este trabajo y descrito en el apartado 3.3.1.

Curva de crecimiento

La curva de crecimiento de las células GL261 se llevó a cabo durante 11 días consecutivos utilizando frascos de 75 cm² (n=3 para cada día) y efectuando recuentos (n=3 para cada frasco) cada 24h. Los recuentos se realizaron en una cámara de Neubauer utilizando el colorante *Trypan Blue* para distinguir las células viables de las muertas, ya que estas últimas no extruyen el colorante y aparecen de color azulado al ser observadas al microscopio. Las alícuotas utilizadas para el recuento constaban de 180 µl de PBS, 50 µl de *Trypan Blue* y 40 µl de la suspensión celular obtenida de los frascos, tal y como se describe para el subcultivo en el apartado anterior. Para calcular el total de células por frasco se hizo la media de los 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer y se aplicó la siguiente fórmula que tiene en cuenta las diluciones y volúmenes correspondientes:

$$Cf = M \times d \times Vc \times Vr \quad \text{eq. 3.1}$$

Siendo Cf el número total de células en el frasco, M la media del contaje de los cuadrantes; d el factor de dilución con PBS y *Trypan Blue* ($d = 5$ en este caso), Vc el volumen de la cámara ($Vc = 10^4 \text{ cm}^3$) y Vr el volumen de resuspensión (10 ml).

Los datos obtenidos se ajustaron a una curva sigmoidea con el programa SigmaPlot v8.0.

3.2 MODELOS ANIMALES

3.2.1 Ratones C57BL/6

Los animales fueron obtenidos de los laboratorios Charles River (Charles River Laboratories International, L'Arbresle, France). Para los experimentos llevados a cabo a lo largo de esta tesis se emplearon hembras de 18-20 semanas de edad con pesos comprendidos entre los 20-25 gramos. A lo largo de los diferentes estudios, los animales permanecieron alojados en las instalaciones del *Servei d'Estabulari* de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB). Los estudios realizados con dichos animales fueron regulados según los protocolos experimentales previamente aprobados por el comité de ética de la UAB de acuerdo con la legislación local y estatal (DMAH (*Departament de Medi Ambient i Habitatge*) - 4600; CEEAH (*Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana*) - 1176; CEEAH-1391).

A cada uno de los ratones que participaron en los diferentes estudios se le designó un identificador único que permitiese distinguirlo de los demás. Dicho identificador constaba de la letra C seguida de un número asignado de manera ordinal ascendente.

3.2.2 Colonia de animales transgénicos

Los animales transgénicos utilizados en este trabajo pertenecían al modelo S100 β -v-erbB/Ink4a-Arf(+/-) de oligodendroglioma de bajo grado (105), y fueron obtenidos del repositorio MMHCC, NCI-Frederick, USA. Estos animales presentan un alelo truncado del EGFR, denominado v-erbB, que se expresa bajo el control del promotor murino S100 β y cuya sobreexpresión es responsable de la aparición de ODGs. Por otro lado, la alteración genética Ink4a-Arf(+/-), correspondiente a la delección de dos supresores tumorales (que afectan a las vías de Rb y p53) y que por si sola provoca la aparición de tumores de alto grado, permite que los tumores de este modelo transicionen a grado superior (ODG anaplásico, grado III). La colonia se desarrolló bajo supervisión en el *Servei d'Estabulari* de la UAB, y los animales con genotipo de interés (ver más abajo) y/o síntomas neurológicos indicativos de posible patología

tumoral, fueron explorados por RMN (ver también sección 3.6) de acuerdo a la legislación local y estatal vigente descrita anteriormente. La presencia del transgen y la mutación *knock-out* fueron confirmadas por análisis de PCR añadiendo pequeñas modificaciones a los protocolos diseñados por el Dr. David Goldberg (*University of California San Francisco, USA*) y el Dr. Dave Sims (MMHCCNCI, USA). En resumen, el DNA se extrajo de una porción de cola (1 mm) de los animales con una solución de lisis estándar (50mM Tris-HCl pH=8, 1mM EDTA, 0,2 % SDS, 20 mM NaCl, 100 mg/l proteinasa K) a 55°C durante toda la noche. Para la amplificación del gen S100 β -v-ErbB se utilizaron los encebadores 5'-CTCACAGCAATCTCAAAGCTCCCC-3' y 5'-AGCCTCCAAAGTCAGGTTGATGAGC-3' (Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Germany), según lo descrito en (105). Para Ink4a-Arf(+/-) se utilizaron tres encebadores diferentes (para analizar los dos supresores tumorales): 5'-GTGATCCCTCTACTTTTTCTTCTGACTT-3', 5'-CGGAACGCAAATATCGCAC-3', y 5'-GAGACTAGTGAGACGTGCTACTTCCA-3'. El protocolo de PCR fue el siguiente: ([temperatura (°C)/duración (min)] / número de ciclos): [95/5] / 1; [(95/1), (60/0.5), (72/2)] / 29; [72/10] / 1.

Los ratones transgénicos fueron identificados con la letra de la cepa de origen (S) seguida de un número asignado de manera ordinal ascendente.

3.2.3 Ratones *Swiss nude*

Los animales *Swiss nude* (NU(lco)-Foxn1nu (*outbred*)) fueron obtenidos de los laboratorios Charles River (Charles River Laboratories International, L'Arbresle, France) por el *Institut de Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*. Los ratones permanecieron en dicho centro en la primera fase experimental, durante la inoculación y desarrollo de tumores derivados de GBM humanos (ver apartado 3.3.2 dentro de esta sección). Posteriormente, algunos de ellos fueron trasladados a la UAB, donde continuaron el protocolo experimental por RMN con la aprobación del comité de ética (CEEAH-1176).

3.3 TUMORES CEREBRALES

3.3.1 Modelo ortotópico de GBM murino

Las células de glioma GL261 fueron recolectadas del frasco de cultivo según el procedimiento descrito para el subcultivo en el apartado 3.1. Una pequeña alícuota se reservó para efectuar el recuento, también según lo descrito anteriormente. La suspensión de células se trasladó a un tubo Falcon de 15ml (DeltaLab S.L.U., Barcelona, España) y se centrifugó 1,5 minutos a 1400g (Centrífuga Selecta S-240, ALCO, Terrassa, España), para retirar el sobrenadante y reservar el sedimento de células. Posteriormente se añadió el volumen adecuado de medio RPMI al sedimento para tener una concentración de 10^5 células en 4 μ l según la ecuación:

$$V_f = \frac{(V_i \times C_f)}{10^5} \quad \text{eq. 3.2}$$

Siendo V_f el volumen final de suspensión del sedimento, V_i el volumen de implantación por animal (4 μ l) y C_f el número de células totales extraídas del frasco.

Quince minutos antes de comenzar el proceso de inyección estereotáctica, se administró analgesia a los animales (hembras C57BL/6) por inyección subcutánea: Meloxicam (Boehringer Ingelheim España, S.A.), (1,0 mg/Kg). A continuación los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (Parke-Davis S.L., Madrid) y xilazina (Carlier, Barcelona España) (80 y 10 mg/Kg, respectivamente) administrada intraperitonealmente, e inmovilizados en un sistema estereotáctico (Kopf Instruments, Tujunga/CA, USA) como se muestra en la Figura 3.1. Después de exponer el cráneo se realizó una perforación de 1 mm de diámetro con un microtaladro (Fine Science Tools, Heidelberg, Alemania) 0,1 mm posterior a Bregma (en sentido caudal) y 2,32 mm lateral a la línea media (derecha), en la zona correspondiente al estriado. A continuación, se inyectaron 4 μ l de la suspensión celular (10^5 células) mediante una

jeringa Hamilton de 26G (Sigma-Aldrich, Madrid, España), utilizando un inyector digital (Harvard Apparatus, Holliston/MA, USA) a una velocidad de 2 μ l por minuto, a una profundidad de 3,35 mm desde la superficie del cráneo. Una vez finalizada la inyección, se esperaron 2 minutos antes de extraer suavemente la Hamilton, para evitar que las células fuesen arrastradas al exterior. Los animales fueron suturados con seda del calibre 5/0 (Braun, Barcelona, España) y permanecieron a una temperatura aproximada de unos 25°C bajo una lámpara de infrarrojos durante su recuperación de la anestesia. Una vez despiertos, se les administró Buprenorfina (Buprex, Schering-Plough, Madrid, España) (0,05 mg/kg) por vía subcutánea como analgésico y durante 2 días tras la operación se les administró Meloxicam cada 24h (1,0 mg/Kg).



FIGURA 3.1: A la izquierda se muestra una imagen general del sistema de inyección estereotáctico utilizado para inocular células GL261 en el estriado de los ratones C57BL/6. A la derecha puede verse una ampliación del cráneo de un animal durante el proceso de implantación.

3.3.2 Modelo *xenograft* de GBM humano

Las biopsias de GBM humano fueron recolectadas en el *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* (en colaboración con Ramon Mangues Bafalluy y M^a Virtudes Cespedes Navarro, del Grupo de Oncogénesis y Antitumorales. Institut d'Investigacions Sant Pau (IIB Sant Pau)-Hospital de Sant Pau y de Frederic Bartumeus Jene, Joan Molet Teixido y Fernando Muñoz

Hernández, del Servicio de Neurocirugía, Hospital de Sant Pau, Barcelona). En resumen, pequeños fragmentos de dichas biopsias fueron inoculados en los flancos de hembras *Swiss nude* de 4 semanas de edad mediante un sistema trocar. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 500 mm³ (Figura 3.2) fueron resecados y sometidos a digestión enzimática (por cada 150 mg de tejido se añadieron 3 ml de tripsina 0,25%-EDTA y 30 µl de DNasa (*stock* 100 µg/ml)), y se mantuvieron durante 30 min a 37°C en agitación. Posteriormente se efectuó una disgregación mecánica con pipetas de 10, 5 y 2 ml (30 veces con cada una) y se resuspendieron las células en medio DMEM (Sigma-Aldrich) hasta 20 ml. Por último, la solución obtenida se filtró con una malla de nylon y se centrifugó a 200 g (centrífuga Thermo B4i Multifunction, Fisher Scientific, Madrid) durante 10 min. Las células obtenidas se inocularon mediante inyección estereotáctica de la misma forma descrita que para las células GL261, en el *corpus striatum* (coordenadas: 0,5 mm anterior, 1,5 mm lateral y 4 mm interior desde el cráneo) de hembras de ratón *Swiss nude*, en una concentración de 2,5 x 10⁵ células en 5 µl (efectuando el conteo y resuspensión posterior de la misma manera que la descrita para las células GL261). Cuando los animales se hubieron recuperado de la intervención fueron trasladados al *Servei d'Estabulari* de la UAB, donde permanecieron hasta la finalización de los estudios en los que participaron.



FIGURA 3.2: Ejemplo de tumor subcutáneo (rodeado por un óvalo rojo) creciendo en un flanco de ratón *Swiss nude* tras la inoculación de células procedentes de una biopsia de GBM humano.

En ambos modelos, los animales inoculados intracranealmente fueron supervisados en el Servei d'Estabulari de la UAB desde el inicio del protocolo DMAH-4600, según la sección incluida en el Anexo 3, para valorar su estado físico y proceder al sacrificio en los casos en los que fuese necesario.

3.4 PROTOCOLOS DE TERAPIA

Una vez establecido el patrón de crecimiento estándar de los tumores GL261 y la tasa de supervivencia de los animales implantados, se llevaron a cabo diversos protocolos con agentes terapéuticos considerados como moduladores potenciales o establecidos (según la literatura) del crecimiento tumoral. Se analizó la acción y efecto de dichos agentes mediante la detección de cambios en el patrón metabólico y de crecimiento de los tumores y en la tasa de supervivencia de los animales tratados, en comparación con el grupo control.

Los animales inoculados con células tumorales fueron tratados con diferentes moduladores del crecimiento tumoral para estudiar mediante IRM/ERM/IERM los efectos de dichos agentes en la evolución de la enfermedad. Los diferentes tratamientos comenzaron a aplicarse una vez que los tumores tenían un tamaño suficiente para poder adquirir un espectro *single voxel* (SV) de 2,5 mm³ de su interior, evitando contaminaciones procedentes del tejido peritumoral o sano circundante (Ver también apartado 3.6.1.2 de Materiales y Métodos).

3.4.1 MODELO ORTOTÓPICO DE GBM

3.4.1.1 TEMOZOLOMIDA (TMZ):

La TMZ se obtuvo de Sigma-Aldrich, Madrid. Se disolvió en DMSO (72) en una concentración de 200 mg/ml y se sonicó, para facilitar su completa disolución, siguiendo un protocolo de 4 pulsos de 30% de amplitud y 5 segundos de duración cada uno intercalados con

períodos de descanso también de 5 segundos (Ultrasonic Processor VCX750, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT 06470-1614 USA). A partir de esta solución madre se prepararon las dosis para administrar a los animales (60 mg/Kg), diluyéndola en el vehículo de administración (DMSO 10% en suero fisiológico) hasta una concentración de 6 mg/ml. El volumen de administración para cada ratón fue de 200 μ l y se suministró mediante una sonda intragástrica recta de 20G y 38 mm de longitud (Popper & Sons, New York, USA). La dosis de TMZ se ajustó al peso de los animales durante el protocolo y se ajustó el volumen final a 200 μ l con el vehículo de administración.

Se llevaron a cabo los siguientes tipos de protocolo con administración de TMZ:

3.4.1.1.1 Protocolos de tolerancia:

Animales WT

Antes de comenzar los estudios con animales implantados, se hizo una prueba de toxicidad aparente llevando a cabo un seguimiento de posibles alteraciones morfológicas y de supervivencia con animales WT, para comprobar que la dosis a administrar, combinada con el tiempo de exploración bajo anestesia en el imán, no comprometían visiblemente la salud de los ratones. Para ello se utilizaron doce hembras C57BL/6, que fueron distribuidas en cuatro grupos de tres individuos cada uno. Se administró TMZ a los animales de cada grupo durante dos, tres, cuatro y cinco días consecutivos respectivamente, para comprobar si el fármaco resultaba tóxico desde el principio a una dosis concreta o era bien tolerado incluso durante el protocolo de 5 días, que era el inicialmente seleccionado para aplicar en estudios posteriores y basándonos en resultados anteriores de otros grupos (73). La dosis administrada cada día fue la descrita en el apartado 3.4.1.1. Los animales fueron sometidos a exploraciones por IRM/ERM (apartado 3.6.1 de esta sección) de 30 min de duración en los siguientes puntos

temporales: justo antes de la administración de la primera dosis, 4 h después, una vez al día durante todo el tratamiento y un día después de haber finalizado el tratamiento.

Animales GL261

Se utilizaron doce hembras C57BL/6 divididas en cuatro grupos de tres individuos cada uno, administrando la misma dosis diaria de TMZ (60mg/Kg) durante dos, tres, cuatro y cinco días consecutivos, respectivamente, según el grupo. Las exploraciones por RM se llevaron a cabo de la misma manera que en el caso de los animales WT. La única diferencia fue que la exploración después de la primera dosis fue a las 6h en vez de a las 4h post-administración, por motivos que quedan explicados en la sección 4.3.1.1 de resultados.

3.4.1.1.2 Protocolo de terapia de cinco dosis (un ciclo)

Un total de 26 animales fueron inoculados con células GL261 según el procedimiento descrito en la sección 3.3.1 de Materiales y Métodos. El objetivo de este protocolo de terapia era estudiar cambios en el volumen y patrón espectroscópico de los tumores tratados respecto al control y cambios en la supervivencia de los animales. Según el estudio volumétrico de tumores GL261 estándar (ver también secciones 3.6.1.1 y 4.2.1.1), fijamos el día de inicio de terapia como el 10-12 post-implantación (tumores listos para adquirir un SV de $(2,5\text{mm})^3$), teniendo en cuenta que no siempre los tumores crecen al mismo ritmo y que hubo que adaptar las exploraciones en algunos casos posponiendo el día de inicio de la terapia más allá del día 12, hasta el momento en que los tumores estuvieron listos volumétricamente. A partir de ese momento, los animales recibieron una dosis diaria durante 5 días consecutivos (60mg/Kg qd x 5 p.o.), siendo éste el primer ciclo del protocolo global descrito a continuación (Figura 3.3). Como caso particular del protocolo de un ciclo de terapia, seis de los 26 animales fueron tratados (60mg/Kg qd x 5 p.o.) desde el día dos post-implantación (aunque el volumen del tumor no cumpliera los requisitos) para comprobar si el momento de inicio de la terapia influía en los resultados. Dichos animales fueron explorados el día 15 post-implantación por IRM/ERM

para comparar el volumen tumoral con el de los tumores estándar sin tratar el mismo día de evolución. De los 26 animales investigados, diez fueron explorados por IRM/ERM cada tres días desde el día tres post-implantación hasta la muerte/sacrificio, para tener un registro completo de la evolución de los tumores a lo largo del tiempo y poder elaborar una curva de crecimiento tumoral detallada para compararla con la curva de crecimiento estándar en ausencia de terapia. El resto (otros diez individuos) fueron explorados únicamente cada cinco días, para poder cotejar las etapas de crecimiento tumoral con lo anteriormente descrito y realizar el análisis de supervivencia global correspondiente.

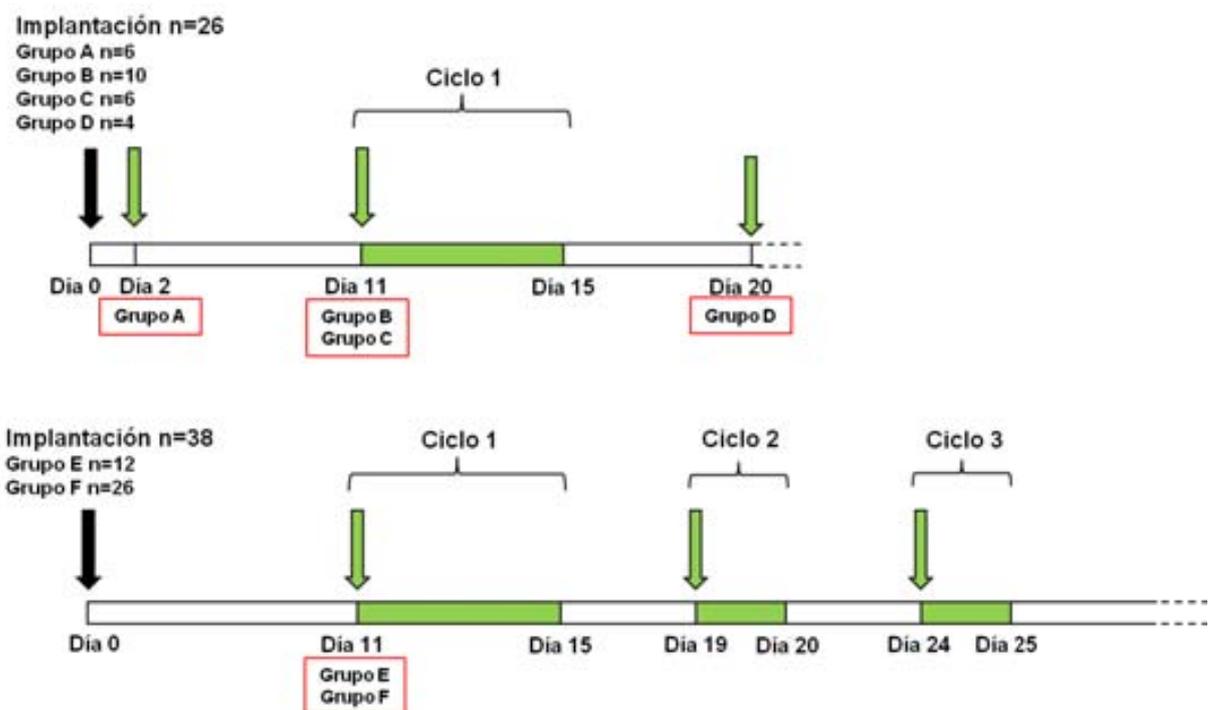


FIGURA 3.3: Diagrama genérico de los protocolos de terapia investigados con uno (parte superior) y tres ciclos (parte inferior) de tratamiento con TMZ a lo largo del tiempo desde el día de implantación (flecha negra). Los tramos verdes y las llaves indican la duración de cada ciclo y las flechas verdes el momento de inicio de cada uno (en el caso de un ciclo de terapia hubo tres puntos temporales de inicio diferentes según el planteamiento experimental, pero la duración del ciclo se dibuja sólo en el caso general de inicio a día 11). Los grupos de animales estudiados con cada protocolo están señalados en el diagrama y se explican con detalle en la sección 4.2.1.2.a.

3.4.1.1.3 Protocolo de terapia de tres ciclos

Este protocolo se llevó a cabo con doce animales GL261 según lo descrito en 3.3.1. En este caso, el protocolo de tratamiento fue de 3 ciclos en total, distribuidos según la Figura 3.3: una dosis diaria durante 5 días consecutivos el primer ciclo (60mg/Kg qd x 5 p.o.), 3 días de descanso, 2 días consecutivos el segundo ciclo (60mg/Kg qd x 2 p.o.), 3 días de descanso y un tercer ciclo idéntico al segundo (60mg/Kg qd x 2 p.o.). Se ajustó la dosis diaria a administrar según artículos publicados previamente por distintos autores. Asimismo, el período de administración también fue una combinación de los descritos anteriormente para TMZ con este tipo de tumores y en los que se mostraba un efecto de respuesta a nivel volumétrico. Se tuvo en cuenta que dado que los animales serían sometidos a diversas exploraciones por RMN, lo cual podría alterar en cierta manera su estado físico, era conveniente no prolongar demasiado cada ciclo de terapia y dejar tiempos de descanso lo suficientemente amplios como para facilitar la recuperación de los animales entre ciclos. Estos períodos entre ciclos de terapia deberían además, según nuestra hipótesis de trabajo, permitir a las células tumorales no afectadas por ciclos anteriores recuperar el nivel necesario de proliferación para que la siguiente dosis de TMZ fuese efectiva y obtener resultados similares a los de otros autores (109-111). Los animales fueron implantados en dos momentos diferentes (n=6 en cada implantación) y fueron tratados según este protocolo. En ambos casos la terapia comenzó a administrarse el día 11 post-implantación y los animales fueron explorados por ERM/IRM cada 4-5 días hasta su muerte/sacrificio.

3.4.1.2 TEMOZOLOMIDA Y METFORMINA

La dosis de metformina administrada fue de 2,5 mg/Kg (Sigma-Aldrich, Madrid, España) por vía oral (83). Se preparó una solución madre del compuesto en suero fisiológico y de aquí se extrajo el volumen que contenía la concentración de metformina indicada para cada animal

(180 µl por cada 20 g de peso) y se mezcló con la solución de TMZ en DMSO, de manera que el volumen final de administración p.o. siguió siendo de 200 µl por animal y la concentración de TMZ era de 60 mg/Kg como en el estudio descrito en 3.4.1.2. Un total de seis animales fueron inoculados con células GL261 como en 3.3.1 y tratados según el protocolo de tres ciclos descrito en la sección 3.4.1.1.3 de este apartado. Las exploraciones por IRM/ERM se llevaron a cabo cada cinco días aproximadamente desde el inicio de la terapia para comparar los volúmenes obtenidos con los puntos temporales correspondientes de la curva de crecimiento de los tumores GL261 estándar.

3.4.1.3 DICLOROACETATO

El DCA fue adquirido de Sigma-Aldrich, Madrid y se administró a los animales disuelto en suero fisiológico (200 µl). La dosis por animal fue de 75 mg/Kg (112) y la administración fue diaria, mediante sonda gástrica, desde el momento en que se implantaron los tumores hasta la muerte de los animales. En este caso sólo se analizó la supervivencia para comprobar si el DCA afectaba significativamente o no respecto a los animales con tumores GL261 controles sin tratamiento.

3.4.1.4 MINERVAL

El Minerval fue obtenido de Lipopharma (Palma de Mallorca, España). Para su administración, el fármaco fue disuelto en aceite de oliva extra virgen (Borges, Tarragona, España) por ser un buen excipiente para el 2OHOA, hasta obtener una concentración de 300mg/ml. Esta disolución se preparó diariamente durante todo el período de tratamiento. La dosis administrada fue de 600mg/Kg (88) de peso al día y se utilizaron sondas intragástricas como método de administración (como en 3.4.1.1). Los animales se pesaron diariamente antes

del tratamiento por recomendación del distribuidor (Lipopharma) y, en caso de que alguno mostrase síntomas de pérdida de peso superiores a dos gramos, se dejaron uno o dos días de descanso en el protocolo de terapia hasta que hubiese signos de recuperación para reanudar el tratamiento. El protocolo se inició en el mismo punto de crecimiento tumoral que los anteriores (día 10-12 post-inoculación) y el fármaco se administró una vez al día hasta la muerte de los animales. Las exploraciones planificadas por IRM/ERM tenían la misma periodicidad que las realizadas durante el protocolo de tres ciclos de TMZ (sección 3.4.1.1.3 de Materiales y Métodos).

3.4.2 MODELO XENOGRAFT DE GBM HUMANO

Un total de treinta y dos animales *Swiss nude*, implantados con células procedentes de biopsias extraídas de GBM humanos, fueron tratados siguiendo el mismo protocolo de cinco dosis de TMZ en un solo ciclo descrito en la sección 3.4.1.1. Dichos animales fueron inoculados con células de muestras no respondedoras y respondedoras a terapia (diagnóstico basado en la historia clínica, evolución y supervivencia de los pacientes) e incluidos en un estudio de supervivencia con o sin tratamientos con TMZ. Veintidós de los tumores fueron explorados por IRM a partir del día 7 post-implantación cada 7 días hasta que alcanzaron el tamaño apropiado (ver apartado 3.4.1.1.2) para iniciar el protocolo de terapia, entre los días 21 y 180 post-implantación. Quince de los animales recibieron la dosis de TMZ descrita previamente en la sección 3.4.1.1.2 y los cinco restantes el vehículo de administración (10% de DMSO en suero fisiológico). Los otros diez animales que no fueron explorados por IRM comenzaron a recibir TMZ (n=5) o vehículo (n=5) en el momento en que el primero de los animales del grupo explorado alcanzó el tamaño de tumor adecuado para tratamiento.

3.5 PREPARACIÓN DE GOTÍCULAS LIPÍDICAS ARTIFICIALES

Las gotículas lipídicas artificiales (*artificial oil bodies* (AOBs)) fueron sintetizadas según lo descrito por Chen et al (113) en colaboración con Juana Martín-Sitjar (GABRMN, *Universitat Autònoma de Barcelona*), utilizando 20 µl de triacil glicerol (TAG) obtenido de aceite de sésamo (Prosperity Resources INT'L, Irvington, USA), 150 µg de dioleil fosfatidilcolina (Sigma-St Louis-USA) y 225 µg de oleosina (sobreeexpresada en *E. coli* según el protocolo descrito en (114)). Se añadieron 400 µl de creatina 100 mM para alcanzar una concentración final de 40 mM en la solución, y este compuesto fue utilizado como estándar interno. El volumen de resuspensión de las gotículas se completó hasta llegar a 1 ml con tampón de fosfato de sodio deuterado (*minimal buffer*) 10 mM y el pH se ajustó a 7,5. La mezcla fue sonicada (Sonics, VCX750) durante 20 segundos aplicando cuatro pulsos de 5 segundos de duración y un 30% de amplitud (potencia) alternados con períodos de descanso de 5 segundos. El proceso de sonicación se repitió tres veces por muestra y al final de cada repetición las muestras se mantuvieron durante 5-10 minutos en hielo para compensar el calentamiento producido durante el proceso.

Las gotículas fueron examinadas por microscopía en LAFEAL (*Universitat Autònoma de Barcelona*) utilizando un microscopio Leica Qwin 500 (Wetzlar, Germany) con cámara Leica DC200 y *software* Leica DCviewer versión 3.2.0.0 (Leica Microsystems, Germany), para comprobar que el tamaño (diámetro $0.78 \pm 0.58 \mu\text{m}$), la forma y la consistencia de las AOB eran los adecuados según lo descrito en (113). La resolución obtenida con este sistema, utilizando un objetivo 100x y una lente 1x fue de 0,111 µm. Finalmente el DMSO (concentración final de 20mM) fue añadido a la solución de AOBs. Se incubaron las muestras a 37°C durante 30 min y después se centrifugaron 5 min a 800 g para obtener dos fases distintas: un sobrenadante consistente en el “*cake*” de gotículas lipídicas y el tampón de disolución debajo.

3.6 ESTUDIOS POR RMN

3.6.1 *In vivo*

Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo en un imán horizontal de 7T (BioSpec 70/30, Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania) instalado en el *Servei de RMN* (SeRMN) de la UAB, equipado con gradientes (bobina de gradientes B-GA12 insertada en un sistema de gradientes B-GA20S) y una sonda de recepción de superficie en cuadratura, desacoplada activamente de una sonda de emisión de volumen de 72 mm de diámetro interno.

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

Los animales fueron colocados en una plataforma adecuada para el escáner y anestesiados con isoflurano 0,5-1,5% en O₂, de manera que su patrón respiratorio se mantenía a frecuencia constante (60-80 respiraciones por minuto). La temperatura de los animales se mantuvo constante (36,5 - 37,5 °C) por medio de un baño de agua recirculante conectado a la plataforma para animales. En el caso de animales estudiados en situación de hiperglicemia (ver también apartado 3.6.1.3) los estudios se llevaron a cabo en situación de hipotermia moderada (~30°C). Un mismo sistema de monitorización permitió controlar la temperatura rectal y la frecuencia respiratoria: SA Instruments, Inc., New York, USA.

3.6.1.1 Estudios por IRM

Imágenes ponderadas en T₂ (T_{2w})

La progresión tumoral de los animales mencionados en el apartado 3.4 de protocolos de terapia se estudió mediante secuencias de alta resolución ponderadas en T₂ (T_{2w}-HR) en los

planos axial y coronal. Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: Secuencia RARE, *echo train length*, 8; campo de vista (FOV), 19.2 x 19.2 mm; matriz (MTX), 256 x 256 (75 x 75 $\mu\text{m}/\text{pixel}$); número de cortes (NS), 10; grosor de cada corte (ST), 0.5mm; espacio entre cortes (*Gap*) 0.1mm; TR/TE, 4200/36ms; número de promedios (NA), 4; tiempo total de adquisición (TAT), 6 min y 43 s.

Para medir el volumen de los tumores se utilizaron las secuencias T_{2w} -HR en el plano coronal y secuencias en 3D. Los parámetros de las secuencias en 3D fueron los siguientes: Secuencia RARE, *echo train length*, 16; FOV, 20 x 20 x 15 mm; MTX, 128 x 128 x 64 (156 x 156 x 234 $\mu\text{m}/\text{pixel}$); NS, 1; ST, 15 mm; TR/TE, 1000/42,5 ms; NA, 1; TAT, 8 min y 32 s.

En el caso de las imágenes T_{2w} -HR, la fórmula empleada para aproximar el volumen tumoral fue (ver también figura 3.4):

$$VT(mm^3) = [[AS_1 \times GS] + [[AS_2 + (\dots) + AS_{10}] \times (GS + DE)]] \times 0,075^2 \quad \text{eq. 3.3}$$

Siendo VT el volumen tumoral, AS el área de tumor medida en píxels medida en cada una de las 10 secciones, GS el grosor de cada sección (0,5 mm), DE la distancia entre secciones (0,1 mm) y $0,075 \text{ mm}^2$ el área de cada píxel.

El área de cada corte del tumor (AS) se midió mediante un sistema automático de generación de regiones de interés (ROIs) accesible desde el programa Paravision 5.0 (Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania). Dicho programa calcula el área de las ROIs en píxels. En el caso de las secuencias T_{2w} -HR, el volumen de tumor que no quedó registrado en imagen por estar en el espacio entre secciones se estimó sumando este espacio (DE) al grosor de la sección correspondiente (Eq. 3.3).

En las secuencias 3D este parámetro no se utilizó porque todo el volumen tumoral quedó registrado en imagen. Las secuencias 3D aparecen al visualizarlas como una sucesión de imágenes coronales contiguas cuyo grosor es el equivalente al grosor de los píxels que las

componen. Entre dichas imágenes se seleccionaron aquellas en las que podía detectarse presencia de masa tumoral (regiones de anomalía en T_2) y se trazaron ROIs de la misma manera que en las imágenes T_{2w} -HR rodeando las lesiones. Para calcular el volumen tumoral se multiplicó la suma de las áreas de todas las ROIs por el grosor total (número de imágenes con tumor por el grosor de un pixel (0,234mm):

$$VT(mm^3) = (AS_1 + AS_2 + (...) + AS_x) \times 0,0057 \quad \text{eq. 3.4}$$

Siendo VT el volumen tumoral, AS el área de tumor en píxeles medida en cada una de las imágenes y 0,0057 mm^3 el volumen de cada pixel.

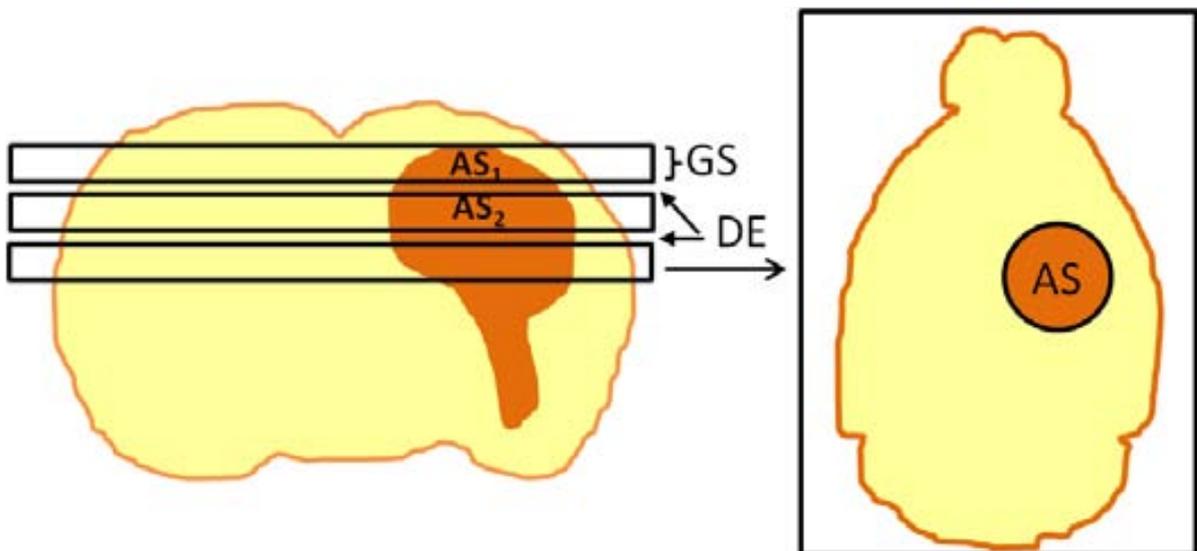


FIGURA 3.4: Esquema del cálculo del volumen tumoral en las imágenes T_{2w} -HR. A la izquierda se muestra un corte axial de cerebro de ratón con una masa tumoral en el hemisferio derecho. Las tres barras horizontales representan tres secciones adquiridas por IRM, siendo el grosor de cada una GS. La distancia entre secciones queda señalada como DE. A la derecha se muestra el esquema de una imagen con orientación coronal, adquirida a partir de una de las secciones representadas a la izquierda en el corte axial. AS es el área tumoral medida en píxeles en cada imagen. Como ejemplo se muestran dos AS

diferentes a la izquierda; AS₁ y AS₂. Puede observarse que para medir el volumen tumoral total hay que tener en cuenta el DE en todos los AS excepto en A₁ (ver eq. 3.3).

Imágenes ponderadas en T₁ (T_{1w})

En el caso de tumores de animales transgénicos, se llevaron a cabo estudios pre y post inyección intraperitoneal de Gadolinio-DTPA (Magnevist, Schering, España), para detectar roturas en la BHE y poder así orientar mejor el grado de la lesión. Se utilizó una secuencia ponderada en T₁ para detectar cambios en la captación de contraste (T_{1w}-CE) cuyos parámetros de adquisición fueron los siguientes: Secuencias Spin Echo con FOV, 17,6 x 17,6 mm; MTX, 128 x 128; NS, 3; ST, 1 mm; *Gap*, 0,1 mm; TR/TE, 350/8,5 ms; NA, 1; TAT, 44 s 800 ms. La secuencia se adquirió antes y después de la inyección i.p. de Gd-DTPA (0.6 mmol/Kg). Esta prueba también se llevó a cabo en el estudio preliminar con animales *Swiss nude* para caracterizar los tumores procedentes de biopsias humanas (sección 4.2.2.1).

3.6.1.2 Estudios por ERM

Los patrones espectroscópicos de parénquima cerebral normal y tumoral fueron adquiridos con secuencias de ¹H-ERM, que se llevaron a cabo colocando el volumen de interés (voxel) de forma que quedase totalmente englobado en el tejido en estudio. En el caso de los tumores, los estudios por ERM se iniciaron cuando el volumen de la lesión era lo suficientemente grande como para colocar un voxel de (2,5 mm)³ (2,5 x 2,5 x 2,5 mm; 15,6 μl) en su interior sin abarcar tejido peritumoral/normal para evitar contaminaciones de metabolitos procedentes del tejido circundante en el patrón espectral de interés. En el caso de animales WT sin tumor, el VOI se colocó en una zona del parénquima cerebral comparable, centrada en el punto habitual de inyección estereotáctica en el estriado. Para ello se utilizaron secuencias con localización PRESS y supresión de agua con el método VAPOR (115) a dos tiempos de eco: 12 ms y 136 ms. Los parámetros de adquisición fueron: Amplitud espectral (SW), 4006.41 Hz; TR, 2500 ms;

NA, 128; TAT, 5 min y 30 sec. Para los experimentos a tiempo de eco corto se adquirieron espectros de agua no suprimida (4 NA) para utilizarla como referencia en la cuantificación de metabolitos. Estas secuencias se emplearon en el estudio de los animales WT, ratones C57BL/6 inoculados con GL261 (que también denominaremos como animales GL261) descritos en el apartado de protocolos de terapia y ratones *Swiss nude* inoculados con muestras de GBM humano.

A los ratones WT y GL261 se les inyectó DMSO i.p. durante los estudios de ERM para analizar la influencia de la resonancia de este compuesto en el patrón SV espectral de cerebro normal y de GBM y calcular la cinética de lavado de dicho compuesto en ambos tipos de tejido (ver sección 4.3.1.1).

3.6.1.3 Estudios por IERM

Treinta y cinco ratones implantados con células GL261, siete animales *Swiss nude* inoculados con muestras de GBM humanos y cinco ratones GEM afectados por ODGs de grado II y grado II con transición a IV fueron estudiados con este tipo de secuencias IERM, que permiten obtener información acerca de la heterogeneidad del patrón metabólico tumoral y del tejido circundante. Se adquirió una imagen T_{2w} -HR como referencia en cada caso, así como una secuencia IERM con tiempo de eco de 12 ms (TEC) además de una de 136 ms (TEL) en el caso de los ratones sometidos a hiperglicemia y de los ratones *Swiss nude*. En todos los casos excepto en los ratones *Swiss nude* se llevaron a cabo experimentos de IERM con perturbación metabólica (IERM-PM) por inyección intraperitoneal de DMSO (n=21) y glucosa (n=6). Para los estudios con DMSO se inyectaron i.p. 200 μ l de DMSO al 10% en suero fisiológico y para los estudios de hiperglicemia se inyectaron i.p. 10 μ l /g de una solución al 25% (peso/volumen) de D-Glucosa en suero fisiológico. Tras la inyección del bolus se adquirieron IERM consecutivos a TEC y TEL que variaron en número según el protocolo establecido en cada caso:

En tres de los ratones GL261 y tres ODGs estudiados con DMSO, se adquirieron cinco secuencias consecutivas a TEC post-inyección para registrar el momento de máxima intensidad de DMSO en parénquima cerebral (normal y/o tumoral). En el resto de ratones GL261 estudiados con este compuesto (n=26) sólo se adquirieron tres secuencias consecutivas de IERM a TEC post-inyección, porque ya se había comprobado en los casos anteriores que el máximo de intensidad de DMSO en el tumor se alcanzaba en esta franja temporal inicial. En el caso de los seis ratones GL261 y los tres ODGs estudiados en situación de hiperglicemia, se adquirieron dos secuencias IERM una hora después de la inyección del bolus de glucosa: una a TEC (88 min post-inyección) y otra a TEL (66 min post-inyección).

Las secuencias de IERM se adquirieron utilizando el método 2D *Chemical Shift Imaging* (CSI) con localización PRESS. Los parámetros utilizados fueron: FOV, 17,6 x 17,6 mm; Volumen de Interés (VOI), 5,5 x 5,5 x 1,0 mm, colocado de manera que abarcara parte del tumor y del tejido normal/peritumoral; ST, 1 mm; TR, 2500 ms; SW, 4006,41 Hz; 512 NEX; TAT, 21 m y 30 s (Figura 3.5). La supresión de agua se efectuó con el método VAPOR (300 Hz de ancho de banda). Los *shims* lineales y de segundo orden fueron ajustados automáticamente con el método FASTMAP (16) en un volumen de 5,8 x 5,8 x 5,8 mm, dentro del cual estaba incluido el VOI. Seis bandas de saturación (ST, 10 mm; pulsos *sech-shaped*: 1,0ms/20250Hz) se posicionaron alrededor del VOI para minimizar el efecto de las señales provenientes del exterior (Figura 3.6). La resolución espacial obtenida quedó definida por una matriz de 8 x 8 voxels en el FOV (4,84 μ l de resolución nominal). Posteriormente, mediante una interpolación de Fourier, se reconstruyó una matriz de 32 x 32, tal y como se describe en (108), lo que produjo una resolución final de 0,30 μ l/voxel. En dicha matriz interpolada se encontraba el VOI seleccionado (10 x 10 voxels).

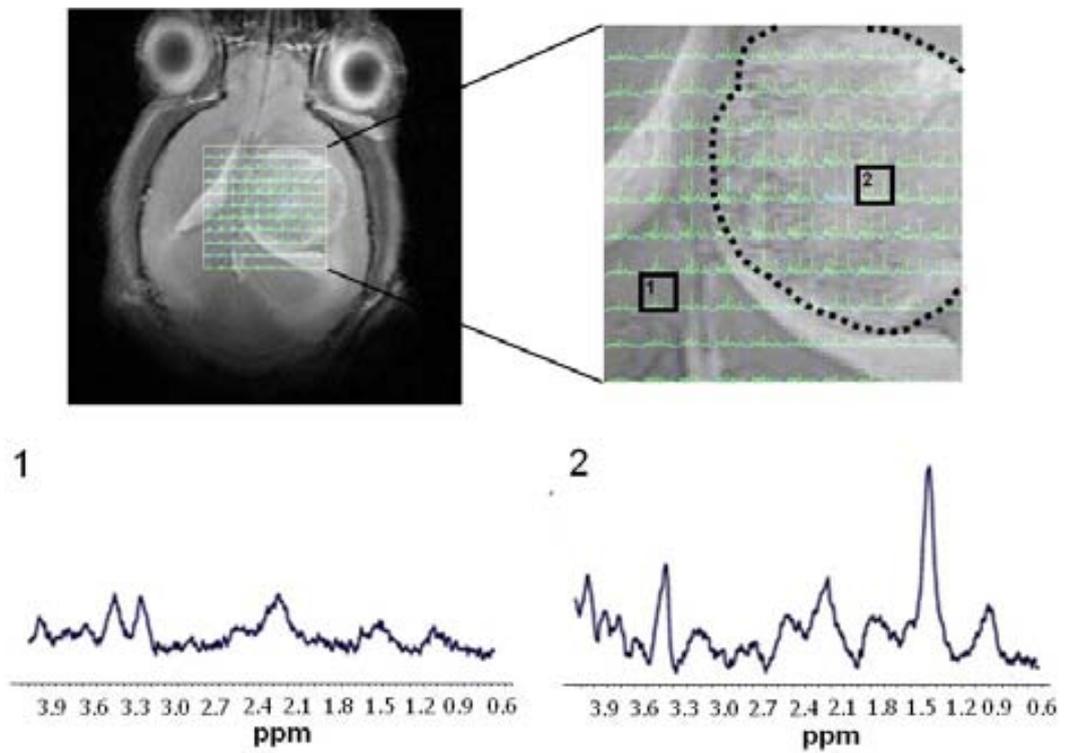


FIGURA 3.5: En la parte superior se muestra un ejemplo de VOI seleccionado sobre una imagen T2w-HR de referencia. A la derecha aparece una ampliación del VOI con los 100 espectros adquiridos en su interior. Los cuadrados negros 1 y 2 señalan dos espectros correspondientes a regiones de tejido diferentes: 1-parénquima peritumoral/normal y 2-tumor GL261. En la parte inferior pueden verse los patrones espectrales SV extraídos de los voxels señalados en el *grid* que se muestra en la parte superior de la imagen.

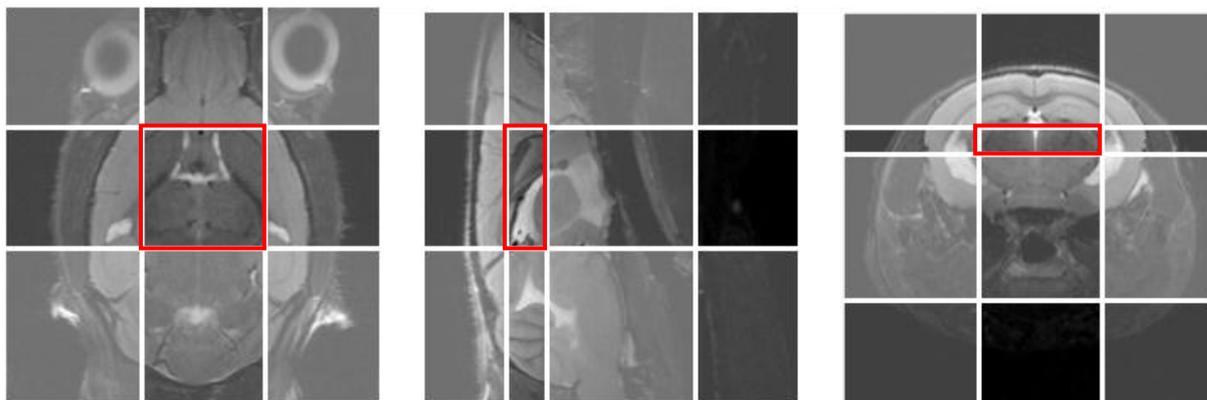


FIGURA 3.6: Esquema de las seis bandas de saturación colocadas alrededor del VOI en las secuencias de IERM utilizadas para minimizar el efecto de las señales del tejido exterior. De izquierda a derecha se observa la localización del VOI (en rojo) en los planos coronal, sagital y axial (19).

3.6.2 *In vitro*

Los estudios correspondientes a *phantoms* de DMSO y TMZ se llevaron a cabo en el mismo sistema que los estudios *in vivo*, descrito en el apartado anterior. Dos soluciones de TMZ disueltas en el vehículo de administración se prepararon a diferentes pHs (8,26 y 5,91) dentro de dos tubos tipo *falcon* de 15 ml para detectar las resonancias de la TMZ y la MTIC (metil-triaceno-imidazol-carboxamida), siendo esta última la forma activa derivada de la TMZ a pH básico (116), (117). Las dos soluciones fueron analizadas mediante ^1H -ERM para SV (TE 12 y 136 ms) utilizando las secuencias descritas para los estudios *in vivo*.

Por otro lado, tres suspensiones que contenían el “cake” de AOBs y tres muestras de *minimal buffer* que contenían DMSO y creatina, todas ellas obtenidas tras centrifugar las muestras iniciales descritas en la sección 3.5, fueron analizadas por la técnica de HR-MAS (*High Resolution Magic Angle Spinning*). Este conjunto de muestras se utilizó como modelo *in vitro* para comprender los resultados obtenidos en los estudios IERM-PM con DMSO (ver también sección 4.4 de Resultados). Las muestras fueron analizadas con un espectrómetro Bruker Avance a 9,4 T 400 MHz, utilizando una sonda de HR-MAS para ^1H - $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ (Bruker

Española S.A., Madrid, Spain). La frecuencia de giro seleccionada fue de 3000 Hz para evitar la presencia de *sidebands* en la región espectral de interés. Se fijó la temperatura de la sonda a 309.1 Kelvin, tras hacer una calibración previa de temperatura con metanol, para conseguir trabajar con las muestras girando a 3000 Hz a una temperatura de 310 K (37 °C). Se adquirieron espectros de ^1H sin supresión de agua utilizando una secuencia de pulso-adquisición con ángulo de 90° (6 μs), anchura espectral de 12 ppm (4795,4 Hz), 16384 puntos de digitalización, 15 s de tiempo de reciclaje y 64 registros por muestra.

Tres *phantoms* con la misma concentración final de creatina y DMSO que las muestras de AOBs sin centrifugar (40mM y 20mM respectivamente) fueron analizadas por HR-MAS de la manera descrita arriba y se utilizaron como control para el experimento de las AOBs.

3.7 POST-PROCESAMIENTO

Los espectros SV adquiridos *in vivo* fueron procesados con el programa MestRec v 4.6.2.5 (Mestrelab Research S.L. (4Hz de apodización antes de la transformada de Fourier, fasado manual de orden cero y uno y referenciación a creatina en 3,03 ppm). Los espectros (*in vivo*) de agua no suprimida se procesaron con 0 Hz de apodización. Las áreas de los metabolitos de interés se midieron por integración manual con el programa MestRec. Los valores de T_1 y T_2 utilizados para las correcciones en el cálculo de concentraciones se asignaron según lo descrito previamente en la literatura: 2066 ms para el T_1 y 46,2 ms para el T_2 del agua, medidos *in vivo* en el estriado de animales C57BL/6 control a 7,0 T (118); 1348 ms y 1679 ms para el T_1 y 441 ms y 171 ms para el T_2 de colina y creatina respectivamente, medidos *in vivo* en cerebro de rata a 9,4 T (119). Finalmente, los valores de T_1 y T_2 seleccionados para el DMSO fueron 2180 ms y 385 ms respectivamente, medidos para la dimetil sulfona en cerebro humano a 2,0 T (120). Se supuso que no habría diferencias significativas en los valores de T_1 y T_2 de dichos metabolitos entre campos de 9,4 T y 7,0 T o 2,0 T y 7,0 T en el caso de la

dimetilsulfona como modelo del DMSO. Las concentraciones de creatina, colina y DMSO fueron entonces calculadas según lo descrito en (107):

$$(\text{MC}) (\mu\text{mol/g}) = \left(\frac{A}{RG \times C1 \times C2} \right)_{\text{met}} * \left(\frac{RG \times C1 \times C2}{A} \right)_{\text{water}} * \frac{\eta_{\text{water}}}{\eta_{\text{met}} \times MW_{\text{water}}} \quad \text{eq. 3.5}$$

Donde MC es la concentración de cada metabolito calculada en μmoles por gramo de agua en el tejido cerebral; A es el área de la resonancia del metabolito de interés; RG es el *receiver gain*; C1 ($1 - e^{(-TR/T1)}$) y C2 ($e^{(-TE/T2)}$) son los factores de corrección para los efectos de T1 y T2 respectivamente; η es el número de protones equivalentes presentes en la resonancia considerada y MW es el peso molecular (18 g/mol para el agua).

Los espectros SV de animales tratados con uno y tres ciclos de TMZ fueron normalizados con un *script* diseñado previamente en nuestro grupo (GABRMN) para ser utilizado en el programa R v2.6.1 (*The R Foundation for Statistical Computing*). Otro *script* diferente para el mismo programa se diseñó para calcular los espectros promedio de los distintos grupos de animales.

Los espectros IERM fueron post-procesados de la manera descrita en (108). En resumen, los datos se procesaron inicialmente en una estación de trabajo dotada con ParaVision 5.0 (Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania) y después se post-procesaron con un *software* diferente: 3d Interactive Chemical Shift Imaging v 1.9.10-3DiCSI (Dept. Radiology, Columbia University/NY, USA, (<http://hatch.cpmc.columbia.edu/public/3DiCSI>), para aplicar el ajuste de *line broadening* (4 Hz de ajuste Lorentziano), la TF y el fasado de orden cero y uno. Los datos en formato ASCII fueron exportados y se utilizaron en MatLab (The MathWorks Inc., Natick/MA, USA) con otro módulo de software de procesamiento desarrollado por el GABRMN, el DMPM

(<http://gabrmn.uab.es/dmpm>) para alinear los espectros en cada voxel de la matriz de IERM referenciándolos a la resonancia de la colina total a 3,21 ppm, cuantificar intensidades relativas de las resonancias de interés utilizando la altura de las señales en el espectro y codificar los resultados en mapas de color de 10x10 voxels. Los espectros individuales fueron normalizados entre 0 y 4.5 ppm a unit length (UL2) (se sumaron los cuadrados de las intensidades detectadas en cada punto del espectro y después se dividió cada una de las intensidades por la raíz cuadrada de dicha suma, eq. 3.6) (121) y exportados en un formato compatible con el *software* SpectraClassifier (122) (<http://gabrmn.uab.es/sc>) v3.0 utilizado para el análisis de reconocimiento de patrones y con los *scripts* del programa R utilizado para calcular los espectros promedio de los diferentes tejidos presentes en el VOI de adquisición (Figura 3.7).

$$I_{norm}i = \frac{I_{real}i}{\sqrt{\sum_0^{4,5} (I_{real}i)^2}} \quad \text{eq. 3.6}$$

Donde $I_{norm}i$ es la intensidad normalizada para cada punto del espectro e $I_{real}i$ es la intensidad inicial para cada punto entre 0 y 4,5 ppm.

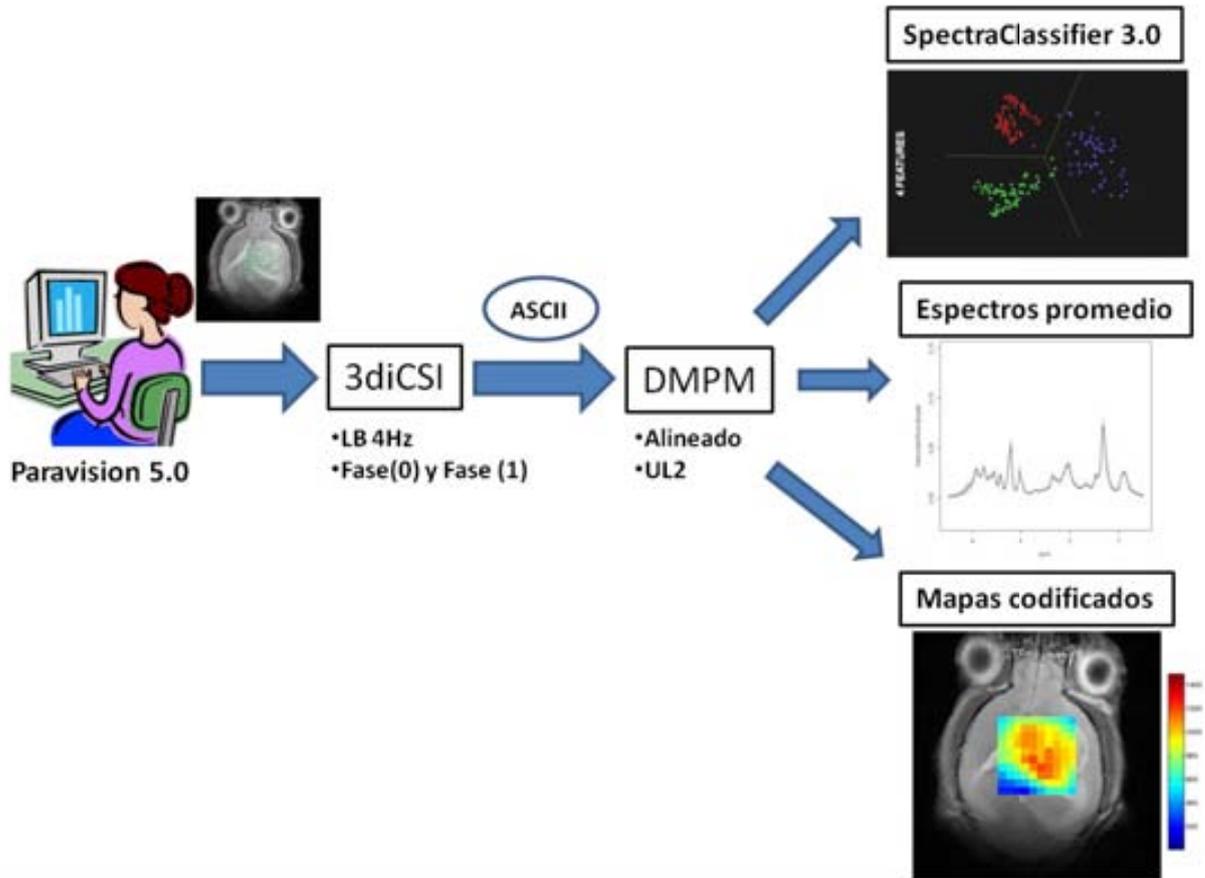


FIGURA 3.7: Esquema de la estrategia de post-procesamiento utilizada para generar mapas codificados en color para la intensidad de metabolitos concretos, espectros promedio o clasificadores de diferentes regiones de tejido a partir de las secuencias de IERM adquiridas.

Los espectros de HR-MAS se procesaron con el *software* del fabricante del espectrómetro (TOPSPIN v 2.0, Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Alemania) y con el *software* jMRUI v 4.0 (<http://www.mrui.uab.es/mrui/>). Se llevó a cabo una apodización de 1 Hz antes de aplicar la transformada de Fourier y el espectro fue calibrado tomando como referencia la resonancia del grupo N-metilo de la creatina a 3,03 ppm. Los metabolitos fueron cuantificados con AMARES, un algoritmo no lineal que opera en el dominio del tiempo (123).

3.8 ANÁLISIS DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES

Para desarrollar clasificadores de tumores cerebrales, cada espectro individual de las matrices de las IERM adquiridas con perturbación por inyección de glucosa (6 GBM y 3 ODG-II) y de las IERM adquiridas en animales con tumores GL261 control (n=9) y en fase de respuesta a TMZ (n=8) fueron normalizados a *unit length* (UL2) y utilizados como unidades/casos (vectores espectrales) independientes. Determinados vectores espectrales normalizados (spv) fueron seleccionados y divididos en dos grupos, entrenamiento y test independiente, de la siguiente forma: para los animales de los estudios en hiperglucemia el grupo de entrenamiento se compuso de 76 spv de GBM procedentes de cuatro animales; 70 spv de ODG-II de dos animales y 54 spv de tejido no tumoral (NT) y el grupo de test consistió en 61 spv de GBM (dos animales); 31 spv de ODG-II con zonas de transición a grado IV (un animal) y 23 spv de NT. En el caso de los animales GL261 control y tratados con TMZ en fase de respuesta el grupo de entrenamiento fue el siguiente: 108 spv de GBM (seis animales); 227 spv de GBM en respuesta a TMZ (seis animales) y 64 spv de NT. El grupo de test se compuso de 73 spv de GBM (tres animales); 50 spv de GBM en respuesta a TMZ (GBMr) (dos animales) y 31 spv de NT. El criterio de selección de los spv fue el siguiente: no procedían de voxels situados en los límites de la matriz de IERM donde el cociente señal/ruido es más bajo, ni de voxels situados en el límite o en el límite entre el tumor y el tejido peritumoral, para evitar contaminaciones en el patrón espectroscópico. Además, en el caso de los ocho animales tratados con TMZ, se excluyeron los vectores que en los estudios de PE-IERM con DMSO resultaron ser *hot-spots* de acumulación de DMSO externa al tumor (ver también sección 4.3.1.5) y que pueden corresponder a tejido con alguna característica diferente con respecto al parénquima cerebral normal (Figura 3.8).

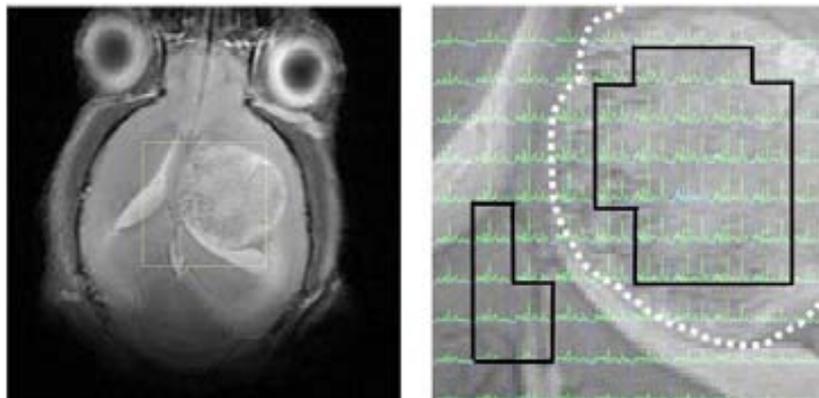


FIGURA 3.8: A la izquierda, imagen T_{2w} HR de referencia para secuencias de IERM; a la derecha ampliación del VOI a partir del cual se adquieren los espectros de interés. El borde del tumor aparece delimitado por una línea punteada blanca. Sobre el VOI se muestra un ejemplo de selección de *voxels* tumorales (derecha) y normales (izquierda) enmarcados con una línea negra para desarrollar clasificadores con el *Spectra Classifier v3.0*. Se excluyen los espectros de los márgenes del VOI, así como los limítrofes entre tejido normal y tumor. En el caso de tumores sometidos a terapia con TMZ también se excluyeron los *voxels* externos a la masa tumoral que dieron *hot-spot* con DMSO (ver sección 4.3.1.5).

Para cada clasificador se seleccionaron unas variables concretas en el grupo de entrenamiento (entre 2 y 23 para clasificadores con hiperglicemia y entre 2 y 21 para clasificadores con TMZ), que eran posiciones en los spv (ppm) correspondientes a características espectrales (alturas) normalizadas de los espectros. Este proceso se llevó a cabo con el método *Sequential Forward Feature Selection* (SFFS), basado en una búsqueda *hill climbing*, evaluado según lo descrito en (124) e implementado en el *Spectra Classifier v3.0*. (62) Las variables seleccionadas se utilizaron para generar clasificadores utilizando el Análisis Lineal discriminante de Fisher (LDA), creando para cada uno un espacio latente bidimensional definido por la proyección de las variables canónicas derivadas del LDA donde se observan simultáneamente los casos de entrenamiento y de test. Cada clasificador, definido por el TE, la glicemia (en el caso de estudios PE-IERM con glucosa) y el número de variables seleccionadas, fue evaluado en sus características descriptivas y predictivas utilizando el

método de *bootstrapping* (125) con 1000 repeticiones para el grupo de entrenamiento y el *balanced error rate* (BER) para grupo de test independiente respectivamente (ecuación 3.7):

$$BER = \frac{1}{3} \left[\left(\frac{\text{mal clasificados}}{\text{total}} \right)_{NT} + \left(\frac{\text{mal clasificados}}{\text{total}} \right)_{GBM} + \left(\frac{\text{mal clasificados}}{\text{total}} \right)_{ODG \text{ o } GBMr} \right] \text{ eq. 3.7}$$

Las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para cada grupo de entrenamiento; es decir, las tasas de verdaderos positivos versus las de falsos positivos, fueron analizadas para cada clasificador transformadas en valores de área bajo la curva (AUC). Además, los resultados obtenidos para cada matriz de IERM fueron representados como mapas codificados en color con una estrategia de tipo nosológico (126),(127) (Figura 3.9). Para ello se llevaron a cabo los siguientes pasos utilizando el *SpectraClassifier 3.0*: Un clasificador desarrollado según lo descrito anteriormente fue utilizado para predecir qué voxels de la matriz de IERM pertenecían a cada clase y la probabilidad de dicha clasificación. Esa información fue codificada en modo HSB (color, saturación e intensidad) para cada voxel de la siguiente forma: el color (azul, rojo o verde) define la clase a la que pertenece el voxel y la saturación (tono definido por la mezcla de los colores del clasificador) define la probabilidad de cada voxel de pertenecer al grupo predicho. El parámetro del brillo no se utilizó y se le asignó un valor constante en todos los casos. Finalmente, el mapa nosológico se obtuvo dibujando el valor HSB de cada voxel en el lugar espacial que le correspondía dentro de la matriz de IERM (Figura 3.10).

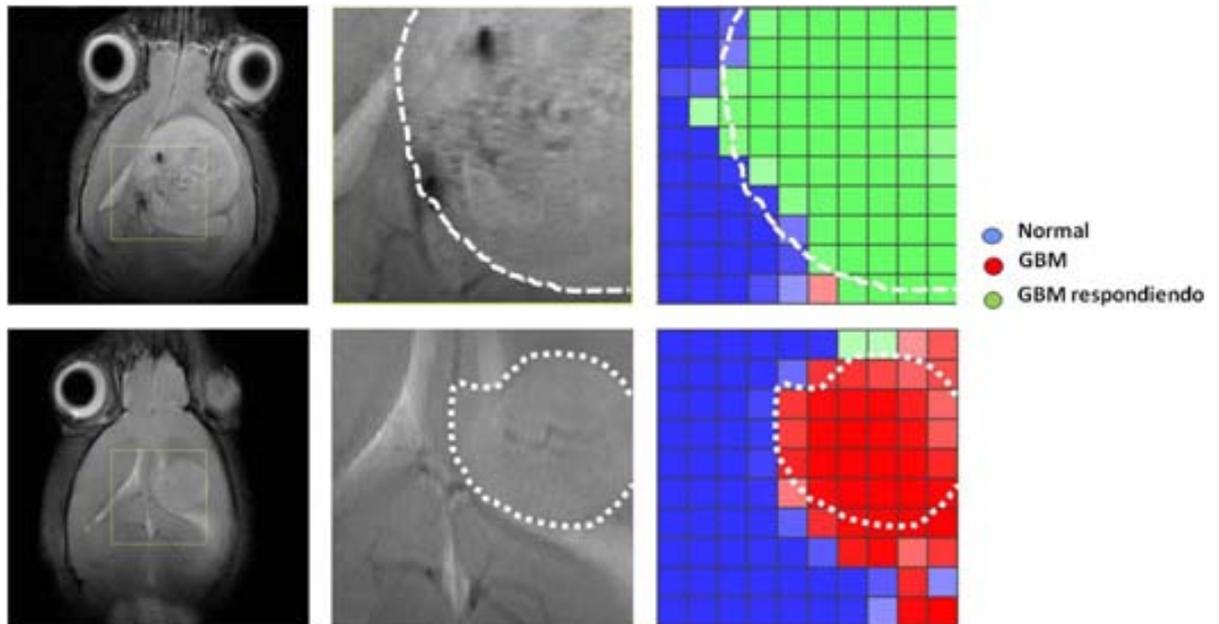


FIGURA 3.9: De izquierda a derecha: imagen T_{2w} HR de referencia para los estudios de IERM llevados a cabo en animales GL261 control y tratados con el protocolo de tres ciclos de TMZ; ampliación del VOI de dichas secuencias con los límites del tumor marcados con una línea blanca discontinua y mapa nosológico de clasificación de cada *voxel* independiente extraído a partir del *Spectra Classifier* v3.0 (la leyenda se muestra a la derecha). En la fila superior la secuencia corresponde a un tumor tratado con TMZ en la fase de respuesta detectable por IRM (C527) y en la fila inferior se muestra un tumor GL261 control (C288). Ambos son animales del grupo de entrenamiento.

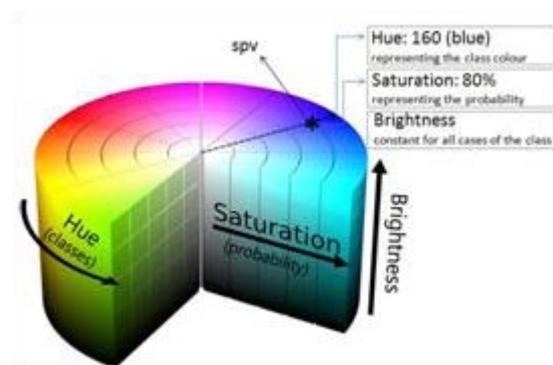


FIGURA 3.10: Ilustración gráfica de la composición de color HSB de un determinado spv (*): El color (parámetro Hue) indica la clase predicha para dicho spv, la saturación indica la probabilidad de pertenencia y el brillo es un parámetro constante en todos los casos. En el ejemplo, el clasificador predice que el spv pertenece a la clase azul (Hue = 160) con una probabilidad del 80%.

La reproducibilidad del clasificador de glicemia fue evaluada mediante el método *leave-one-out* (LOO), para detectar posibles efectos de sobreentrenamiento. Todos los spv de un mismo animal fueron utilizados como grupo de entrenamiento y los spv del resto de animales constituyeron el grupo de test. Los clasificadores fueron generados con el mismo número de variables, TEs y estados glicémicos descritos anteriormente. Este procedimiento fue repetido utilizando cada uno de los animales del estudio como grupo de entrenamiento. Los resultados obtenidos se expresaron como número de casos correctamente clasificados (CCC) y valores de BER.

3.9 HISTOPATOLOGÍA

Una vez finalizados los estudios por PE-MRSI con DMSO, los animales fueron sacrificados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital (200mg/Kg, 60mg/ml; Dolethal, Vetoquinol S.A. Barcelona, España). Se extrajeron los encéfalos y se fijaron en una solución de formaldehído al 4%. Una vez fijados se incluyeron en parafina y se realizaron cortes seriados (cada 5 µm) para localizar la zona correspondiente al VOI de las secuencias de MRSI para cada caso. Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina para distinguir las zonas de tejido normal y tumoral y, en el caso de los animales transgénicos, para diagnosticar el tipo y grado de los tumores, con la colaboración y supervisión del Dr. Martí Pumarola, (*Centre de Biotecnologia Animal i de Teràpia Gènica (CBATEG), Universitat Autònoma de Barcelona*). Las muestras de animales con tumores GL261 que fueron tratados con TMZ fueron teñidas además con anticuerpo contra Ki67 (BD Biosciences, Madrid), para determinar el nivel de proliferación celular y poder contrastarlo con los valores establecidos para tumores GL261 control.

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los diferentes tests estadísticos utilizados en este trabajo son los siguientes: Para el análisis de supervivencia se calcularon curvas de Kaplan-Meier, cuya significación fue calculada mediante los tests de Log-Rank y Tarone-Ware. Para la comparación entre volúmenes tumorales se utilizaron los test T de Student y Wilcoxon según la normalidad (Shapiro-Wilk) de los grupos analizados. Las concentraciones de DMSO detectadas en diferentes tejidos fueron comparadas mediante ANOVA. Los cocientes de metabolitos presentes en diferentes grupos de espectros pre y post-terapia se compararon mediante T de Student de muestras pareadas. Por último, en el análisis de reconocimiento de patrones se empleó el método SFFS para seleccionar las características y el clasificador se desarrolló mediante LDA. La evaluación posterior se realizó mediante el *bootstrapping* y el *balanced error rate*, implementados con las curvas ROC (característica operativa del receptor) y el método LOO.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CULTIVOS CELULARES: CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS GL261

La curva de crecimiento de las células GL261 en condiciones estándar de cultivo y crecimiento se muestra en la Figura 4.1. Las células alcanzaron la fase exponencial de crecimiento a las 120 horas (día 5) de cultivo. La fase de confluencia (aproximadamente el 80% de la superficie del frasco cubierta por células) se situaría entre los días siete y ocho (168-192 horas) según el ajuste sigmoideo. A día ocho sin embargo se observaban células, que empezaban a formar cúmulos de tipo glioesfera que se desprendían al añadir PBS en el proceso de subcultivo (ver materiales y métodos punto 3.1), por lo que el día de subcultivo se estableció en el día siete. Entre los días nueve y once, en caso de no llevar a cabo el subcultivo, el cultivo alcanzaba la fase de post-confluencia.

Dichas características de la curva de crecimiento establecida para las células GL261 se tuvieron en cuenta para comprobar que nuevas alícuotas de células se comportaban de manera estándar al descongelarlas.

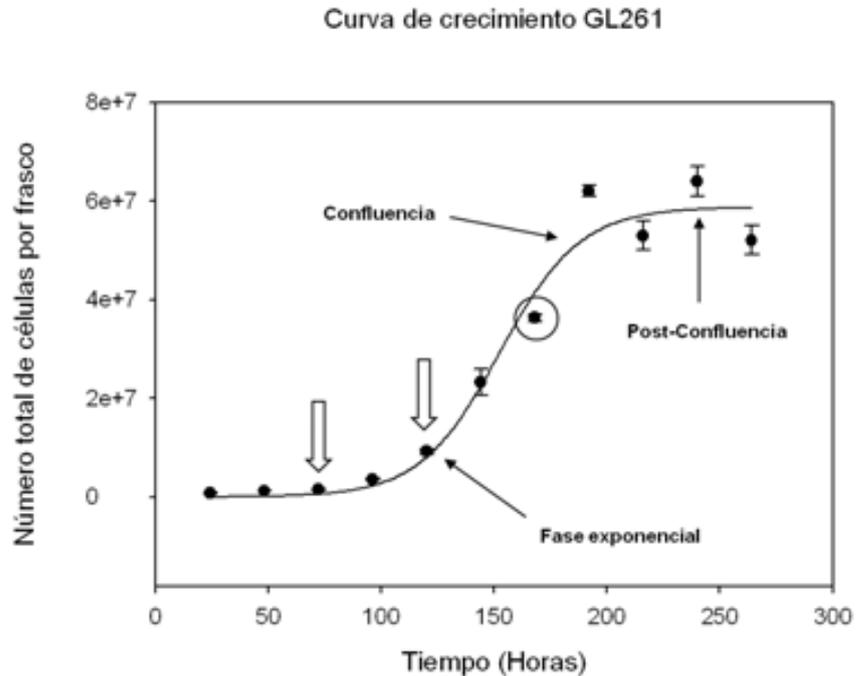


FIGURA 4.1: Curva de crecimiento de las células GL261. Los puntos del gráfico representan la media del número de células totales por frasco en cada punto temporal ($n=3$ frascos y $n=3$ contajes por frasco) y las barras verticales muestran la desviación estándar para cada punto (en algunos casos no es visible por ser más pequeña que el símbolo). Las flechas verticales indican los cambios de medio en el protocolo de cultivo estándar (ver también 3.1) y el círculo rodea el día de subcultivo establecido.

4.2. AGENTES TERAPÉUTICOS

4.2.1 MODELO ORTOTÓPICO DE GBM

4.2.1.1 Grupo Control

Las células GL261 fueron inoculadas en el estriado de nueve ratones C57BL/6 (Ver materiales y métodos 3.3.1). Este grupo fue utilizado como control para determinar la curva de crecimiento estándar de los tumores GL261, además de la tasa de supervivencia de los animales. La evolución de los tumores se controló por IRM en seis de los nueve animales,

desde el sexto día post-implantación hasta la fecha de muerte/sacrificio. En cuatro de ellos se calculó el volumen tumoral utilizando imágenes ponderadas en T_2 de alta resolución (T_{2w} HR) y secuencias tridimensionales (3D) (ver Materiales y Métodos 3.6.1.1) cada tres días desde el día seis post-implantación. Al comparar los resultados de ambos métodos, se seleccionaron las imágenes de T_2 para estudios posteriores, ya que no había diferencias significativas ($p < 0,05$) en las medidas obtenidas con las dos secuencias (resultados no mostrados), y las imágenes de T_{2w} HR se adquieren en la mitad de tiempo que las secuencias de 3D (Figura 4.2). Una vez seleccionado el método de medición de volumen, se estudiaron dos animales más siguiendo el mismo protocolo y se calculó la curva de crecimiento de volumen para los tumores GL261 con un total de seis animales (Figura 4.3).

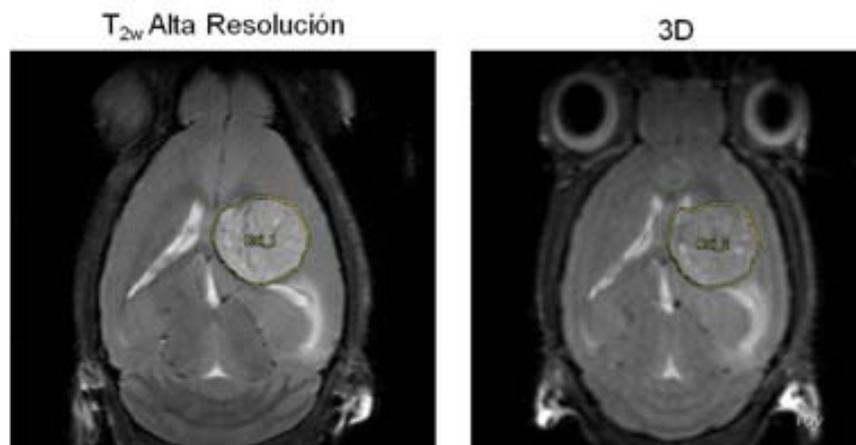


FIGURA 4.2: Imágenes de RM de un corte coronal de un tumor GL261 (animal C102) a día 15 de evolución. A la izquierda se muestra una imagen de alta resolución ponderada en T_2 (T_{2w} HR) con el área del tumor rodeada en amarillo (ROI 1). A la derecha se observa el área del tumor en un corte muy próximo al anterior en una imagen perteneciente a una secuencia tridimensional (ROI 2).

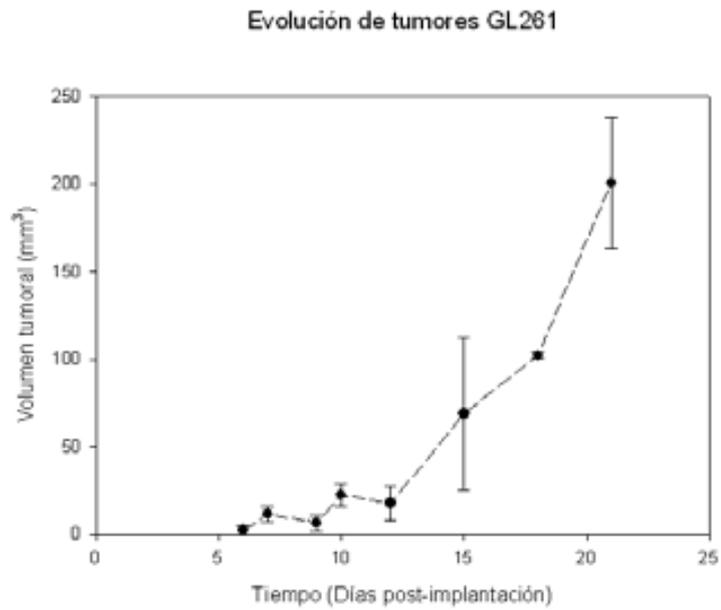


FIGURA 4.3: Curva de evolución del crecimiento de tumores GL261 en 6 animales. Los puntos del gráfico representan la media del volumen de los tumores en cada punto temporal de seguimiento (cada tres días a partir del día 6 post-implantación), y las barras verticales muestran la desviación estándar. El seguimiento terminó con el sacrificio de los animales (Anexo 3) y la última medida que pudo realizarse fue el día 21 post-implantación.

Posteriormente se calculó la curva de supervivencia Kaplan-Meier de estos animales más los tres implantados que no fueron estudiados por IRM ($n=9$). Los nueve formaron el grupo control para estudios posteriores de supervivencia (Figura 4.4).

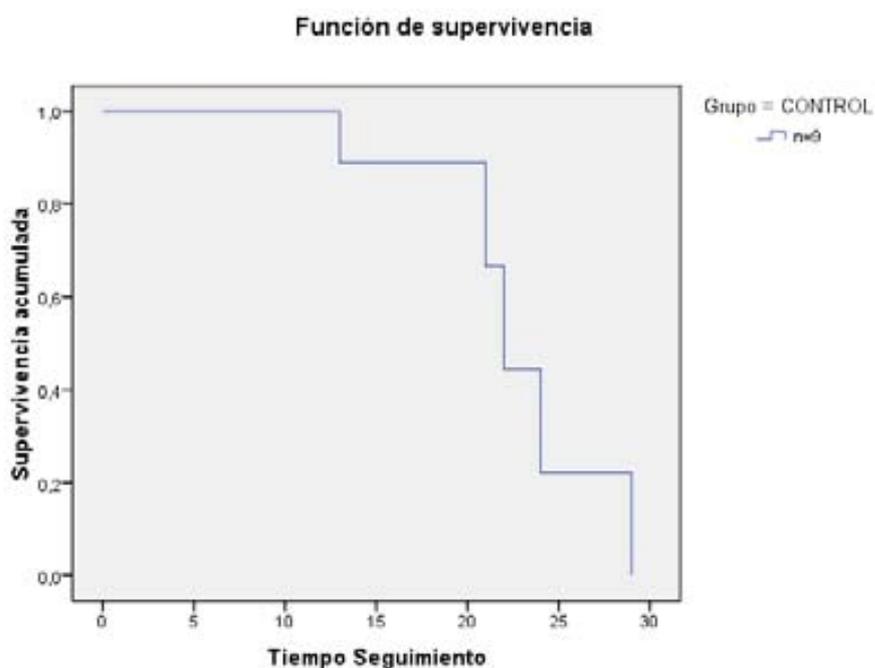


FIGURA 4.4: Curva de supervivencia Kaplan-Meier de 9 animales inoculados con células GL261. El máximo de supervivencia fue de 29 días después de la inoculación de las células (supervivencia media del grupo: 22,77 días \pm 1,59 (SEM)).

4.2.1.2 Respuesta a la terapia: Evolución del crecimiento tumoral y supervivencia.

4.2.1.2 a) TEMOZOLOMIDA

Estudios de tolerancia

Antes de comenzar los estudios con animales implantados, se llevó a cabo una prueba de tolerancia con animales WT (n= 12) distribuidos en cuatro grupos de diferente número de administraciones de TMZ (ver también 3.4.1.1.1) para comprobar que la dosis a administrar, combinada con el tiempo de exploración bajo anestesia en el imán, no comprometían visiblemente la salud de los ratones. Se comprobó que tanto el peso como el comportamiento de los animales (postura, locomoción, hidratación...) (Anexo 3) no experimentaron cambios

significativos respecto a lo observado antes de iniciar el estudio, y que la respiración durante los estudios por IRM/ERM permanecía constante y dentro de un patrón normal (60-80 respiraciones por minuto), por lo que se concluyó que la dosis era bien tolerada incluso en nuestro período de administración continuada más largo (cinco días) (análogo en duración al utilizado en (73)) y que tampoco producía efectos de toxicidad aguda. Además, se comprobó que tampoco se dieron efectos perjudiciales a largo plazo, ya que la supervivencia de los animales no se vio afectada en los siguientes 60 días después del fin del experimento. En la Figura 4.5 se muestra un ejemplo de imagen ponderada en T_2 de alta resolución del cerebro de uno de los animales del cuarto grupo (5 días de tratamiento) un día después de la última dosis y los espectros adquiridos a TEC y TEL en el estriado, que muestran un patrón equivalente al descrito previamente para estos animales (Figura 4.7) (107).

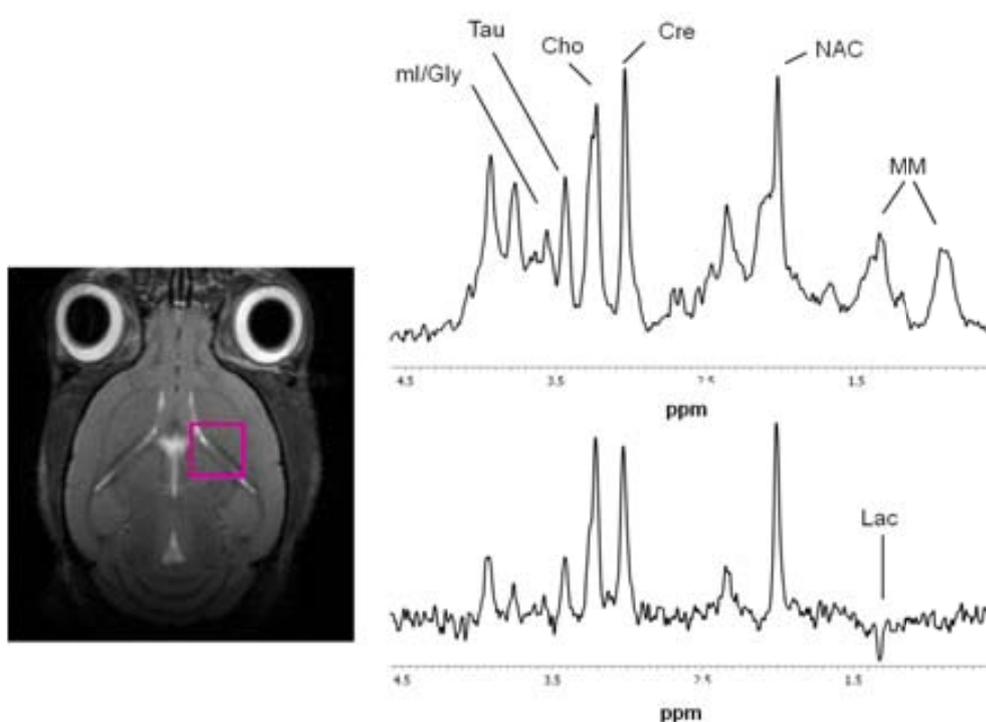


FIGURA 4.5: A la izquierda se muestra la imagen de alta resolución (T_{2w} HR) del cerebro de un animal C57BL/6 WT (C236) obtenida un día después de concluir un ciclo de 5 días consecutivos de terapia con TMZ. El voxel de $(2,5 \text{ mm})^3$ del que se adquirieron los espectros SV a TEC y TEL está señalado con un cuadrado rosa. A la derecha se representan los espectros a TEC (12 ms, parte superior) y TEL (136 ms,

parte inferior) en el rango de interés para el estudio de metabolitos cerebrales (0,5-4,5 ppm). Las resonancias más características de dicho rango espectral están señaladas sobre los espectros (107).

Ante los resultados obtenidos con animales WT, se procedió a repetir el experimento de evaluación de tolerancia aparente, en esta ocasión con animales implantados con células GL261. En la Figura 4.6 se muestra una imagen de alta resolución (T_{2w} HR) del animal C253 del grupo de 5 dosis, adquirida el día después de finalizar el tratamiento. También se pueden observar los espectros a TEC y TEL adquiridos en un voxel de $(2.5 \text{ mm})^3$ en el interior del tumor. Estos datos son similares a los obtenidos previamente por otros autores en el grupo (Figura 4.7) (107). Además, el estado físico de los animales era el esperado en el caso de ratones afectados por GBM (no se observó ninguna sintomatología adicional o más grave que las descritas para esta enfermedad: encorvamiento, pérdida de peso, caquexia, deshidratación (Anexo 3) y todos mantuvieron un ritmo respiratorio normal y constante durante las exploraciones de IRM/ERM. Por ello se concluyó que la terapia no estaba afectando adversamente a la salud de los animales y se procedió a aplicar protocolos de terapia más avanzados que permitiesen la evaluación de una posible respuesta al tratamiento por RM.

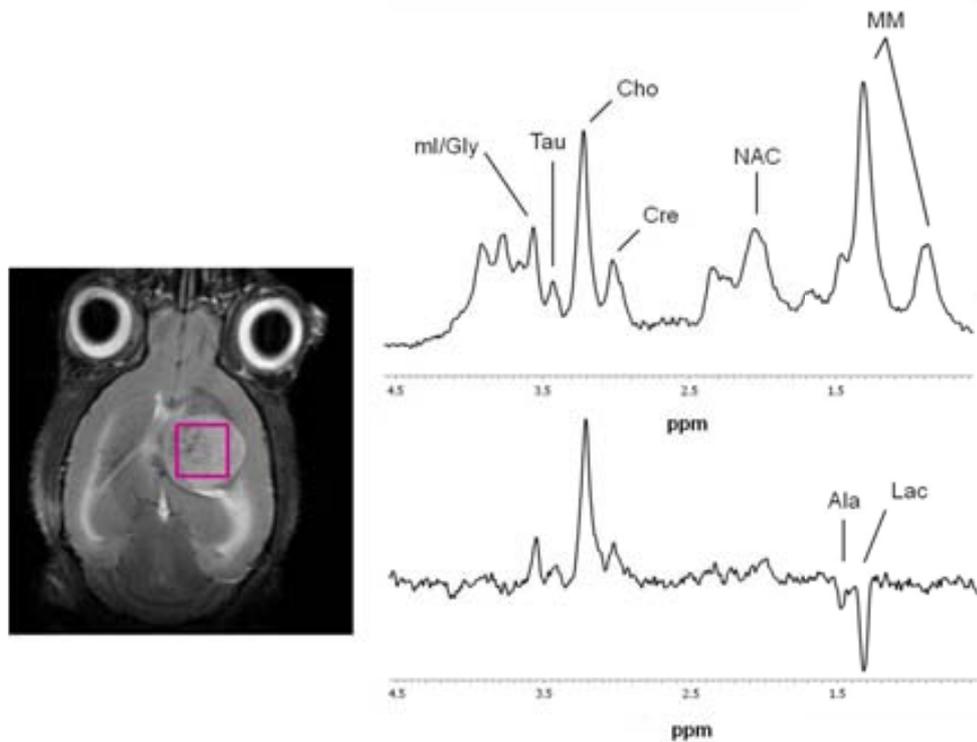


FIGURA 4.6: A la izquierda puede verse una imagen de alta resolución ponderada en T_2 (T_{2w} HR) de un tumor GL261 (animal C253) tras un ciclo de 5 días consecutivos de terapia con TMZ (día 14 post-implantación). El voxel utilizado en los estudios de ERM está dibujado en rosa. A la derecha se muestran los espectros a TEC (superior) y TEL (inferior) adquiridos (12 y 136 ms respectivamente), en el rango de 0,5 a 4,5 ppm con los metabolitos más representativos marcados (107).

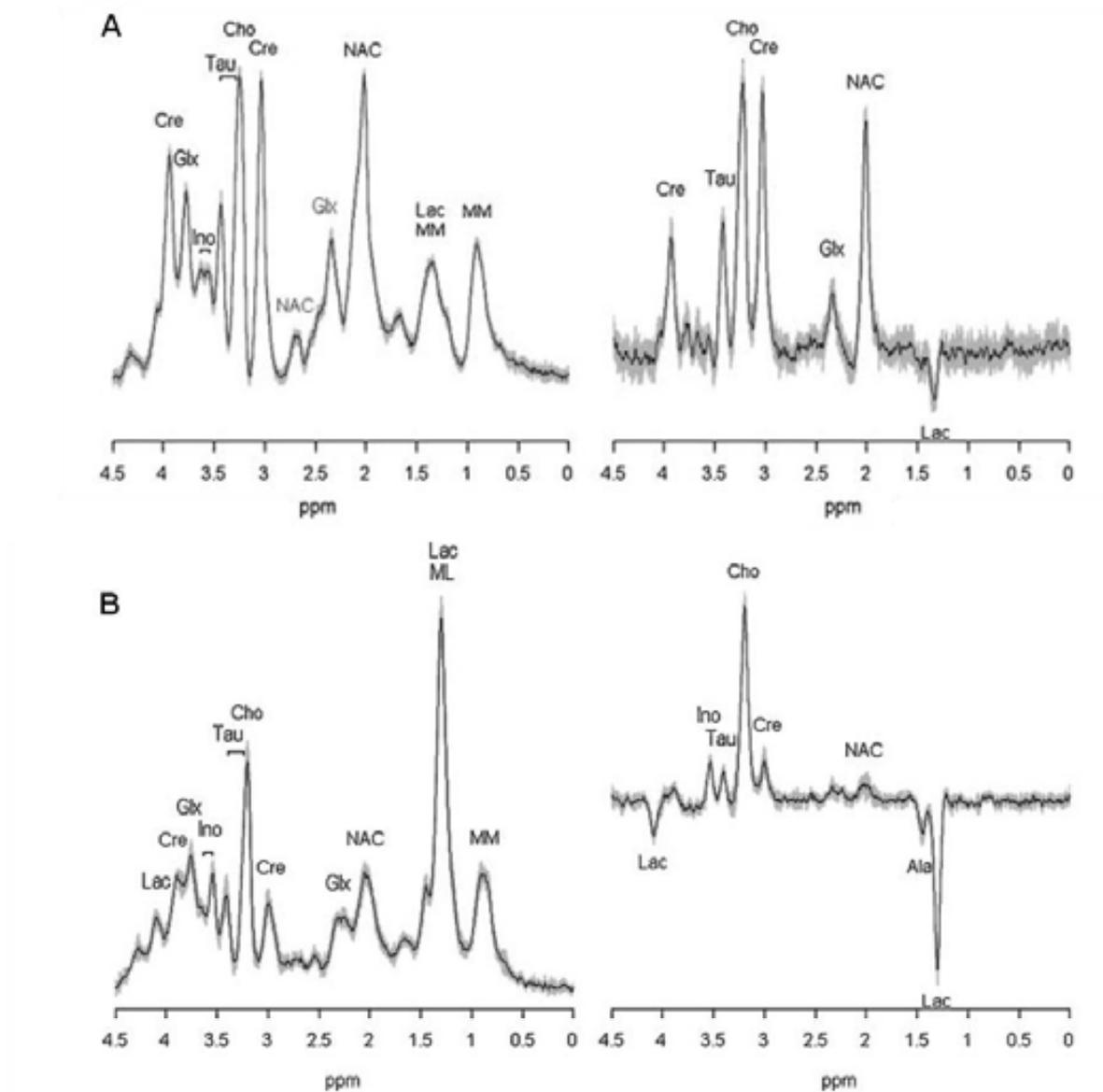


FIGURA 4.7: Espectros promedio de parénquima cerebral normal (\pm SD en sombreado gris) de ratón C57BL/6 (A) (n=3) y tumor GL261 (B) (n=6) adquiridos previamente en el grupo a TEC (izquierda) y TEL (derecha). Para ver la asignación de las resonancias indicadas: Lac, lactato (4,11 y 1,32 ppm); Cre, creatina (3,93 y 3,03 ppm); Glx, glutamina y glutamato (3,77/3,75 y 2,45/2,35 ppm); Ino, mio-inositol (3,62 y 3,54 ppm); Tau, taurina (3,42 y 3,27 ppm); Cho, colina (3,21 ppm); NAC, NAA, compuestos N-acetilados y lípidos móviles (ML) (2,03 ppm); Ala, alanina (1,45 ppm); Lac/ML, lactato y grupo metileno de las cadenas de ácidos grasos en los ML (1,29 ppm); MM, grupo metilo de las cadenas de ácidos grasos en los ML y macromoléculas (0,9 ppm). Asignación de las resonancias según (107).

Un ciclo de cinco días consecutivos

Un total de 26 animales fueron inoculados con células GL261. El objetivo de este protocolo era estudiar posibles cambios en el volumen y patrón espectroscópico de los tumores tratados respecto al control así como cambios en la supervivencia de los animales. En algunos ejemplos de la literatura, los ratones inoculados ortotópicamente con líneas celulares tumorales comienzan a ser tratados el día 1 o 2 post-implantación (72). Sin embargo, en nuestro caso nos interesaba empezar el tratamiento en un punto temporal en el que el tumor fuese claramente detectable por IRM y tuviese un tamaño suficiente para adquirir un ERM SV en su interior, evitando contaminación por parte del tejido normal circundante. Según el estudio volumétrico de tumores GL261 estándar (sección 4.2.1.1), fijamos nuestro día de interés como el 10-12 post-implantación (equivalente a un volumen mínimo de 12 mm^3), teniendo en cuenta que no siempre los tumores crecen al mismo ritmo y que hubo que adaptar el inicio de las exploraciones y del protocolo de terapia en algunos casos. De los 26 animales investigados, 20 empezaron el tratamiento según nuestro criterio y 6 el día 2 post-implantación (grupo A en la Figura 3.3 de la sección 3.4.1.1.2), para comprobar posibles diferencias en el crecimiento y la supervivencia dependientes del momento de inicio de la terapia. En la Figura 4.8 se muestra una significativa ralentización del crecimiento tumoral en el grupo tratado desde el día dos ($n=6$) ($12,7 \text{ mm}^3 \pm 0,9$ (SEM)), respecto al grupo tratado más adelante ($n=20$) ($73,7 \text{ mm}^3 \pm 5,6$ (SEM)), al comparar los volúmenes tumorales de ambos grupos a día 15 de evolución ($p<0,05$).

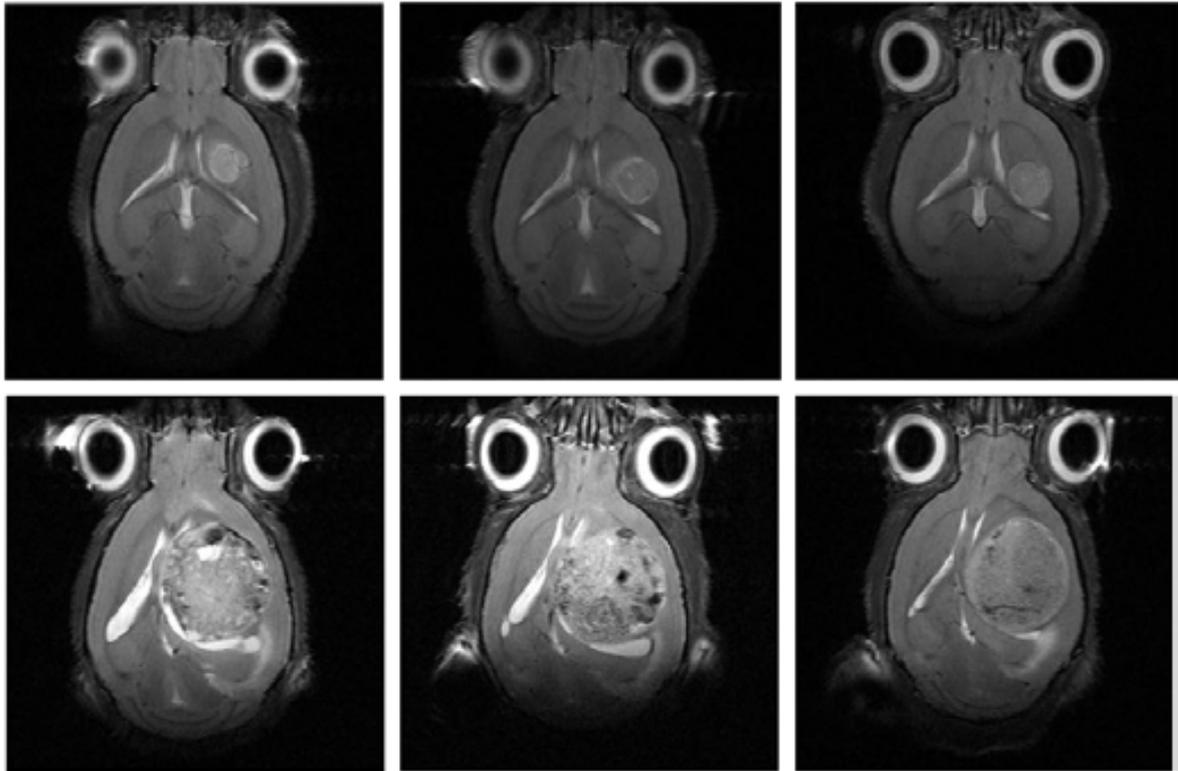


FIGURA 4.8: En la fila superior se muestran tres imágenes representativas ponderadas en T_{2w} HR a día 15 de evolución del grupo de animales tratados con un ciclo de cinco dosis de TMZ a partir del día dos post-implantación (animales C271, C272 y C273 de izquierda a derecha). En la fila inferior se muestran tres imágenes representativas de animales tratados con el mismo protocolo de terapia que los anteriores pero comenzando el día 10-12 post-implantación (se muestra también el día 15 de crecimiento del tumor en los animales C384, C385 y C386 de izquierda a derecha). Al comparar estadísticamente los volúmenes de tumores de ambos grupos se comprobó que los tumores tratados inmediatamente después de la implantación (día dos) sufrieron una ralentización significativa del crecimiento.

Los 20 animales explorados por resonancia previamente al inicio de la terapia con TMZ fueron divididos en tres grupos. El primer grupo (n=10) (grupo B en la Figura 3.3 de la sección 3.4.1.1.2) fue explorado desde el día tres post-implantación hasta la muerte de los animales, cada tres días, para tener un registro completo de la evolución de los tumores a lo largo del tiempo. En la Figura 4.9 podemos ver la curva promedio del crecimiento del volumen tumoral de dicho grupo durante todo el periodo de exploración comparada con la del grupo control, así como una imagen representativa de los tumores a día 10 post-implantación antes de iniciar el tratamiento. Según el ritmo individual de crecimiento de cada tumor (como se ha explicado

anteriormente) algunos animales fueron tratados el día 10 post-implantación y otros el día 12 o 13.

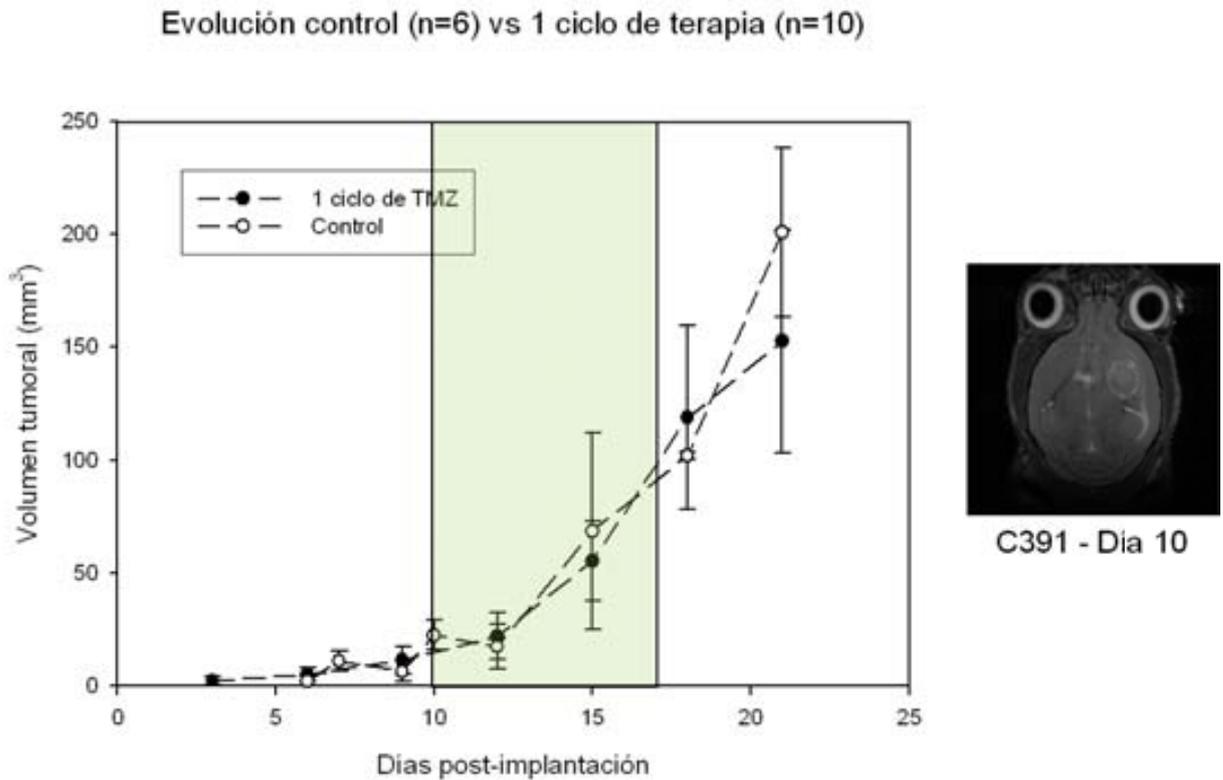


FIGURA 4.9: Curvas de evolución del crecimiento de tumores GL261 control (n=6, círculos blancos) y tratados con un ciclo de cinco dosis de TMZ (n=10, círculos negros). Los puntos del gráfico representan la media del volumen de los tumores en cada punto temporal de seguimiento (cada tres días a partir del día 6 post-implantación), y las barras verticales muestran la desviación estándar. El seguimiento terminó con el sacrificio/muerte de los animales. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. La barra verde vertical muestra la duración del ciclo de terapia, teniendo en cuenta que comenzó entre los días 10-13 según el caso, y la Figura de la derecha (T_{2w} HR) muestra el tamaño estándar de los tumores en ese punto temporal, antes del inicio del tratamiento.

El segundo y tercer grupo (n=6 y n=4) (grupos C y D respectivamente en la Figura 3.3 de la sección 3.4.1.1.2) fueron explorados en intervalos más amplios, aproximadamente cada 5 días, desde el inicio de la terapia hasta la muerte de los animales. El grupo de cuatro individuos (grupo D) mostró un crecimiento tumoral más lento que el resto de grupos estudiados y los

tumores alcanzaron el tamaño adecuado para terapia el día 20 post-implantación. En la Figura 4.10 se muestra la curva promedio de crecimiento tumoral para ambos grupos y el control. No se observan diferencias significativas en el volumen tumoral del grupo de seis animales respecto al control. Sin embargo, el volumen a día 20 y 25 post-implantación del grupo de cuatro animales tratados con un ciclo de TMZ fue significativamente menor ($p < 0,05$) que el del control a día 21 (no se compararon los días 29 y 34 porque sólo quedaba vivo un animal del grupo de tratados). Esto podría deberse a que, desde un inicio, en este grupo los tumores se desarrollaron a menor velocidad que la considerada estándar para los GL261 (grupo control). Una posible hipótesis a considerar sería que la suspensión celular utilizada en el protocolo de implantación en dichos tumores tuviese por alguna razón desconocida para nosotros un menor contenido en células madre que en las implantaciones normales, lo cual afectaría a la velocidad de expansión y crecimiento de las masas (128,129).

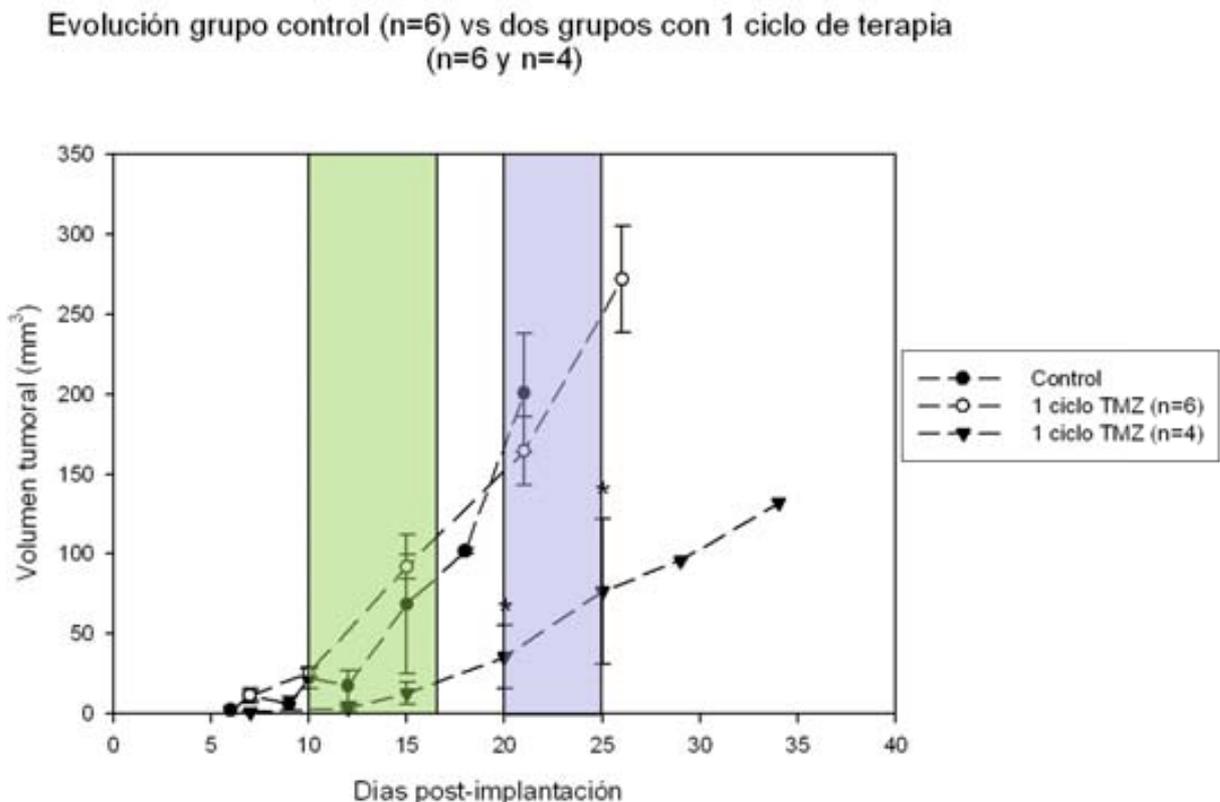


FIGURA 4.10: Curvas de crecimiento tumoral del grupo control (n=6, círculos negros) y dos grupos independientes tratados con un ciclo de TMZ (n=6, círculos blancos y n=4, triángulos negros,

respectivamente). Las barras verticales muestran la desviación estándar para cada punto de estudio en los tres grupos (en los puntos temporales a día 30 y 35 no aparecen porque sólo quedaba un animal vivo y en los puntos iniciales no se identifican bien porque quedan enmascaradas por los símbolos del gráfico). La barra vertical verde muestra el período de administración de terapia en el grupo de seis individuos, teniendo en cuenta que algunos animales iniciaron el ciclo el día 10 y otros el 12. La barra vertical azul muestra el período de tratamiento en el grupo de cuatro animales. El grupo de terapia de seis individuos siguió un comportamiento similar al control y no se observaron diferencias significativas entre ambos. Sin embargo el grupo tratado de cuatro animales siguió una evolución de crecimiento más lenta y mostró diferencias volumétricas respecto al control ((*) $p < 0,05$).

Se analizó la supervivencia de todos los animales tratados con el protocolo de un ciclo de TMZ ($n=26$) para comprobar si era diferente a la del grupo control. En dicho grupo se incluyeron los tres animales que se habían utilizado en las pruebas de tolerancia (descritas en el apartado anterior) y que recibieron 5 dosis de terapia, para aumentar el número de individuos y obtener resultados más representativos ($n=29$). La Figura 4.11 muestra las curvas Kaplan-Meier de ambos grupos. No se encontraron diferencias significativas, aunque sí tendencia a la significación ($p=0,053$).

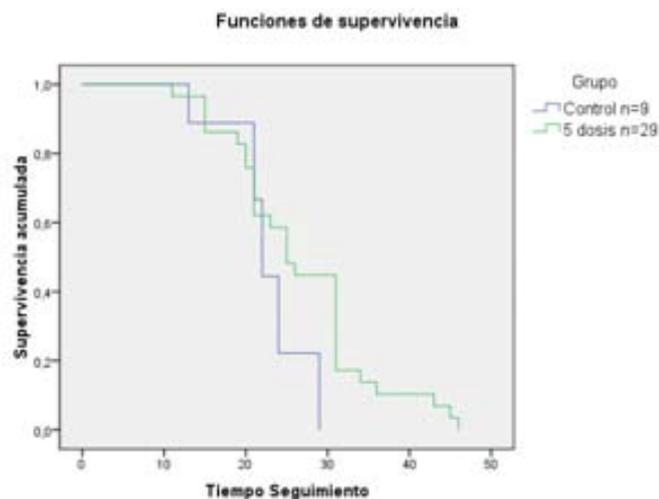


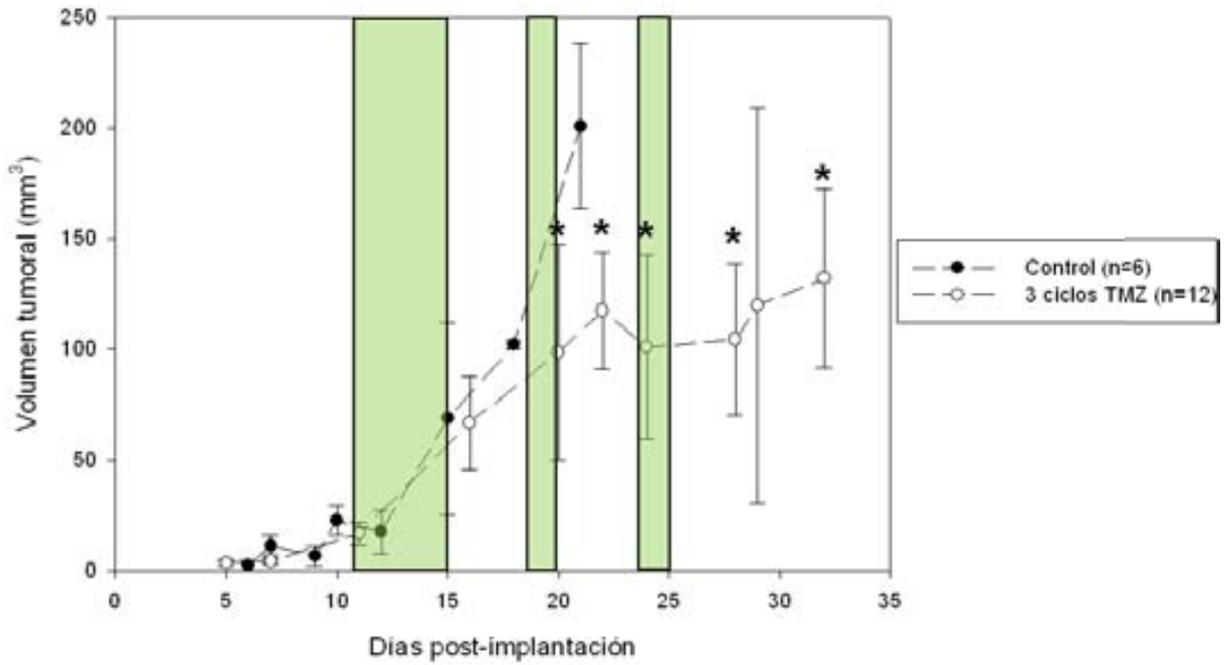
FIGURA 4.11: Curvas Kaplan-Meier de supervivencia para el grupo control (azul) y el de los animales tratados con un ciclo de TMZ (verde). No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos aunque sí tendencia a la significación ($p=0,053$).

Tres ciclos de terapia

El segundo protocolo de terapia con TMZ fue diseñado con 3 ciclos (109,110) distribuidos según lo descrito en la Figura 3.3 de Materiales y Métodos. El objetivo de este estudio era comprobar si al aumentar el número de dosis se podían apreciar cambios a nivel volumétrico en los GBM GL261 que no se pudieron detectar con el protocolo de un ciclo (excepto cuando se administraba TMZ a tiempos muy cortos post-implantación, dos días), además de observar posibles mejoras a nivel de supervivencia.

Un total de 12 animales distribuidos en dos grupos (n=6) fueron implantados a tiempos distintos y tratados según este protocolo. En ambos casos la terapia comenzó a administrarse el día 11 post-implantación (tumores con volumen apropiado para los estudios ERM SV) y los animales fueron explorados cada 4-5 días hasta su muerte/sacrificio. En la Figura 4.12 se muestra la curva de supervivencia conjunta de ambos grupos y la comparación con la curva control. Los animales tratados vivieron significativamente más días ($33,83 \pm 2,50$ (SEM)) que los controles ($22,77 \pm 1,59$ (SEM)) ($p < 0,05$). En la Figura 4.12 se puede observar también la curva promedio de crecimiento tumoral para cada grupo. Desde el inicio y hasta después del primer ciclo el patrón fue similar al observado anteriormente para los animales control y tratados con un ciclo. Sin embargo, al finalizar el segundo ciclo y hasta después del tercero, se observó una ralentización del crecimiento de los tumores a nivel volumétrico en forma de “meseta” hasta que recidivaron. El volumen tumoral a días 20, 22, 24, 28 y 32 post-inoculación resultó ser significativamente menor que el del grupo control a día 21 post-inoculación ($p < 0,05$). En la Figura 4.13 puede observarse el crecimiento individual de los doce tumores incluidos en este estudio.

Evolución grupo control (n=6) vs grupo con tres ciclos de TMZ (n=12)



Funciones de supervivencia

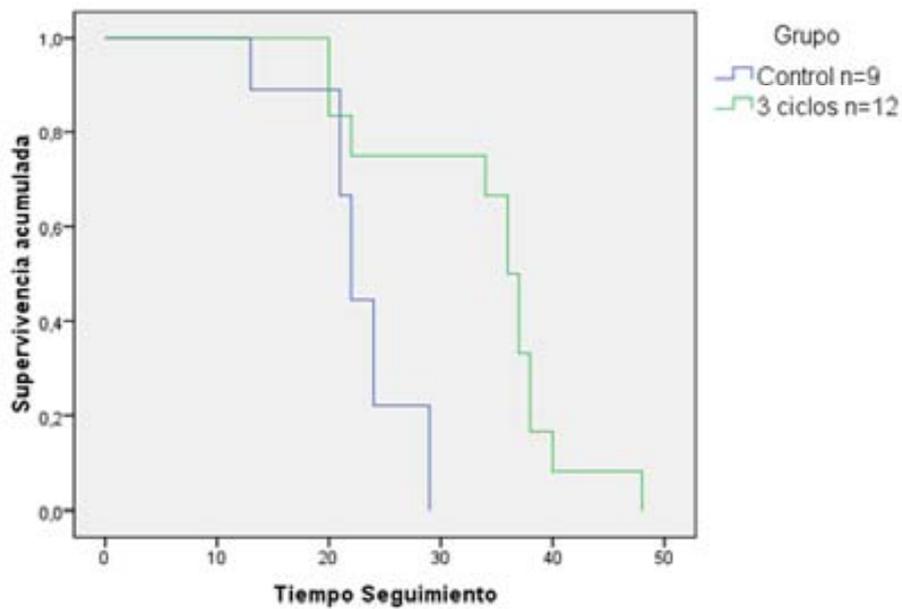


FIGURA 4.12: En la parte superior puede verse el gráfico correspondiente a la evolución tumoral de los animales del grupo control (n=6, círculos negros) y de los tratados con tres ciclos de TMZ (n=12, círculos blancos). Los animales tratados vivieron más que los controles, por lo que pudieron ser explorados durante más tiempo, demostrando que tras el segundo ciclo de terapia los tumores GL261 sufren una

ralentización en el crecimiento detectable a nivel volumétrico. La duración de los ciclos está señalada por las barras verdes verticales y los puntos temporales en los que el volumen del grupo tratado resultó significativamente diferente al del grupo control a día 21 están indicados por un asterisco (*). En la parte inferior se muestra la curva de supervivencia de ambos grupos. El grupo de animales tratados sobrevivió significativamente más que el control ($p < 0,05$).

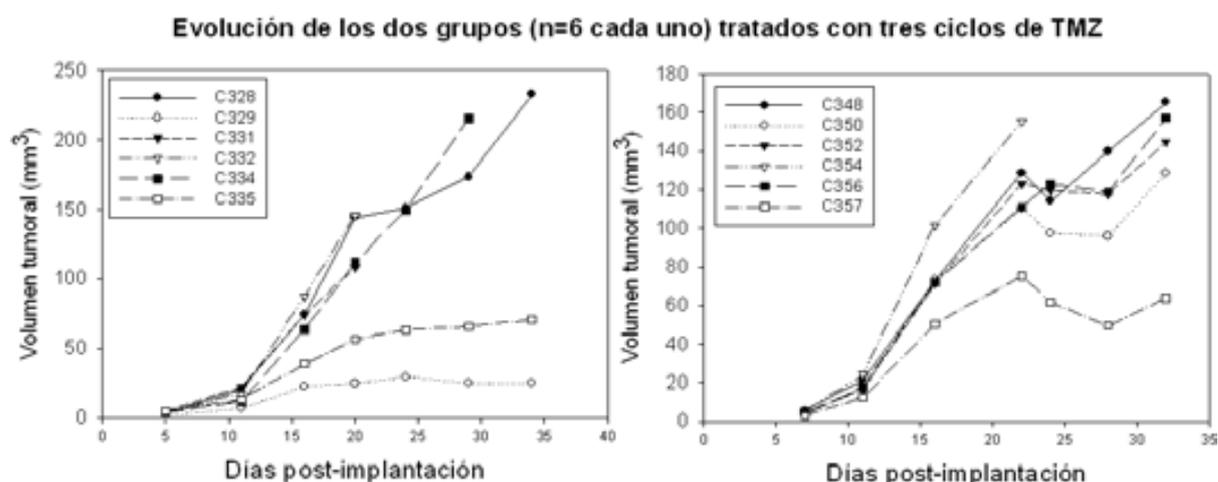


FIGURA 4.13: Evolución tumoral de los dos grupos de animales tratados con tres ciclos de TMZ (n=6 cada grupo). En los gráficos se observa el crecimiento del tumor en cada uno de los individuos por separado, lo cual muestra la variabilidad de las curvas de crecimiento y de la respuesta volumétrica al tratamiento en cada individuo.

Un caso especial a destacar en este protocolo es el del animal C355, que quedó fuera del estudio anterior por no ajustarse a la evolución de los demás animales investigados (n=12) (Figura 4.14). Este ratón fue implantado con el mismo pase de células que uno de los dos grupos que recibieron tres ciclos de terapia con TMZ. La evolución del tumor fue más lenta que en el resto del grupo y el tamaño mínimo para iniciar el tratamiento se alcanzó el día 24 post-inoculación. El animal recibió tres ciclos de terapia a partir de entonces según el esquema de la Figura 3.3, pero con el día 24 como día de inicio del primer ciclo. El día 61 de evolución se observó una desaparición completa de la masa anómala, que no recidivó en ningún momento.

El animal murió el 13 de Septiembre de 2011 en el *Servei d'Estabulari* de la *Universitat Autònoma de Barcelona* con una edad de 2 años y 5 meses.

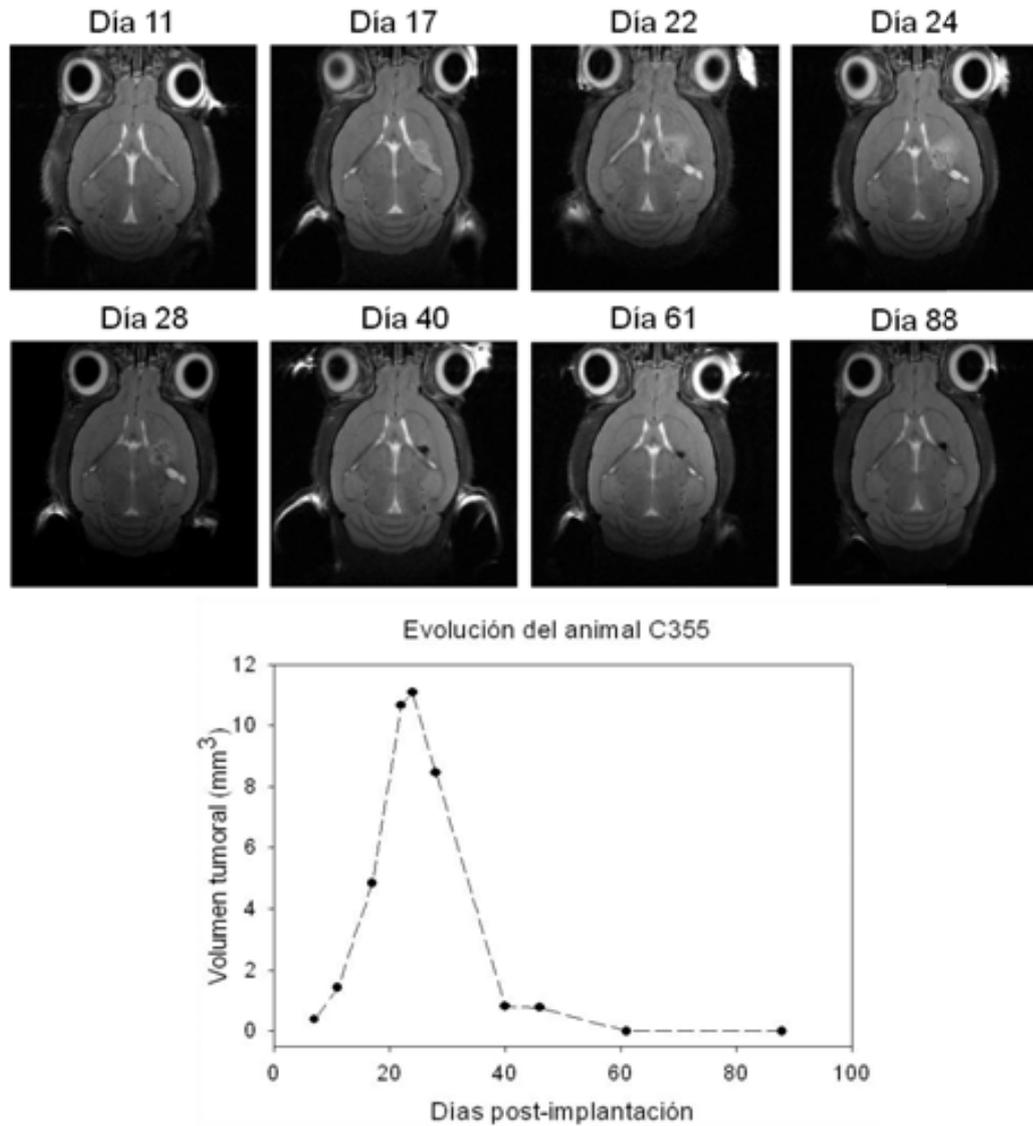


FIGURA 4.14: En la parte superior se muestran las imágenes (T_{2w} , alta resolución) de la progresión del tumor del animal C355, desde el día 11 post-implantación hasta su completa desaparición. En la parte inferior se representa el gráfico con las medidas del volumen de dicho tumor desde el día 7 post-inoculación hasta el día 88.

4.2.1.2 b) TEMOZOLOMIDA Y METFORMINA

Un total de seis ratones C57BL/6 fueron inoculadas con células GL261 y exploradas por IRM el día siete post-implantación, para comprobar la evolución de los tumores. El día diez post-implantación volvieron a ser exploradas y comenzaron el tratamiento con TMZ y metformina, administradas de manera conjunta según el protocolo descrito en Materiales y Métodos sección 3.4.1.2. La Figura 4.15 muestra la evolución del crecimiento tumoral en diferentes puntos temporales y la curva de supervivencia de este grupo de animales respecto al grupo control. No se encontraron diferencias significativas al comparar la supervivencia de ambos grupos, de hecho todos los animales menos unos murieron al terminar el primer ciclo de terapia. El único que completó los tres ciclos de TMZ y Metformina no mostró cambios cualitativos en la evolución respecto a los animales tratados sólo con TMZ; es decir, se detectó una ralentización del crecimiento del tumor entre el segundo y tercer ciclo y la recidiva al final del tratamiento.

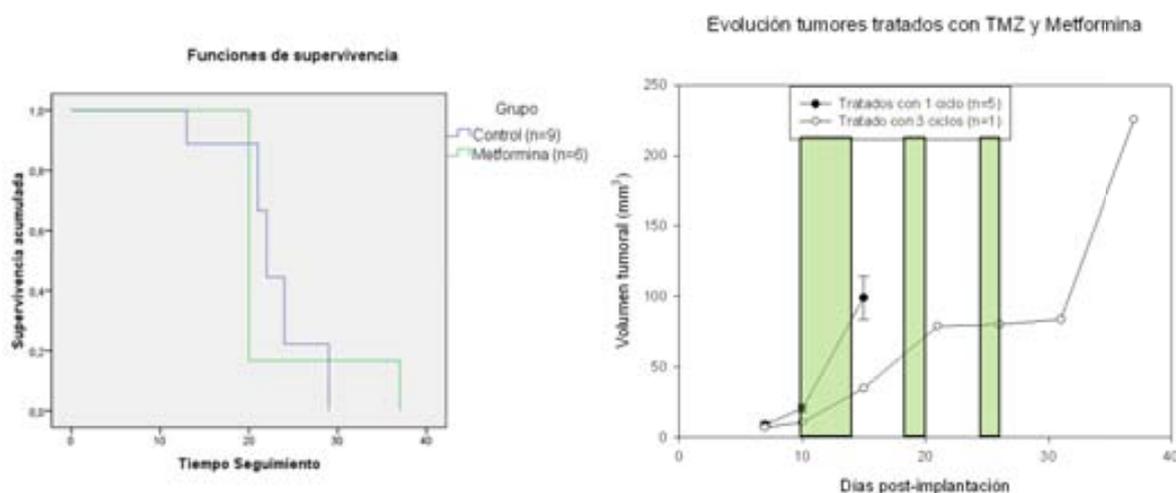


FIGURA 4.15: A la izquierda, gráfico de supervivencia del grupo control (n=9, azul) y del grupo de animales tratados con la combinación de TMZ y Metformina (n=6, verde). No se observaron diferencias significativas. A la derecha, gráfico de la evolución de los tumores tratados. Los círculos negros representan la media del volumen de cinco de los animales del grupo, los cuales mostraron una evolución similar (las barras verticales representan la desviación estándar). Los círculos blancos

representan el crecimiento del tumor del único animal que sobrevivió a los tres ciclos de terapia, cuya evolución fue similar a la de los tumores tratados con tres ciclos de TMZ.

4.2.1.2 c) DICLORACETATO

Se utilizaron seis ratones C57BL/6 a las que se indujeron tumores GL261 de la manera estándar. Dichos animales fueron explorados por IRM el día 5 post-implantación para controlar el crecimiento de los mismos. La solución de DCA (ver materiales y métodos, 3.4.1.3) les fue administrada desde el día de la implantación hasta el día de sacrificio/muerte. El objetivo de este primer estudio con DCA era comprobar si el fármaco aumentaba la supervivencia del grupo significativamente respecto al grupo control. Ningún animal sobrevivió más de 20 días post-inoculación, por lo que la tasa media de supervivencia (19,6 días \pm 0,3 (SEM)) fue significativamente menor que la del grupo control (22,7 días \pm 1,6 (SEM)) ($p < 0,05$; Figura 4.16).

4.2.1.2 d) MINERVAL

Este fármaco fue testado en primer lugar para comprobar sus efectos a nivel de supervivencia en animales afectados por tumores GL261. En caso de aumentar significativamente el tiempo de vida del grupo tratado se procedería a realizar estudios longitudinales con secuencias de IRM y ERM para describir la curva de crecimiento de los tumores tratados y los efectos del agente a nivel volumétrico y metabólico. Seis animales C57BL/6 con tumores GL261 inducidos de la manera estándar fueron tratados a partir del día 11 post-implantación con administración diaria del fármaco hasta el final del experimento. Como se ve en la curva de supervivencia de la Figura 4.16, los animales del grupo control sobrevivieron significativamente más que los tratados (22,7 días \pm 1,6 (SEM)), ya que estos

últimos se vieron seriamente afectados por la administración del tratamiento, sufriendo pérdidas visibles de peso (supervivencia media: 17,5 días \pm 0,6 (SEM)).

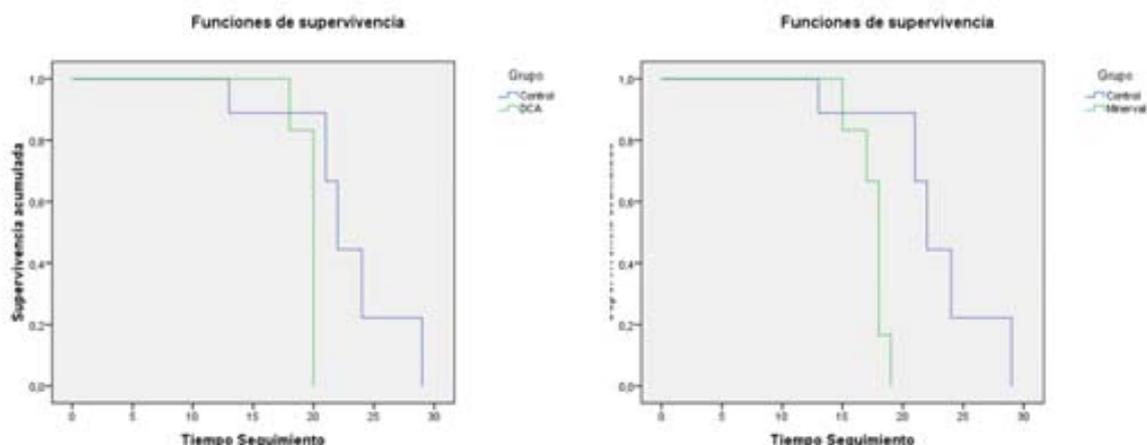


FIGURA 4.16: A la izquierda, curvas Kaplan-Meier de supervivencia de animales GL261 control (n=9, azul) y tratados con DCA (n=6, verde). A la derecha la misma curva del control se compara con la de los animales tratados con Minerval (n=6). En ambos casos el grupo control sobrevivió significativamente más que los tratados.

4.2.1.3 Respuesta a la terapia: Cambios en el patrón espectroscópico

Tras analizar los efectos de los distintos agentes terapéuticos en la supervivencia y crecimiento tumoral de los animales tratados, se llegó a la conclusión de que el fármaco más efectivo en nuestro caso para tratar los tumores GL261 era la TMZ. Una vez caracterizados los efectos de dicho agente sobre la cinética de crecimiento de los tumores y sobre la supervivencia de los animales, se procedió a investigar la existencia de posible diferencias en el patrón espectral de los tumores antes y después de terapia, considerando los dos protocolos utilizados para la administración de TMZ (uno y tres ciclos). En la Figura 4.17 se muestran los espectros SV promedio a TEC y TEL de los grupos tratados con uno y tres ciclos antes (día de

inicio del tratamiento) y después de terapia, lo cual significa tras el primer y único ciclo en el primer caso (días 15, 18 y 25 post-implantación) y en la fase de crecimiento estacionario (“meseta”) en el segundo (días 24-28 post-implantación). Los días exactos post-terapia escogidos para cada rarón dependen del momento en que los animales iniciaron el tratamiento (ver apartado 4.2.1.2 a de esta sección). Además el número de espectros en dicho grupo fue menor que en los grupos pre-tratamiento debido a que algunos animales habían muerto ya y a la mala calidad de algún espectro (mala homogeneidad de la señal), que no permitía valorarlo correctamente. Los espectros representativos de un tumor GL261 pre-terapia y post-terapia en la fase de meseta después de recibir tres ciclos de TMZ se muestran en la Figura 4.18.

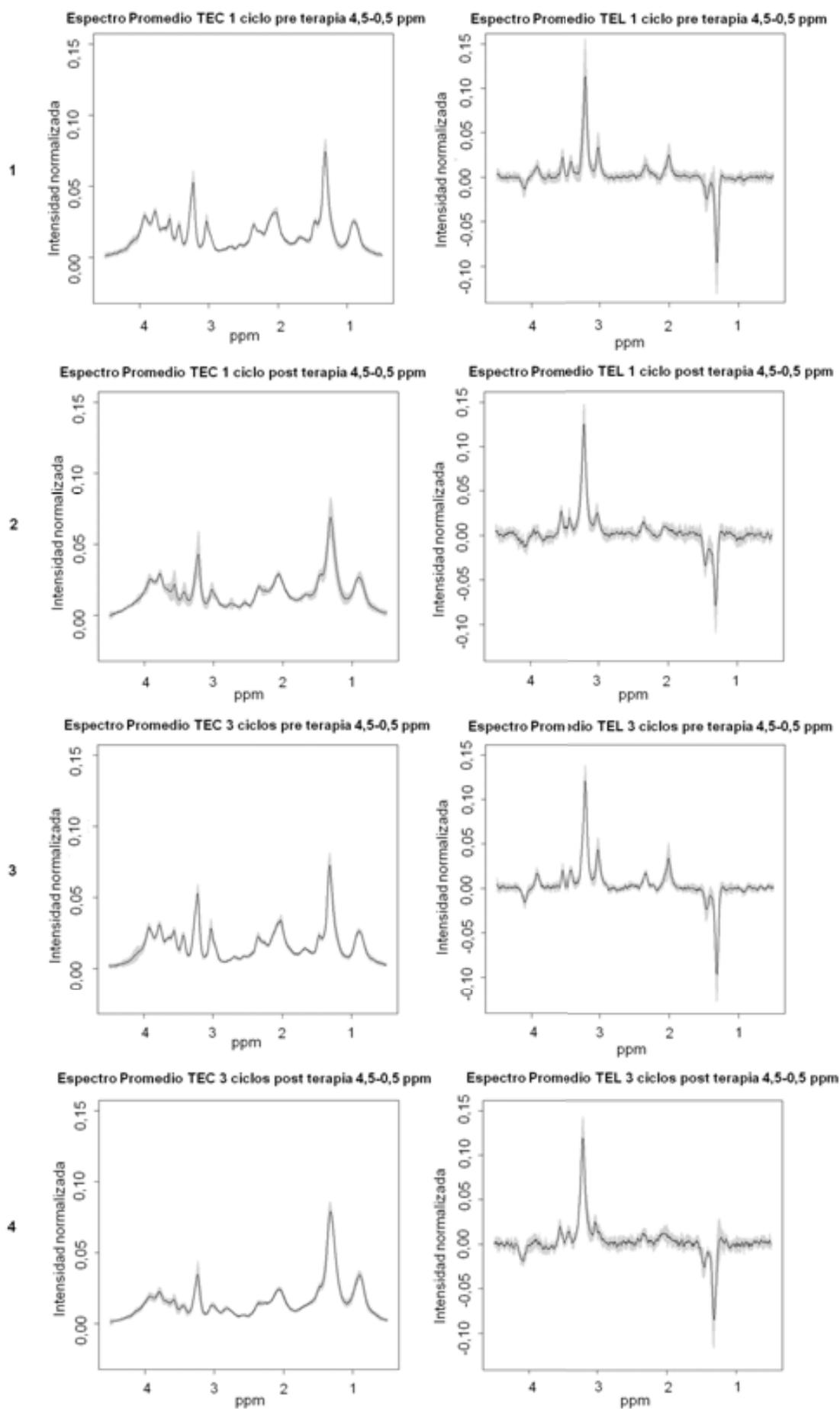


FIGURA 4.17: La columna de la izquierda muestra los espectros promedio a TEC (0,5 - 4,5 ppm) pre y post-terapia de los animales tratados con 1 ciclo (espectros en las filas 1 (n=19) y 2 (n=12) respectivamente) y con tres ciclos de TMZ (espectros en las filas 3 (n=12) y 4 (n=9) respectivamente). En la columna de la derecha se muestran los espectros promedio (0,5 - 4,5 ppm) equivalentes a las situaciones y grupos de la columna izquierda pero adquiridos a TEL (espectros 1 y 2 para un grupo de terapia (n=19 y n=11 respectivamente) y espectros 3 y 4 para el grupo de tres ciclos (n=12 y n=9 respectivamente)). La intensidad promedio tras normalización UL2 en cada ppm en el rango seleccionado se representa con una línea negra que da forma al espectro promedio y la desviación estándar (\pm SD) para cada punto se muestra coloreada en gris.

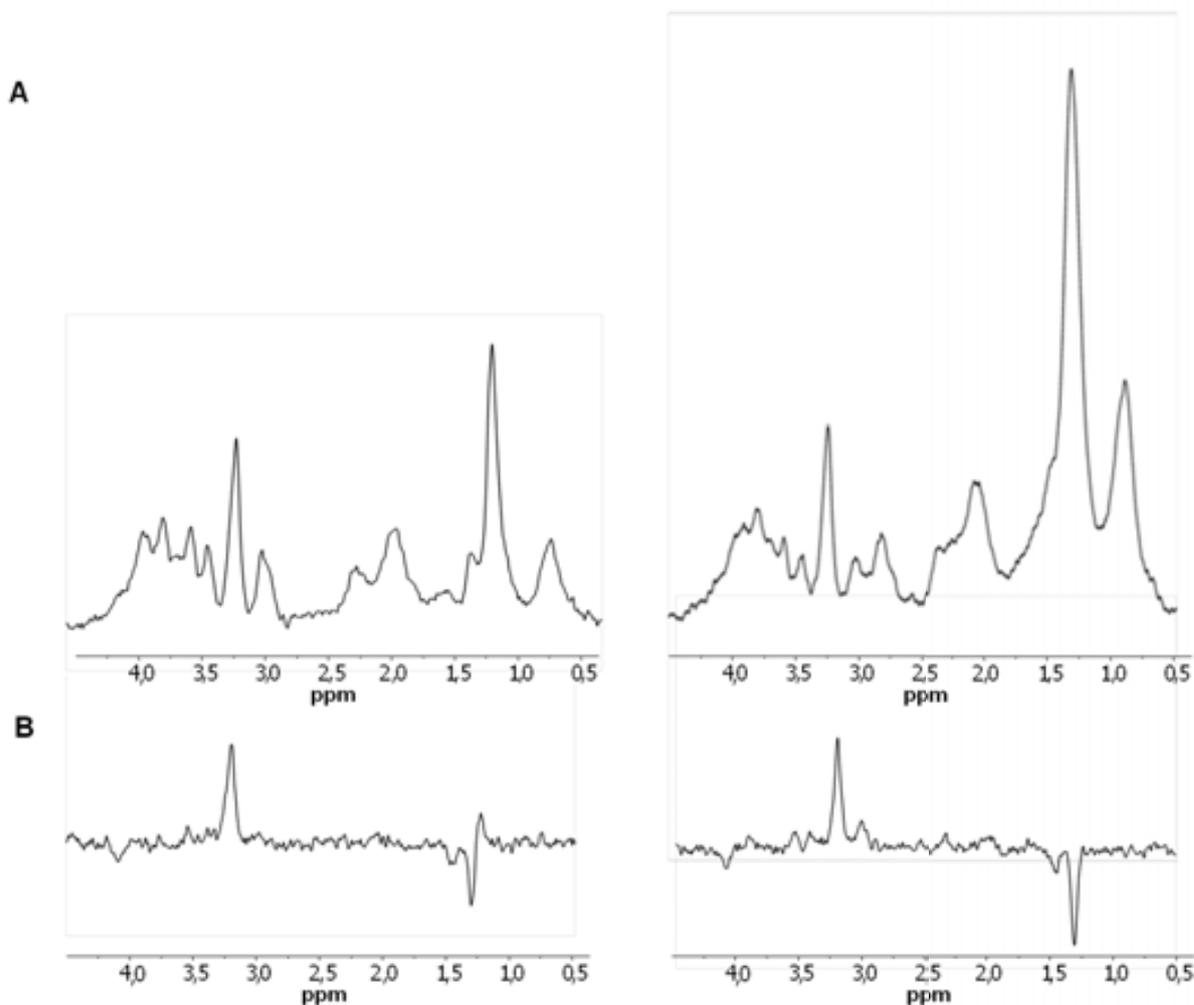


FIGURA 4.18: Espectros representativos de un tumor GL261 (C356) pre-terapia (día 11 post-implantación, columna izquierda) y post-terapia en la fase de meseta después de recibir tres ciclos de TMZ (día 28 post-implantación, columna derecha). En **A**) se representan los espectros adquiridos a TEC (12 ms) y en **B**) los adquiridos a TEL (136 ms). A primera vista pueden visualizarse las diferencias pre y

post terapia que serán analizadas en la Figura 4.19: resonancias de colina (3,21 ppm), ML (1,30 ppm) y AML (2,78 ppm) respecto a creatina a TEC y resonancias de alanina, glicina y taurina respecto a lactato y colina respecto a creatina a TEL. Ambos TE están escalados respecto a la intensidad de la señal de colina a 3,21 ppm.

Los espectros SV fueron divididos para un procesamiento adicional en tres grupos: Pre-terapia, post-terapia con un ciclo de TMZ y post-terapia con tres ciclos de TMZ para los dos TE (12 y 136 ms). En el caso de los espectros a TEC, se compararon los cocientes de colina/creatina, lípidos móviles a 1,30 ppm (ML)/creatina y lípidos móviles apoptóticos (AML) (2,78 ppm) /creatina entre los tres grupos. En el caso de los espectros a TEL, se compararon los cocientes colina/creatina, lactato/taurina, lactato/glicina y lactato/alanina. Se detectaron diferencias significativas post-tratamiento respecto al momento pre-terapia que se resumen en la Figura 4.19.

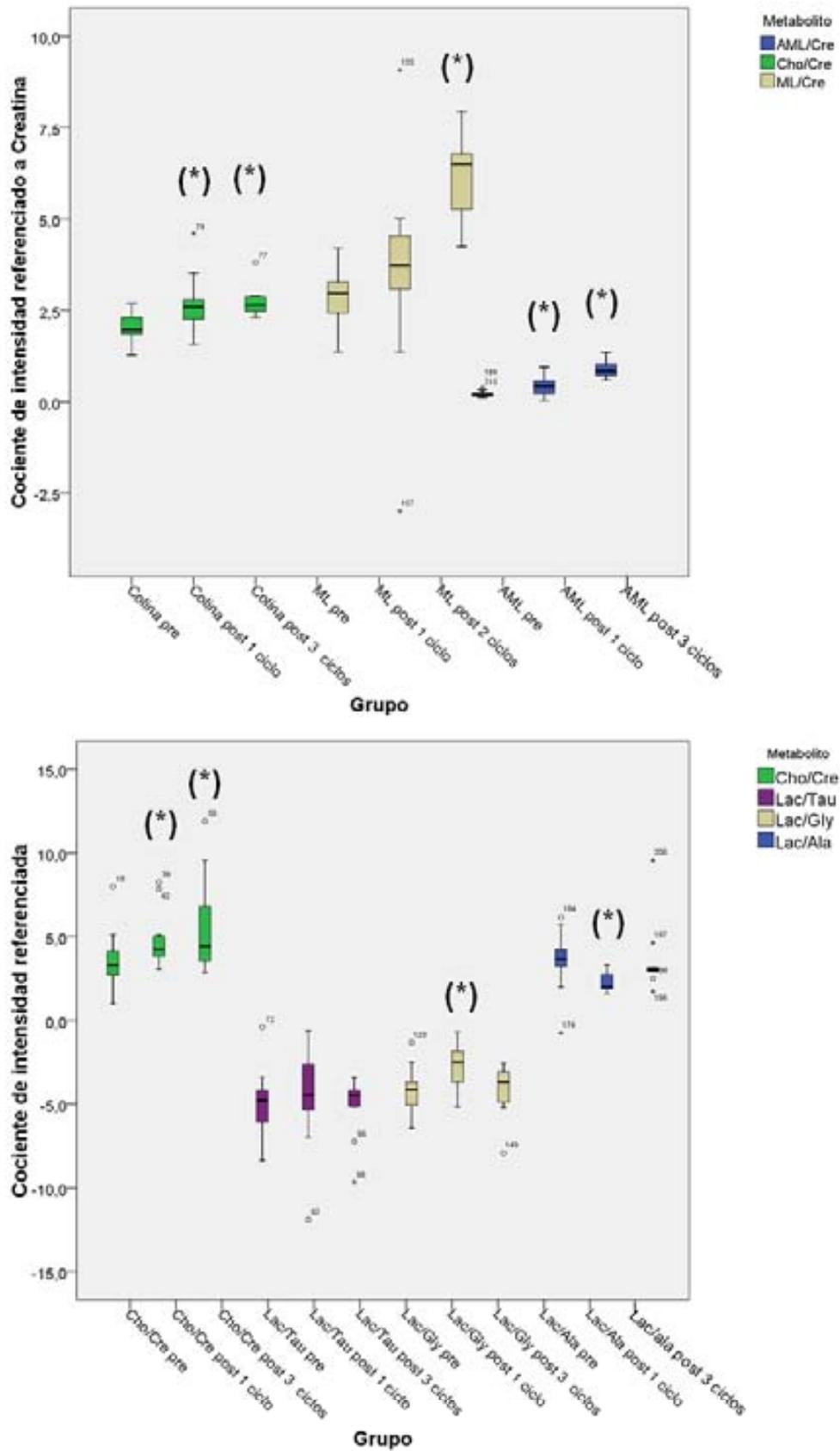


FIGURA 4.19: Box-plots de los cocientes de alturas normalizadas calculados para los máximos de las resonancias de interés en espectros SV de tumores tratados con uno y tres ciclos de TMZ, antes y

después del tratamiento. Los límites superior e inferior de la caja representan los cuartiles 1 y 3 de cada distribución de datos respectivamente y la franja central el cuartil 2 o mediana. Las barras superior e inferior en cada caja muestran la posición de los valores máximo y mínimo de la distribución. Los círculos abiertos representan los valores *outliers*. Para determinarlos se multiplica 1,5 por la distancia entre los cuartiles 1 y 3 (rango intercuartílico) y el valor resultante se suma al cuartil 3 y se resta al cuartil 1. Los números que sobrepasen los valores obtenidos serán considerados *outliers*. Los asteriscos representan los *extreme outliers* que se calculan de la misma manera que los *outliers* pero multiplicando el rango intercuartílico por 3 en lugar de 1,5. En la parte superior se muestran los resultados correspondientes a los espectros adquiridos a TEC. (*) Se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el cociente colina/creatina y en el cociente AML/creatina antes y después del tratamiento con uno y tres ciclos, y en el cociente ML/creatina en el caso de tres ciclos de terapia. En la parte inferior se muestran las diferencias detectadas en los espectros adquiridos a TEL. (*) se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el cociente colina/creatina al comparar los momentos pre y post-terapia con uno y tres ciclos. Los cocientes lactato/alanina y lactato/glicina fueron significativamente diferentes después de un ciclo de TMZ.

4.2.1.4 Discusión de los resultados obtenidos con terapia en el modelo de GBM murino

Ante los resultados obtenidos en este apartado, se concluyó que el único agente de los estudiados que producía respuesta a terapia detectable por IRM y ERM en los GBM murinos de células GL261 era la TMZ, provocando un estado de crecimiento estacionario tras el segundo y tercer ciclo de terapia, además de producir cambios detectables en el patrón espectral de dichos tumores y por lo tanto en su metabolómica *in vivo*.

El resto de agentes no resultaron efectivos a nivel de supervivencia y de detección de respuesta por IRM, aunque serían necesarios más estudios con distintas dosis y protocolos de administración para obtener conclusiones definitivas. Conociendo los efectos de la TMZ sobre el crecimiento tumoral, podría ser interesante diseñar protocolos de terapia con DCA y Minerval combinados con dicho fármaco para comprobar si existe algún efecto sinérgico no detectable

en nuestro caso cuando los compuestos se administran por separado. Por ejemplo, Zhu et al., Yamini et al. y Tentori et al. (75,130,131) han demostrado en diferentes trabajos que la TMZ ejerce un efecto más eficaz en la supervivencia de los animales tratados cuando está combinada con otros agentes terapéuticos como anticuerpos contra la quimiocina CCL2, radioterapia, TNF- α o inhibidores de la poli-ADP ribosa polimerasa.

En el caso de la supervivencia, otros autores han obtenido resultados similares a los nuestros utilizando TMZ en modelos animales de linfoma cerebral o glioma (111,132). La evolución estándar de los tumores depende de la línea celular utilizada en cada caso y la supervivencia promedio del grupo control puede variar, lo cual debe ser tenido en cuenta al evaluar el efecto de la terapia sobre la supervivencia del grupo tratado. En general puede observarse que la TMZ por si sola consigue prolongar la vida de los animales afectados una media aproximada de 20 días respecto al grupo control en cada caso. Además, cuando se aplica la TMZ a dosis altas pero en un solo ciclo de corta duración el efecto sobre la supervivencia no es significativo (130).

La fase de ralentización del crecimiento tumoral detectada en nuestro protocolo de tres ciclos de terapia podría compararse con lo descrito anteriormente por Kato et al (110) y Houghton et al en estudios con modelos *xenograft* de GBM y carcinoma (109), aunque en estos casos el efecto es más remarcable a nivel volumétrico, bien porque los modelos *xenograft* evolucionan más lentamente que los *allograft* o bien porque los tumores eran implantados de manera subcutánea, lo cual ralentiza su evolución (110). El índice de ki67 detectado en nuestro grupo en tumores GL261 es de aproximadamente un 40%-60% (133) en comparación con el descrito para nude mice, que es del 12% (134). Estos datos podrían explicar el hecho de que nuestros tumores proliferen más rápidamente.

Otros autores han demostrado que la IRM por si sola no es capaz de detectar cambios tempranos debido a respuesta a la terapia como los detectados por ERM (135-137). En nuestro caso es cierto que tras un ciclo de terapia no se detectan cambios significativos a nivel

volumétrico en los tumores pero sí se observan diferencias metabólicas: aumento de los cocientes AML/creatina, colina/creatina y ML/creatina. Según algunos autores, el uso de la creatina como referencia interna tiene sus limitaciones, porque se ve reducida por la propia evolución del tumor y algunos cambios a nivel de metabolitos individuales pueden difuminarse debido a ello (138). Además la colina a 3,21 ppm para medir cambios por ejemplo debidos a apoptosis tampoco es el parámetro idóneo debido a que otros metabolitos contribuyen a esta señal (139). Sin embargo, las señales correspondientes a ML y AML son muy sensibles y buenos marcadores para detectar cambios metabólicos debidos a terapia, aumentando significativamente en casos de apoptosis (135). Las diferencias detectadas en nuestro modelo encajarían con esta última afirmación, por lo que sería interesante comprobar si los cambios registrados servirían para discriminar tumores respondedores y no respondedores a tratamiento en un sistema de clasificación automatizado (ver sección 4.3.2.2).

Una vez caracterizados por ERM los cambios generados por la TMZ en los tumores GL261, sería interesante en futuros experimentos variar el punto de inicio de la terapia adelantándolo a estadios más cercanos al punto de implantación, de manera que los tumores entrasen en la fase estacionaria transitoria con volúmenes más pequeños, según lo descrito para los animales inoculados tratados con TMZ a dos días post-implantación. Como se ha expuesto en la Figura 4.7, los tumores tratados con el protocolo de tres ciclos a día dos de evolución mostraban una clara ralentización en el crecimiento detectable a día 15, lo que permitiría realizar un batería de pruebas diferentes (difusión, perfusión, IERM etc.) para detectar la respuesta a terapia en un momento en el que la salud de los animales no estuviese demasiado comprometida y quizás cabría la posibilidad de observar efectos en la supervivencia a más largo término. La idea general consistiría en optimizar el punto temporal de respuesta a TMZ para poder tener un mayor margen de actuación y poder así evaluar diferentes marcadores moleculares de respuesta temprana para escoger el más eficaz. Además, podrían intentar añadirse más ciclos de TMZ o terapia combinada en un intento de reducir el volumen tumoral en lo posible (110), cosa que requeriría tumores más pequeños de partida, ya que los GBM GL261 muestran un

crecimiento exponencial devastador en comparación con otros tipos de glioma, como los C6 de rata (138) y una vez que alcanzan un tamaño similar al utilizado como referencia para iniciar el tratamiento en este trabajo es muy difícil conseguir que reduzcan su volumen. En nuestro caso, el hecho de haber comenzado los estudios con tumores más grandes, nos ha permitido caracterizar por ERM e IERM el cambio de patrón debido a la respuesta transitoria a la terapia, por lo que ya no sería necesario partir de volúmenes tan grandes en el futuro.

Cabe destacar el fenómeno observado con los animales del grupo de cuatro animales tratados con un solo ciclo de TMZ. En todos ellos los tumores fueron inducidos de la misma manera que en el resto de animales y si embargo el crecimiento y evolución fueron considerablemente más lentos a lo largo del tiempo.

Este hecho podría deberse a que el volumen de inyección utilizado durante el proceso de implantación, por alguna razón desconocida, contuviese un menor número de células madre (GICs) que en condiciones normales. En ese caso el crecimiento de los tumores se vería comprometido, teniendo en cuenta que las GICs juegan un papel muy importante en el desarrollo tumoral (92). Además, las GICs han sido caracterizadas como el origen de la resistencia a la quimioterapia (93), lo que podría explicar que en el caso del ratón C355 el tumor desapareciese totalmente tras los tres ciclos de TMZ, si supusiéramos que, por alguna razón desconocida, era un tumor con muy bajo nivel de GICs.

En resumen, el protocolo diseñado en este trabajo ha resultado eficaz para obtener respuesta a terapia detectable tanto desde el punto de vista de la ralentización del crecimiento tumoral como del aumento de la supervivencia media de los animales investigados en el modelo de GBM murino utilizado. Además, ha permitido detectar cambios debidos a respuesta a terapia en el metaboloma tumoral utilizando técnicas no invasivas como la IRM y la ERM.

4.2.2. MODELO XENOGRAFT DE GBM HUMANO

4.2.2.1 Estudio de crecimiento de las muestras de GBM humano en animales *Swiss nude*

Dos animales *Swiss nude* fueron inoculados con células procedentes de una muestra de GBM humano definido por el grupo clínico responsable del caso como no respondedor a tratamiento con TMZ, según lo descrito en la sección 3.3.2. Dichos animales fueron explorados por IRM (T_{2w} -HR) cada siete días desde la inoculación para tener un registro de la evolución tumoral y del momento en el que los tumores tenían un tamaño suficiente para adquirir un espectro SV de $(2,5 \text{ mm})^3$ en su interior y poder así comenzar con el protocolo de terapia descrito en la sección 3.4.1.1.2. En este estudio ambos animales llegaron al día ideal para inicio del protocolo con TMZ los días 28 y 35 post-implantación respectivamente (Figura 4.20). En dicho punto temporal se adquirió un espectro SV del tumor y se llevó a cabo un estudio pre y post-inyección de Gd-DTPA i.p. para comprobar que los tumores tenían el patrón característico de GBM (grado IV).

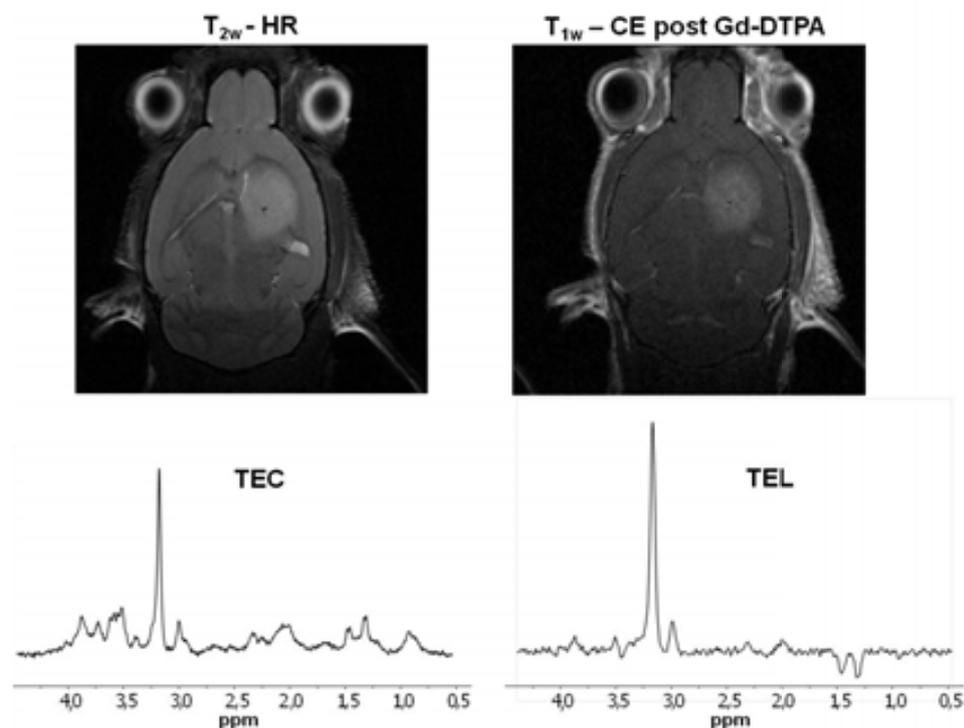


FIGURA 4.20: En la fila superior a la izquierda se muestra una imagen ponderada en T_2 de alta resolución de uno de los *nude* (*Nude* 1) inoculados con células de una biopsia de GBM humano no

respondedor a TMZ a día 35 post-implantación. A su derecha se puede observar una imagen T_{1w} del mismo animal en el mismo día de exploración 20 minutos después de una inyección i.p. de Gd-DTPA. Todo el tumor muestra captación homogénea de contraste. En la parte inferior se muestran los espectros a TEC (izquierda) y TEL (derecha) del mismo tumor entre 0,5 y 4,5 ppm.

4.2.2.2 Respuesta a la terapia: Efectos en el crecimiento tumoral y la supervivencia.

Veinte animales *Swiss nude* fueron inoculados con células procedentes de una muestra de GBM humano del grupo de pacientes clasificados como no respondedores al tratamiento con TMZ, según lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Diez animales fueron explorados periódicamente por IRM hasta que los tumores alcanzaron un tamaño adecuado para realizar estudios por ERM (entre los días 32 y 42 post-implantación). En ese momento, cinco de los ratones fueron tratados con sólo un ciclo de TMZ como el descrito para los GL261 en la sección 3.4.1.1.2, y los otros cinco recibieron el vehículo de administración (DMSO 10% en suero fisiológico) durante el mismo tiempo. La evolución del crecimiento tumoral se siguió periódicamente cada 7 días aproximadamente (Figura 4.21). El número de individuos en ambos grupos se vio reducido a cuatro debido a que dos animales murieron por infección respiratoria y no pudieron ser estudiados a lo largo del tiempo.

Los otros 10 animales también fueron distribuidos equitativamente en un grupo control y otro con tratamiento, pero no fueron explorados por RMN. Los animales no explorados empezaron a recibir la TMZ o el vehículo en el momento en que el primer animal del grupo de los explorados mostró un tumor de tamaño aceptable para ser tratado. La supervivencia se evaluó sobre el conjunto de 20 animales una vez finalizado el estudio (Figura 4.22), resultando significativamente mayor ($p < 0,05$) en el grupo que recibió TMZ (61,5 días \pm 2,6 (SEM)) respecto al que recibió sólo el vehículo de administración (51 días \pm 2,6 (SEM)).

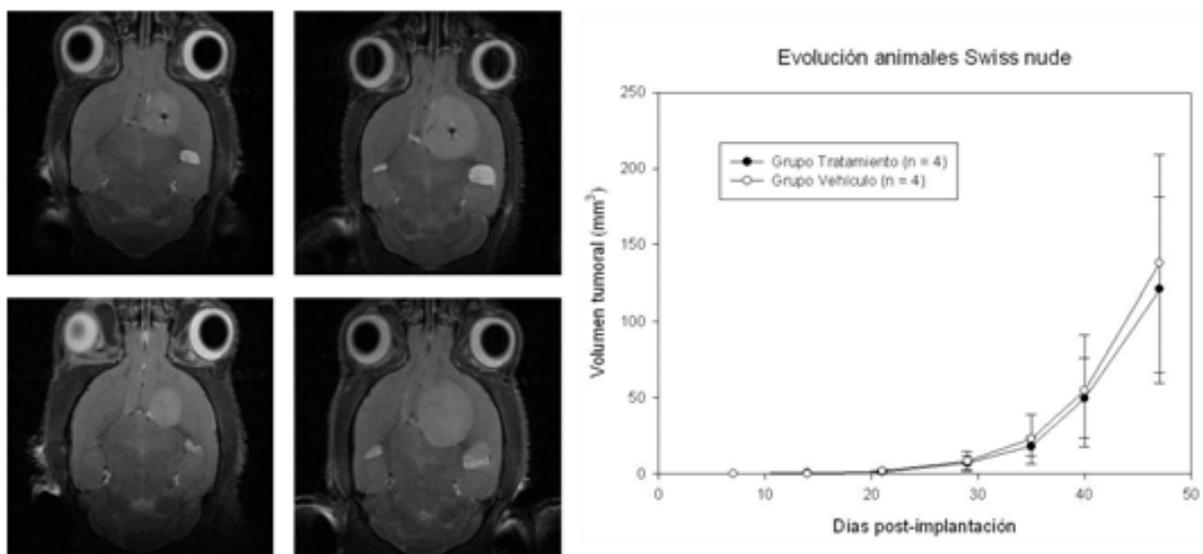


FIGURA 4.21: A la izquierda se muestran imágenes de alta resolución ponderadas en T_2 de un animal *Swiss nude* tratado con TMZ (fila superior, *Nude 1*) y otro tratado únicamente con el vehículo de administración (fila inferior, *Nude 9*) antes y después del tratamiento (de izquierda a derecha). A la derecha están representadas las curvas promedio de crecimiento tumoral para el grupo tratado con TMZ y el que solo recibió el vehículo. No hubo diferencias significativas entre los volúmenes de ambos grupos.

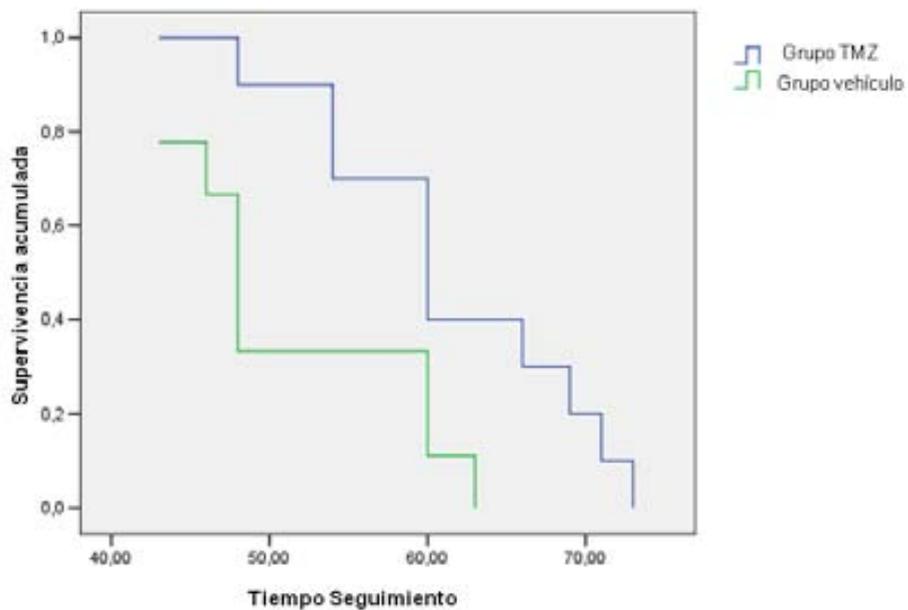


FIGURA 4.22: Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de los animales *Swiss nude* tratados con TMZ y de los tratados con el vehículo. El grupo que recibió TMZ sobrevivió significativamente más ($p < 0,05$). Todos los animales sobrevivieron sin complicaciones hasta el día 40, que aproximadamente cuando los tumores alcanzaron el tamaño deseado para iniciar el tratamiento, por eso la supervivencia se representa a partir de este punto temporal.

4.2.2.3 Respuesta a la terapia: Estudio del patrón obtenido por IERM en animales inoculados con muestras respondedoras y no respondedoras a TMZ.

Diez animales *Swiss nude* fueron utilizados en este estudio, cinco inoculados con una muestra de paciente no respondedor a terapia con TMZ y cinco con una muestra respondedora. Todos los animales fueron explorados periódicamente por IRM cada siete días hasta que los tumores alcanzaron un tamaño adecuado para realizar estudios por ERM (días 21-90 post-implantación en el caso de la muestra no respondedora y días 150 y 180 en dos casos de la muestra respondedora). En ese momento se realizó un estudio de IERM a TEC (12ms) y TEL (136ms) en cada animal y se inició el protocolo de terapia con un ciclo de TMZ

(Figura 4.23). A partir de ese momento los animales sólo fueron estudiados a nivel de supervivencia.

Dos de los animales inoculados con la muestra respondedora murieron a causa de una infección respiratoria antes de desarrollar un tumor de volumen adecuado y otro murió a causa de una infección hepática complicada con ascitis, por lo que no pudieron ser incluidos en el estudio de supervivencia. Además hubo otro animal dentro de este grupo que murió durante el estudio por IERM, por lo que su patrón espectral tumoral quedó registrado pero no fue posible incluirlo en el protocolo de terapia. El único individuo inoculado con la muestra respondedora que fue incluido en el protocolo de terapia sobrevivió diez meses tras la implantación de las células tumorales, de los cuales cuatro transcurrieron después de la detección del tumor y la administración de TMZ.

La curva de Kaplan-Meier de supervivencia para el grupo no respondedor se detalla en la Figura 4.24. Uno de los animales de este grupo falleció después de la exploración por IERM y no fue incluido en el estudio de supervivencia, ya que no recibió tratamiento.

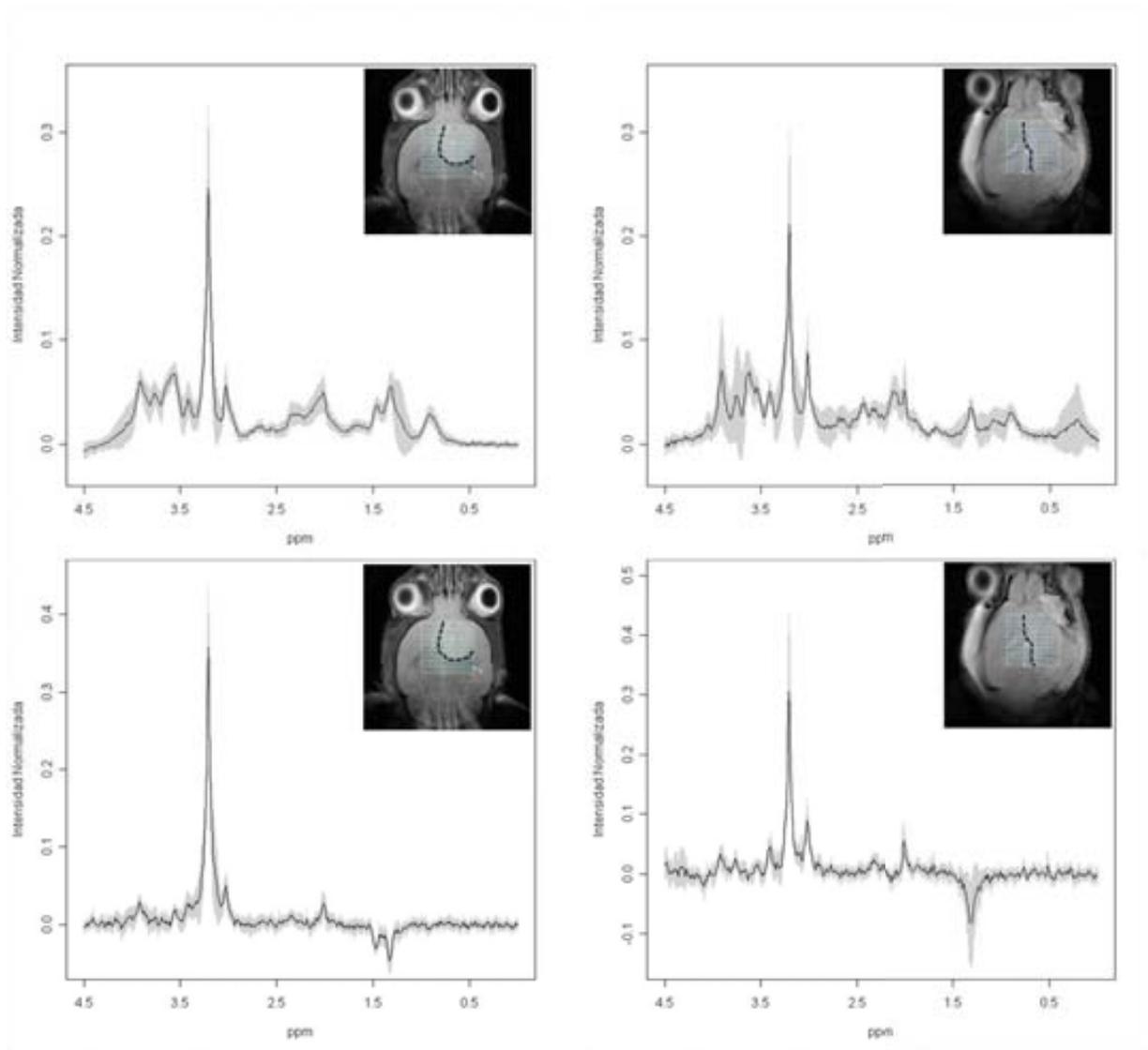


FIGURA 4.23: Espectros promedio (\pm SD en gris) adquiridos a partir de los espectros individuales de los *grid* de las secuencias de IERM adquiridas en los animales *Swiss nude* inoculados con muestras de GBM humanos respondedoras (columna derecha, $n=2$) y no respondedoras (columna izquierda, $n=5$) a terapia con TMZ. En la figura se muestran los espectros promedio a TEC (fila superior) y TEL (fila inferior) de ambos tipos de muestras con una imagen representativa de localización del VOI de IERM en cada caso en la que el límite del tumor aparece bordeado por una línea negra discontinua.

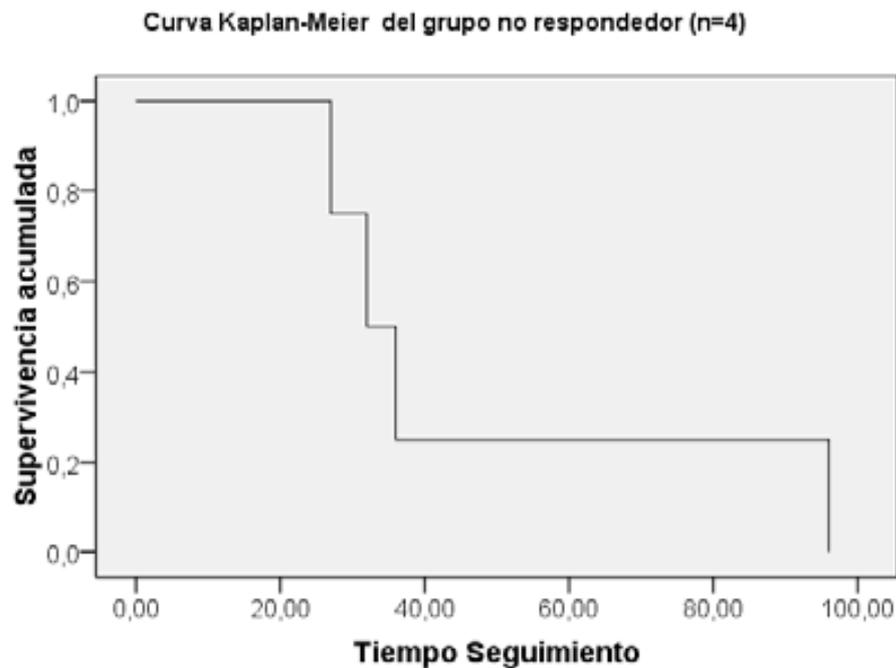


FIGURA 4.24: Curva de supervivencia Kaplan-Meier de los animales inoculados con la muestra de GBM humano no respondedor a terapia con TMZ (n=4). El animal que sobrevivió más tiempo fue el que desarrolló el tumor de tamaño adecuado más tarde (día 90 post-implantación).

4.2.2.4 Discusión de los resultados obtenidos con el modelo xenograft.

Los resultados obtenidos demuestran que, en el caso de animales inoculados con células procedentes de biopsias humanas, el protocolo de un ciclo de TMZ desarrollado previamente en animales GL261 tiene efectos parecidos; es decir, la supervivencia del grupo tratado mejora significativamente respecto al control pero no se observan cambios a nivel volumétrico en la evolución del grupo de tumores. Teniendo en cuenta que el ritmo de crecimiento inicial de los tumores no fue homogéneo en todos los animales, para futuros experimentos con ratones inoculados con células humanas sería conveniente aumentar el número de exploraciones antes de la aparición del tumor, para asegurar que en el momento de detección el volumen sea el adecuado para el protocolo de terapia a seguir. En el caso de las muestras respondedoras a TMZ este factor es muy importante, ya que se comprobó que los tumores generados a partir

de ellas tardaron en crecer entre 150 y 180 días respecto a los 42 de las muestras no respondedoras. Quizás hubiese sido necesario hacer un estudio piloto de crecimiento tumoral con este tipo de muestra similar al descrito en 4.2.2.1 para una muestra no respondedora, para tener un registro de la evolución de las masas respondedoras antes de iniciar el trabajo experimental con terapia. Una vez demostrado que el tratamiento con TMZ es efectivo en este modelo animal a nivel de supervivencia, sería necesario caracterizar con un número mayor de animales el patrón espectroscópico característico de las muestras provenientes de pacientes respondedores y no respondedores a terapia, ya que en el estudio descrito en 4.2.2.3 sólo se pudo obtener el espectro promedio de dos animales inoculados con la muestra respondedora, y este número es insuficiente para realizar análisis estadísticos. A priori podría decirse que ambos tipos de muestra difieren en el cociente colina/creatina, AML/creatina y lactato/alanina. También sería interesante comprobar los efectos de la terapia a nivel del patrón espectroscópico (ERM, IERM) comparando espectros pre y post-terapia y correlacionándolos con el origen de la muestra, comparando muestras de tumores humanos respondedores y no respondedores a terapia con TMZ.

4.3 ESTUDIOS DE PERTURBACIÓN DEL PATRÓN ESPECTRAL Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE TUMORES CEREBRALES.

4.3.1 EFECTO DEL DMSO EN EL MODELO ORTOTÓPICO DE GBM MURINO Y EN UN MODELO GEM.

4.3.1.1 Estudios con ERM.

Durante la realización del estudio control en animales WT sobre la tolerancia a la TMZ (descrito en la sección 4.2.1.2.a de Resultados), los espectros adquiridos a TEC y TEL en el estriado de dichos animales inmediatamente después de la administración de TMZ revelaron una resonancia a 2,72 ppm que no pertenece al patrón de parénquima cerebral normal murino (Figura 4.25) y que no está presente en el mismo a las 24 horas de la administración (Figura 4.26). Posteriormente se demostró que dicha resonancia correspondía a los dos grupos metilo magnéticamente equivalentes del DMSO (ver también el apartado 4.4 de resultados).

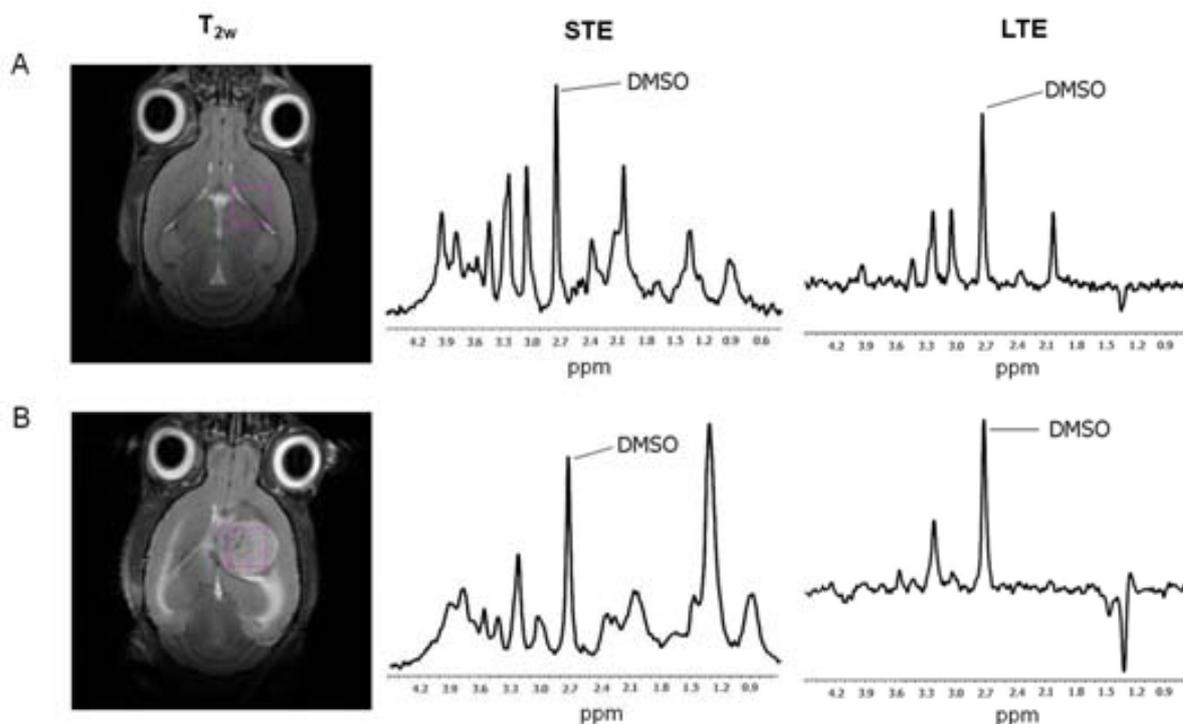


FIGURA 4.25: A) Espectros de ^1H -ERM SV a TEC (12 ms) y TEL (136 ms) del estriado de un animal WT 30 minutos después de recibir una dosis de TMZ disuelta en el vehículo de administración (DMSO al 10% en suero fisiológico). El voxel de adquisición ($2,5\text{ mm}^3$) está marcado en rosa en la imagen de alta resolución ponderada en T_2 (izquierda). **B)** Espectros de ^1H -ERM SV a TEC y TEL de un tumor GL261 (día 16 post-inoculación, imagen T_2 a la izquierda) 30 minutos después de recibir la misma dosis de agente terapéutico. La resonancia de DMSO es claramente detectable a 2,72 ppm en ambos animales a los dos TE.

Estudios por ^1H -ERM SV a diferentes tiempos post-administración de terapia ($n=3$) permitieron observar la curva de lavado del DMSO en parénquima cerebral normal (Figura 4.26). Además, se ajustó la intensidad de la señal de DMSO registrada a lo largo del tiempo a una curva exponencial decreciente (Figura 4.27), asumiendo como máxima concentración la detectada 30 minutos después de la administración para calcular la vida media del compuesto en el tejido ($y = ae^{-bt}$), que resultó ser de $2,06 \pm 0,58\text{h}$. La resonancia a 2,72 ppm permaneció visible al menos 6 horas después de la administración y la concentración máxima detectada fue de $4,06 \pm 0,73\ \mu\text{mol/g}$ de agua en el cerebro (140). La concentración de DMSO fue comparada con las correspondientes a colina y creatina en parénquima cerebral normal, que

permanecieron constantes durante el estudio ($p < 0,05$): $1,10 \pm 0,26$ y $5,75 \pm 0,60$ $\mu\text{mol/g}$ respectivamente. Los valores detectados para estos dos metabolitos concuerdan con lo descrito previamente por otros autores en estudios *in vivo* en ratón a 9,4T (141).

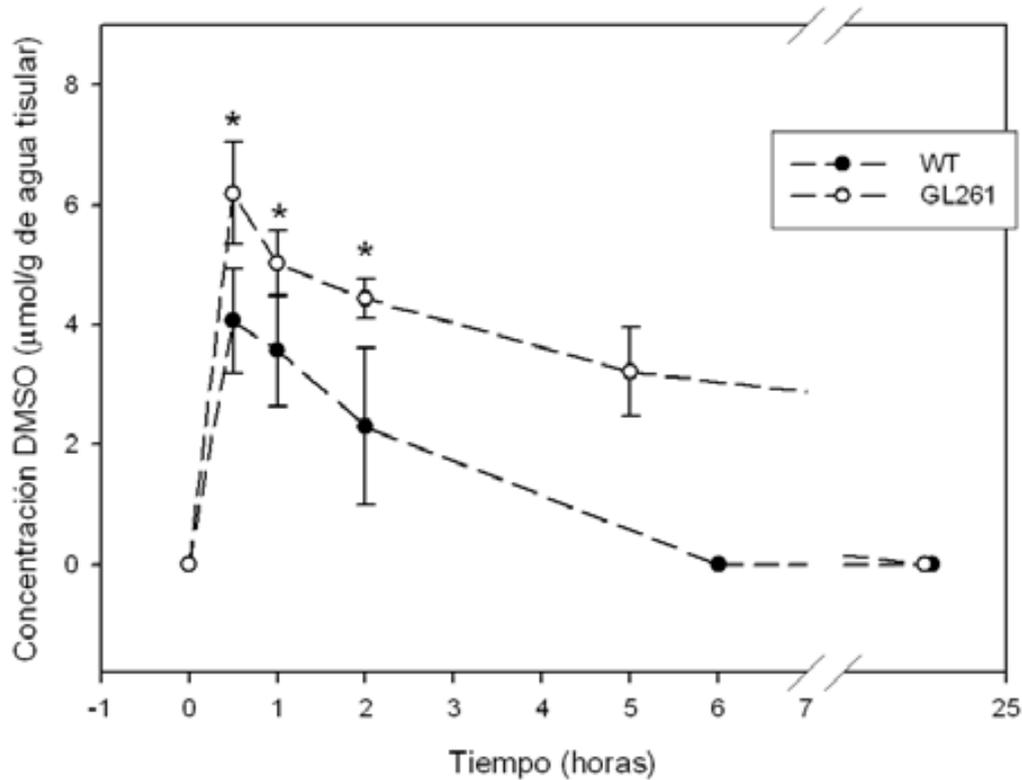


FIGURA 4.26: Cinética de lavado del DMSO en parénquima cerebral normal (círculos negros, $n=3$) y tumores GL261 (círculos blancos, $n=3$), antes de la administración de DMSO y 30 minutos, 1 h, 2h, 5-6h y 24 h después. La acumulación de DMSO fue significativamente mayor (*) en el tejido tumoral (1,5 veces) respecto al parénquima normal y el lavado más lento. Las barras verticales muestran la desviación estándar en cada punto.

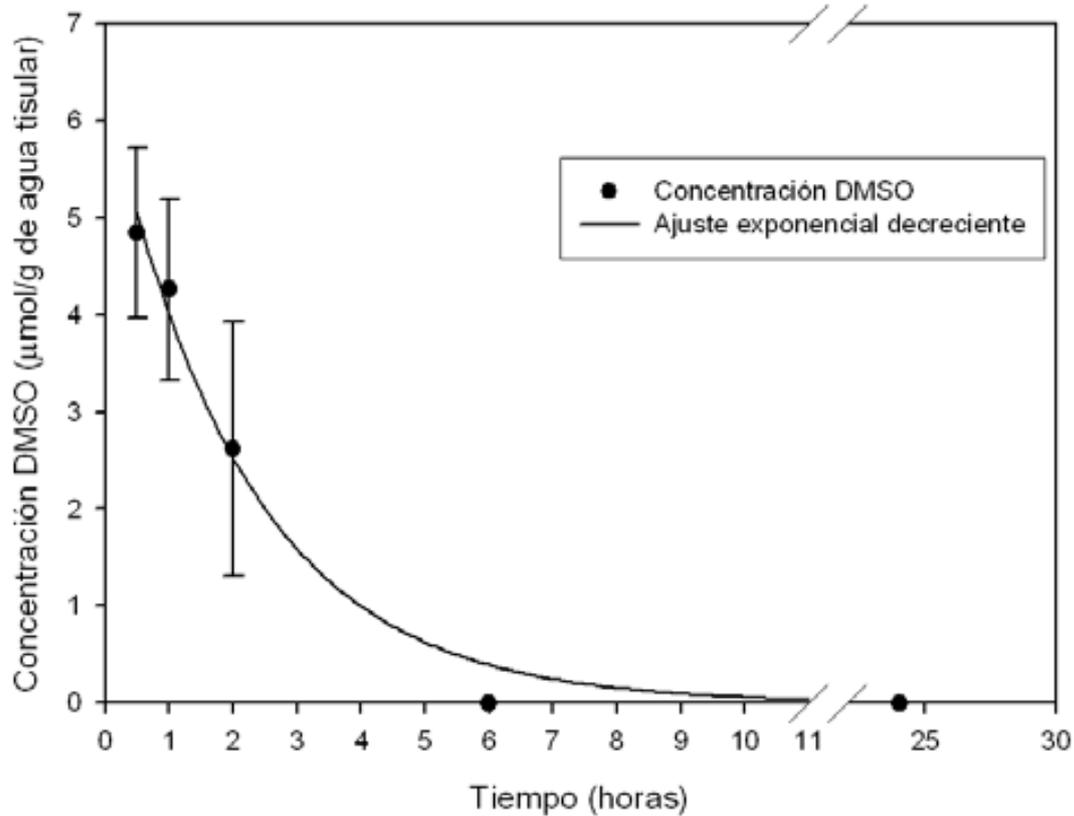


FIGURA 4.27: Ajuste exponencial decreciente de la cinética de lavado del DMSO en parénquima cerebral normal de ratones C57BL/6 ($n=3$) utilizado para el cálculo de la vida media ($y = ae^{-bt}$).

Una vez descrito el comportamiento del DMSO en parénquima cerebral normal, se procedió a realizar el mismo tipo de estudio con tres animales inoculados con células GL261. En este caso no se administró terapia sino únicamente el vehículo (DMSO en suero fisiológico 10%), ya que la finalidad del estudio en este caso era detectar y cuantificar la resonancia del DMSO en GBM de grado IV y no los efectos del agente terapéutico que se disuelve en DMSO. Las exploraciones por 1H-ERM SV se llevaron a cabo el día 16 post-implantación, a los mismos tiempos post-inyección i.p. que en los animales WT, excepto el último punto temporal, que fue de cinco horas en vez de seis. Los espectros adquiridos en los tumores a TEC y TEL demostraron también la presencia de la señal de DMSO a 2,72 ppm (Figura 4.25), que permaneció visible como mínimo hasta cinco horas después de la administración del vehículo. Como en el caso de los animales WT, la concentración máxima de DMSO fue detectada en el

primer punto de exploración, 30 minutos después de la administración: $6,18 \pm 0,85 \mu\text{mol/g}$. La vida media aparente calculada en el interior del tumor fue de $4,57 \pm 1,15$ h. En este caso también se comparó la concentración de DMSO con las de colina y creatina, que permanecieron constantes a lo largo del estudio ($2,50 \pm 0,42$ y $4,88 \pm 1,18 \mu\text{mol/g}$ respectivamente, $p < 0,05$). La comparación entre las curvas de lavado del DMSO en parénquima normal y tumor mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones alcanzadas por dicho compuesto en ambos tipos de tejido. La concentración más elevada se detectó dentro de los tumores, siendo la curva de lavado del compuesto más lenta en este tejido en comparación con el parénquima normal.

4.3.1.2 Estudios de la perturbación con DMSO mediante IERM.

4.3.1.2 a) Tumores GL261

Tres ratones C57BL/6 fueron inoculados con células GL261 para estudiar el efecto del DMSO conjuntamente sobre cerebro normal y tumor utilizando secuencias de IERM. Los animales fueron explorados los días 14 (C255), 18 (C288) y 13 (C351) post-implantación, cuando el volumen de los tumores era el utilizado habitualmente en estudios previos (unos 70 mm^3) (108). La Figura 4.28 muestra espectros representativos (TEC), tanto dentro del tumor como de la región peritumoral/normal, de uno de dichos animales adquiridos antes y después (88 min) de la inyección i.p. de DMSO. Las secuencias de IERM fueron adquiridas consecutivamente durante 6 horas después de la inyección de DMSO, y la máxima concentración del compuesto se detectó según el tumor entre los minutos 22 y 88 post-administración. Los mapas codificados para la intensidad de la señal de DMSO detectada en el VOI mostraron un claro “hot-spot” de acumulación de DMSO dentro del tumor, en comparación con el parénquima circundante (Figura 4.29 A) (142). Estas diferencias se hacen más evidentes al calcular las curvas de acumulación de DMSO a lo largo del tiempo para los dos tipos de tejido (Figura 4.29 D). Se seleccionaron cuatro voxels (pintados de negro en la Figura 4.29 C)

como muestra de tejido normal en cada caso, mientras que el número de voxels seleccionados como muestra del tumor fue variable (pixels en gris en la Figura 4.29 C). Los voxels dentro del VOI que contenían el 50% o más de volumen tumoral (identificado en las imágenes T_{2w} de alta resolución) se seleccionaron como región tumoral para calcular las curvas. Las intensidades relativas de la resonancia de DMSO se calcularon en cada tipo de tejido y fueron representadas en función de los niveles iniciales de referencia (pre-inyección), que fueron considerados como el 100% de acumulación. En la Figura 4.29 D se muestran las curvas calculadas, con el máximo de acumulación señalado por una barra de color verde en cada caso. Este valor máximo resultó ser significativamente mayor en el tejido tumoral que en el normal (Figura 4.29 E, $p < 0,05$). En el ratón C255 el aumento máximo de concentración de DMSO fue de $977.61 \pm 140.06\%$ en el tumor y de $457.52 \pm 125.81\%$ en el parénquima normal/peritumoral, en el minuto 88 post-inyección. En el animal 288 la máxima concentración se detectó a los 44 minutos post-inyección ($1024.25 \pm 252.74\%$ dentro del tumor y $447.10 \pm 74.81\%$ en la región peritumoral) y en el C351 a los 22 minutos ($1013.35 \pm 222.85\%$ en el tumor y $449.11 \pm 97.27\%$ en el tejido circundante).

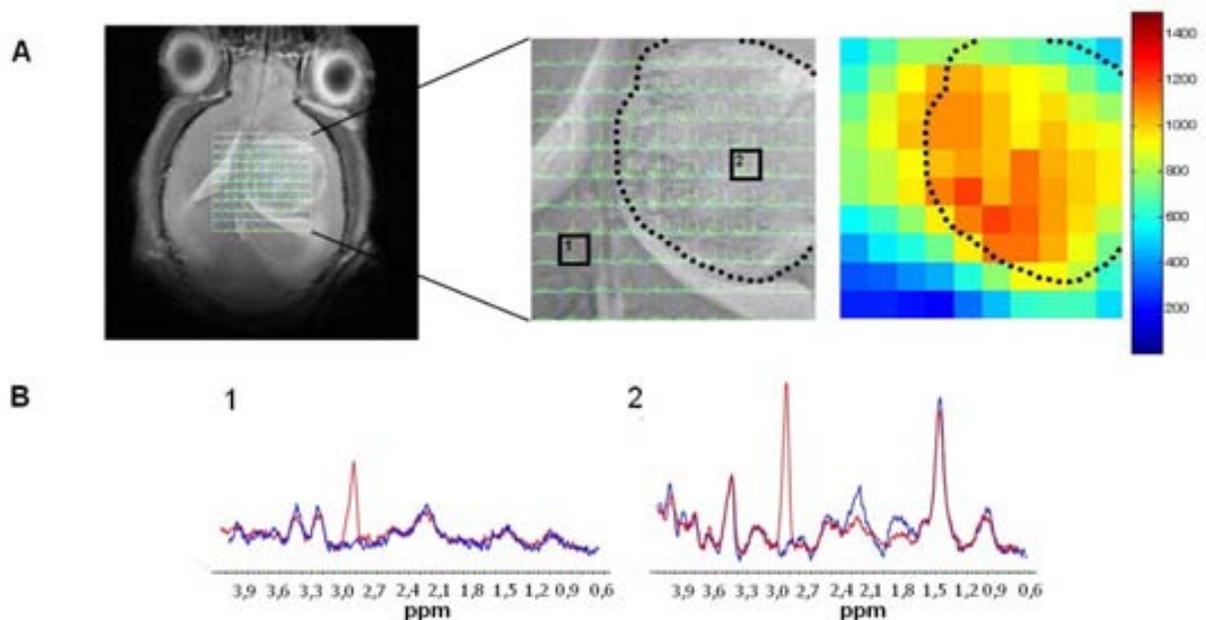


FIGURA 4.28: A) VOI de adquisición para las secuencias de IERM (12 ms TE) superpuesto a la imagen de referencia (T_{2w} -HR) en un tumor GL261 (C255). El VOI a mayor aumento se muestra en el centro; la

línea punteada negra marca el límite del tumor y los cuadrados 1 y 2 corresponden a los espectros SV extraídos de esas regiones de la matriz de IERM y que se exponen en B. A la derecha se muestra un mapa en escala de color de la intensidad de DMSO detectada en el VOI 88 minutos tras la administración. Se puede observar una clara acumulación del agente dentro del tumor comparado con el parénquima peritumoral. **B)** Espectros a TEC extraídos de las regiones macadas como 1 (parénquima peritumoral/normal) y 2 (tejido tumoral) en la matriz expuesta en A, antes (espectro azul) y 88 min después de la administración de DMSO (espectro en rojo).

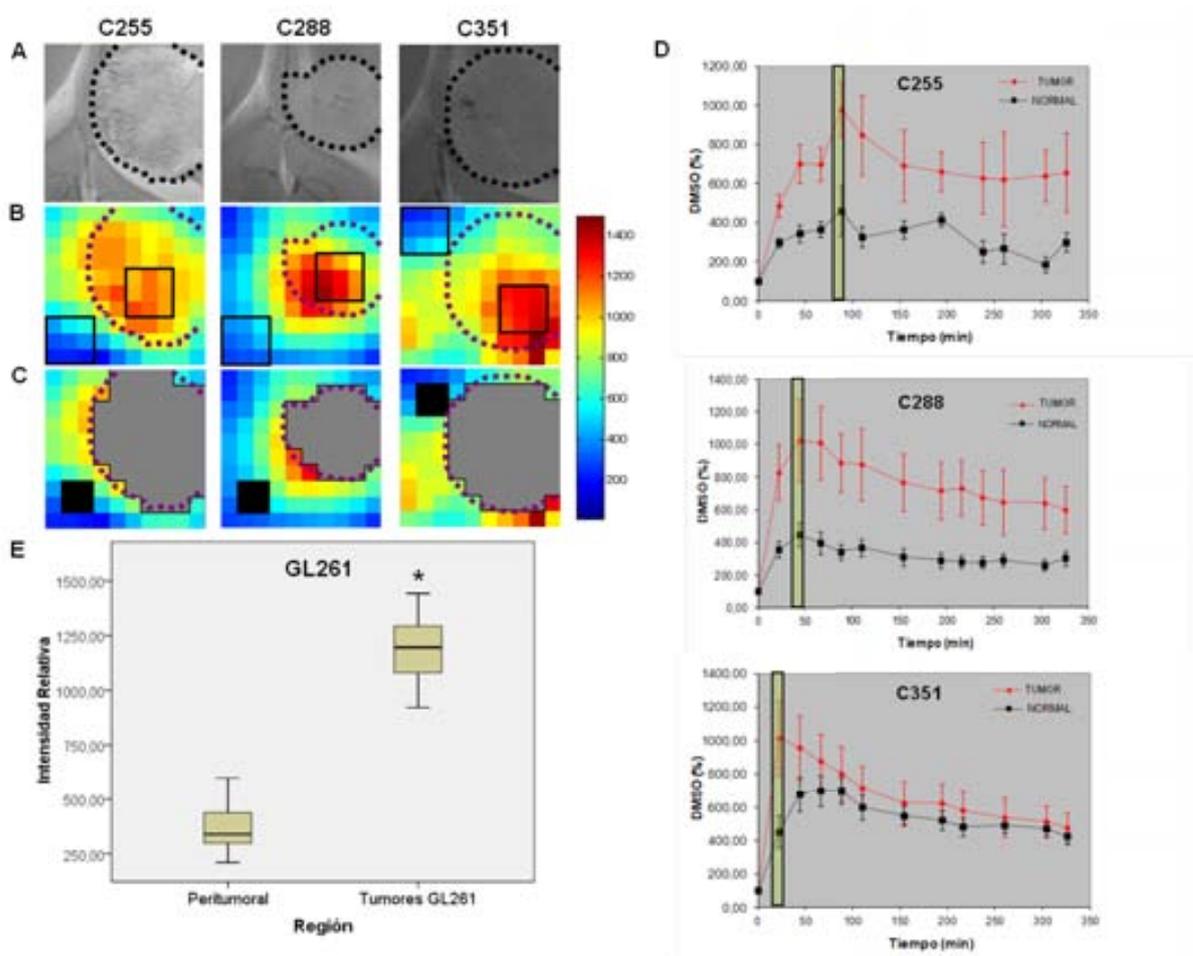


FIGURA 4.29: Detección de DMSO por IERM en tumores GL261. **A)** Localización de los VOI sobre las imágenes de referencia de T_{2w} -HR en tres animales afectados por tumores GL261. La línea discontinua marca el límite de la masa tumoral. **B)** Mapas codificados en color para el punto temporal de máxima intensidad de la señal de DMSO detectada tras la inyección intraperitoneal en cada animal (a los 88 min en el ratón C255, a los 44 min en el en el C288 y a los 22min en el 351). Se detecta un claro *hot-spot* de

DMSO en el interior de los tumores al compararlos con el parénquima cerebral normal/peritumoral (ver leyenda 4.29 E para el uso de los cuadrados). **C)** Voxels individuales extraídos del VOI de IERM que contienen regiones de parénquima normal (cuadrados negros) y la masa tumoral (voxels grises) y que fueron utilizados para calcular las curvas de lavado de DMSO que se muestran en la parte D. **D)** Curvas de lavado del DMSO calculadas a partir de sus intensidades relativas registradas desde el momento de la inyección y durante 6 horas en los voxels marcados en C. El nivel basal de referencia en cada caso es el 100%. Los puntos rojos corresponden a la intensidad relativa de DMSO registrada en los tumores (pixels grises en C) y los puntos negros a la intensidad registrada en el parénquima normal/peritumoral (pixels negros en C). Las barras de error representan la desviación estándar de las intensidades de DMSO registradas en cada conjunto de pixels para cada punto temporal. La barra verde vertical señala el punto de máxima acumulación de DMSO en cada animal. **E)** *Box-plots* (ver Figura 4.19 para su descripción) con los valores de intensidad relativa de DMSO calculadas en las regiones peritumorales y tumorales señaladas en los cuadrados de borde negro en B. Las barras de error representan la desviación estándar existente entre los tres animales. (*) Indica una diferencia significativa de intensidad ($p < 0,05$) entre ambos tejidos.

4.3.1.2 b) Animales GEM

Tres animales de la cepa S100 β -v-erbB/Ink4a-Arf(+/-) afectados por tumores ODG de grado II (S523 y S609) y grado II con zonas de transición a IV (S768) participaron en el mismo protocolo descrito anteriormente para los GL261. Previamente, fueron estudiados por IRM con secuencias T_{1w}-CE para comprobar si la barrera hematoencefálica estaba o no intacta (Figura 4.30) y por ¹H-ERM SV para analizar el patrón espectroscópico de las masas y corroborar si eran tumores de bajo grado (cociente colina/creatina bajo, NAA elevado y pocos lípidos móviles) o alto grado (cociente colina/creatina elevado, NAA muy disminuido y presencia considerable de lípidos móviles). El tipo y grado de los tumores fue confirmado post-mortem mediante un análisis histopatológico basado en tinciones de hematoxilina-eosina realizadas en diferentes cortes del encéfalo coincidentes con la región analizada por IERM. Las características del tejido en las que se basó el diagnóstico histopatológico fueron las siguientes:

Los ODG de grado II se caracterizaron por presentar proliferación neoplásica circunscrita de células isomorfas (núcleo redondo rodeado de citoplasma aparentemente vacío) de tamaño pequeño o medio. Los tejidos mostraban pleomorfismo moderado, anisocariosis, pocas mitosis, células neoplásicas creciendo en patrón en forma de panal y vasos sanguíneos de forma y distribución irregulares con hiperplasia endotelial. El ODG de grado II con transición a grado IV (S768) presentó las características anteriormente descritas en las zonas clasificadas como de bajo grado y, poblaciones de células neoplásicas pleomórficas con evidente atipia nuclear, anisocariosis y citoplasmas eosinófilos creciendo en grupos, en las regiones de transición, en las que el componente vascular era más prominente. Además, en dichas regiones de alto grado (grado IV) se observaron células necróticas aisladas con núcleos picnóticos (Figura 4.30).

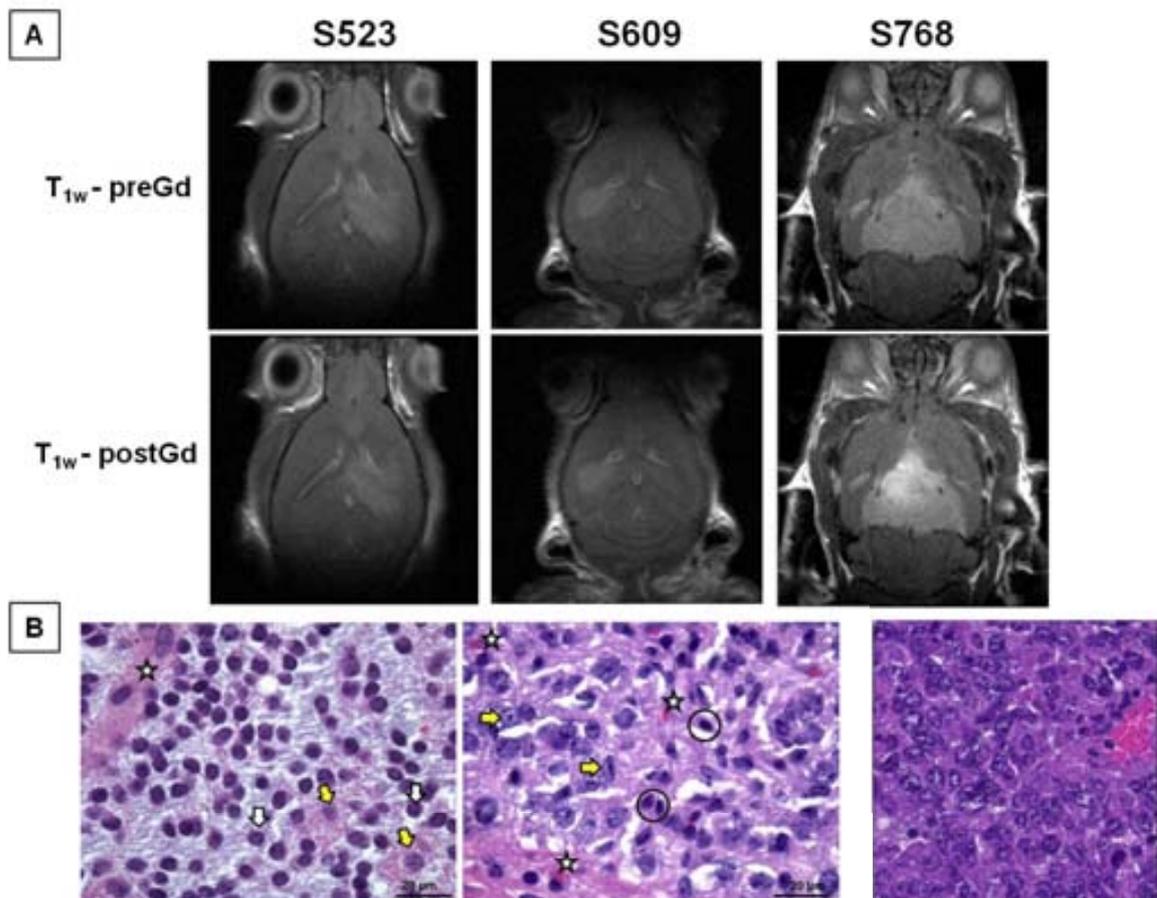


FIGURA 4.30: En **A)** se muestran las imágenes T_{1w}-CE pre y 20 minutos post inyección i.p. de Gd-DTPA (filas superior e inferior respectivamente) de los tres animales GEM estudiados por PE-IERM con

DMSO (S523, S609 y S768 de izquierda a derecha). En los dos primeros animales no se observó captación de contraste, lo cual corroboraba que la BHE estaba intacta y por tanto se trataba muy probablemente de tumores de bajo grado. En el tercer caso se detectó captación de contraste que sólo afectaba a la región frontal del tumor. **B)** Las dos primeras imágenes (empezando por la izquierda) muestran tinciones de hematoxilina-eosina de los dos tipos de tejido detectados en el tumor del animal S768. La primera imagen corresponde a la mayoría del tumor: ODG-II. Las flechas blancas señalan células características de este tipo tumoral en forma de panal y la estrella indica un capilar de paredes finas presente en la región de estudio. Las flechas amarillas indican algunas células de patrón más indiferenciado que el anterior. La segunda imagen muestra la población en transición (grado IV) con células típicas de este estadio (flechas amarillas), vasos sanguíneos más prominentes (estrella) y células necróticas con núcleos picnóticos (círculos). La tercera imagen (derecha) muestra un ejemplo del mismo tipo de tinción en un GBM GL261 (grado IV) en la que se puede comparar.

Al igual que en el caso de los animales GL261, se adquirieron secuencias de IERM pre y post-administración intraperitoneal de DMSO. Los espectros adquiridos en el VOI fueron utilizados para calcular mapas de acumulación de DMSO detectable por RM. Como sucedió con los tumores GL261, los ODG-II también mostraron claros *hot-spots* de acumulación en el interior del tumor en comparación con el parénquima cerebral circundante ($p < 0,05$). La máxima concentración fue detectada en el minuto 66 post-inyección en ambos casos. En el ratón S609 la máxima concentración de DMSO fue significativamente menor que en el S523 (ver rango de la escala de intensidad de la Figura 4.31).

Los animales GL261 sobrevivieron sin dificultades respiratorias al protocolo completo. Sin embargo, los ODG-II presentaron patrones respiratorios anormales tras tres horas de exploración, por lo que el nivel de anestesia y la monitorización de los animales tuvieron que ser estrictamente controlados a lo largo del experimento.

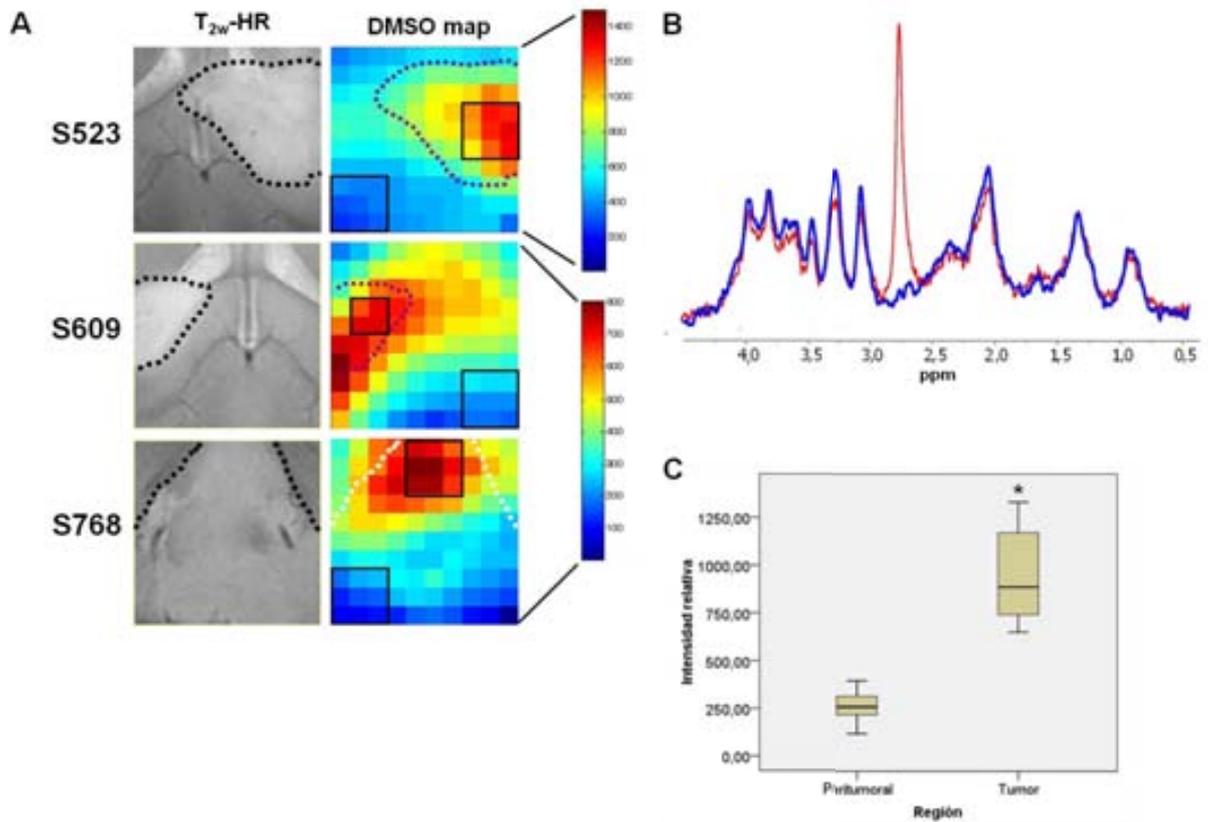


FIGURA 4.31: Detección de DMSO por IERM en tumores ODG-II. **A)** Animales S523, S609 y S768 (uno en cada fila). De izquierda a derecha: Imágenes de referencia T_{2w} -HR para la localización del VOI en los estudios de IERM (la línea discontinua representa los límites de la masa tumoral) y mapas codificados en color para la máxima intensidad de DMSO detectada en cada caso. La máxima concentración de DMSO fue detectada a los 66 minutos post-inyección en los dos primeros casos y a los 88 minutos en el tercero. La escala de intensidad de los mapas (barra vertical a la derecha) fue diferente para el animal S523. **B)** Espectros representativos obtenidos a partir de un voxel individual del VOI del animal S523, antes (azul) y 66 min después de la inyección de DMSO (rojo). El patrón espectral es representativo de un ODG de bajo grado: bajo cociente colina/creatina; niveles elevados de NAA y baja señal de lípidos móviles. **C)** Comparación de la acumulación de DMSO entre el tejido peritumoral y los tumores (regiones enmarcadas en cuadrados negros en los mapas de color de intensidad relativa de DMSO). Las barras de error muestran la desviación estándar para los ratones considerados (*) Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ambos tejidos.

4.3.1.3 *Discusión de los resultados obtenidos con los estudios ERM/IERM en los modelos GL261 y ODG-II.*

Potencial del DMSO como agente de contraste para tumores cerebrales

Los estudios por ^1H ERM SV en animales WT del grupo de tolerancia a la TMZ revelaron la presencia de la señal de DMSO en el patrón espectral de parénquima cerebral normal tras su administración intragástrica. Este mismo fenómeno fue observado en los espectros SV de animales inoculados con células GL261 tras la administración intragástrica del vehículo sin TMZ. Teniendo en cuenta estos hechos, los estudios por ^1H -ERM de respuesta a terapia en animales tratados con TMZ deberían realizarse una vez que dicho compuesto hubiera sido lavado completamente del cerebro (aproximadamente después de 6 horas en ratón), para evitar una perturbación exógena e involuntaria del patrón espectral en estudio, o bien tener en cuenta su contribución a dicho patrón espectral.

Por otro lado, esta observación nos llevó a investigar con más detalle las diferencias existentes en el patrón de acumulación del DMSO entre tejido cerebral normal y tumoral. Los resultados obtenidos sugieren un nuevo potencial para dicho compuesto, ya que su acumulación diferencial aporta contraste en tumores de bajo y alto grado respecto al parénquima cerebral normal. Además, este contraste se obtiene tanto si la BHE está intacta como si está rota, lo cual aporta ventajas tangibles respecto a otros medios de contraste actualmente utilizados, como por ejemplo el gadolinio, que en algunos casos no permite detectar tumores preclínicos, por ejemplo cuando la BHE está intacta, y también antes o después de terapia antiangiogénica, que parece producir una normalización transitoria de la permeabilidad tumoral (143).

DMSO y heterogeneidad intratumoral

La intensidad normalizada media de DMSO alcanzada en los tumores GL261 y en dos de los ODGs (S523 y S768) fue 1,75 veces mayor que en el tercer ODG (S609). Esto podría

deberse a diferencias en el tamaño o estado evolutivo de los tumores, por lo que estudios con una cohorte más amplia de individuos serán necesarios para evaluar apropiadamente dichas diferencias.

Por otro lado, también hay que destacar la variabilidad del tiempo necesaria para alcanzar el máximo de concentración entre los diferentes tumores (rango de 22-88 minutos post-inyección). Esto podría deberse, entre otras causas, a diferencias de perfusión regional en los tumores. Además, la aparente heterogeneidad intra-tumoral detectada a través del marcaje diferencial (*hot-spots*) en los mapas de intensidad de señal de DMSO, requiere más estudios para confirmar su presencia y, en caso de verificarse, para comprender su origen y la posible relación con propiedades celulares y/o bioquímicas de los tumores estudiados.

Posibles causas del efecto diferencial del DMSO.

Se ha descrito que el DMSO tiene gran utilidad como *carrier* de diversos fármacos debido a su facilidad para atravesar membranas celulares (144-146). Teniendo en cuenta esta propiedad, podemos concluir que los resultados anteriormente expuestos pueden deberse a la capacidad del DMSO para atravesar la BHE intacta tanto en animales WT como en animales afectados por tumores de bajo grado (ODG-II) que no muestran contraste tras la administración de Gd-DTPA.

La etiología de la retención diferencial del DMSO en el tejido tumoral con respecto al parénquima cerebral normal todavía nos es desconocida, aunque podría estar asociada a alguna característica del tejido tumoral independiente del grado y malignidad del mismo, al menos desde un punto de vista cualitativo aunque no necesariamente cuantitativo (como se ha visto en los resultados anteriores existen tumores que retienen una concentración relativa de DMSO mayor que otros). Hasta el momento hemos realizado algunos estudios para comprender dicho fenómeno. Nuestra primera hipótesis de trabajo fue considerar que quizás el DMSO fuera retenido de manera diferencial en las gotículas lipídicas (esencialmente micelas

de fosfolípidos y triacilgliceroles) normalmente presentes en el citosol de las células tumorales (147). Sin embargo nuestra hipótesis de trabajo se reveló incorrecta según lo descrito en el apartado 4.3.1.4 de esta sección, lo cual concordaría con el bajísimo coeficiente de partición aceite-agua descrito para el DMSO (0,003) (148). Por lo tanto, un compartimento puramente hidrofóbico no sería un buen reservorio para el DMSO.

Otra posibilidad a considerar es que el DMSO quede retenido en la membrana plasmática de las células. A este respecto, modelos de simulación dinámica molecular de la bicapa lipídica en interacción con moléculas de DMSO han demostrado que este compuesto se intercala en la membrana situándose bajo las cabezas polares de los lípidos y puede inducir la formación de poros hidrofílicos (80). Además, hay diversos ejemplos en la literatura de estudios con diferentes sondas fluorescentes que marcan la membrana plasmática de las células (149) y otros que demuestran que la unión de estas sondas es diferente según el estado de proliferación celular (150). Por lo tanto, considerando estos hechos, podemos considerar como hipótesis de trabajo a evaluar en un futuro que la retención diferencial de DMSO en tejido tumoral podría deberse al estado de fluidez y composición particulares de la membrana plasmática de las células en proliferación en comparación con las células normales en estado quiescente.

4.3.1.4 Experimentos con gotículas artificiales *in vitro*.

Los espectros de agua no suprimida adquiridos *in vitro* a 7 T en dos *phantoms* que contenían TMZ y el vehículo de administración a dos pHs diferentes (8,26 y 5,91) fueron procesados referenciando las señales detectadas a la resonancia del agua a 4,75 ppm. El desplazamiento químico de los grupos metilo del DMSO resultó ser un singlete a 2,82 ppm a temperatura ambiente (24°C) en ambas muestras de acuerdo con lo esperado, ya que este compuesto no es dependiente del pH en el rango fisiológico de interés. Las resonancias de los protones aromáticos de la TMZ, AIC y MTIC se detectaron a 8,6; 7,2 y 3,2 ppm respectivamente a pH 8,26 según lo descrito en (117). No se observaron señales en el rango

de 0 a 3 ppm, lo cual descarta que dichos compuestos puedan contribuir con sus resonancias a la señal de DMSO *in vivo* (Figura 4.32). La TMZ sin degradar se detecta a 3,9 ppm en el espectro adquirido a pH 5,91 (151), aunque el proceso de degradación de dicho compuesto empieza a partir de pH5, por lo que la señal a 8,6 ppm ya es detectable. El desplazamiento químico del DMSO *in vitro* resultó ser ligeramente distinto al detectado *in vivo* (2,72 ppm). Esto puede ser debido, entre otros factores, a la dependencia existente entre el desplazamiento químico del agua (utilizada como referencia interna) y la temperatura (152). Para comprobarlo, se adquirió (en las mismas condiciones que los anteriores) un espectro sin supresión de agua en un *phantom* compuesto por DMSO al 10% en salino a 37°C. En este caso el desplazamiento químico del DMSO referenciado a la señal del agua resultó ser de 2,72 ppm, igual que en los experimentos *in vivo*.

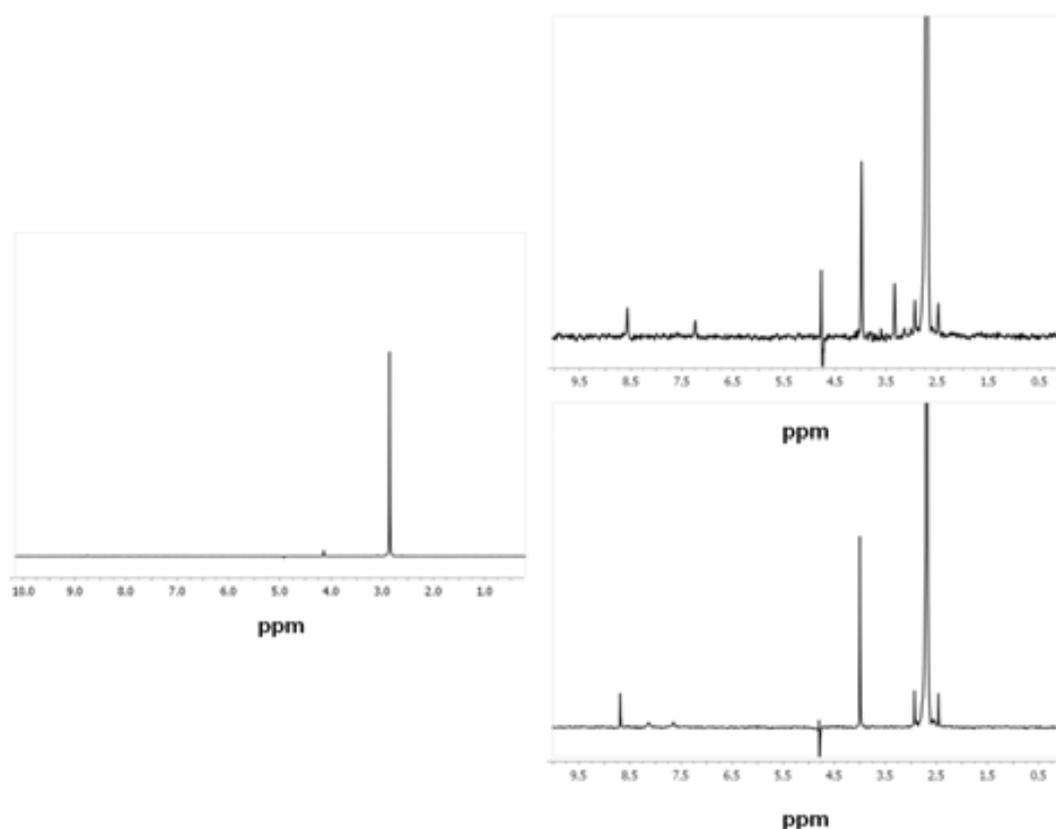


FIGURA 4.32: Espectros adquiridos *in vitro* a 7 Ta partir de dos *phantoms* de TMZ disuelta en DMSO a pHs diferentes. A la izquierda se muestra una visión general entre 0 y 10 ppm del *phantom* a pH 5,91. La señal de DMSO es claramente detectable a 2,82 ppm. A la derecha, se muestran los espectros de los

phantoms a pH 8,26 (superior) y 5,91 (inferior) con la escala de intensidad ampliada para poder visualizar correctamente las señales de TMZ y sus subproductos. A pH 8,26 puede detectarse la señal de la TMZ (3,9 ppm) y las señales correspondientes a su degradación a 8,6; 7,2 (AIC) y 3,2 ppm (MTIC). A pH 5,91 la señal principal detectable es la de 3,9 ppm aunque la degradación está iniciándose (se detecta TMZ a 8,6 ppm).

Los espectros adquiridos *in vitro* por HR-MAS (Figura 4.33) en las muestras que contenían las AOBs y el tampón de disolución (obtenido tras centrifugar la muestra de AOBs) se compararon con aquellos obtenidos a partir de *phantoms* con DMSO y creatina, para investigar una posible retención diferencial del DMSO por parte de las AOBs. En este sentido no se detectaron diferencias significativas en el cociente de las áreas de Creatina/DMSO, que fue de $0,88 \pm 0,05$ en el *phantom* sin AOBs, $1,06 \pm 0,16$ en la muestra de AOBs y $0,77 \pm 0,07$ en la solución de *minimal buffer* recuperado después de retirar la capa de gotículas tras la centrifugación de las muestras. Si el DMSO se acumulase de manera asociada a las gotículas lipídicas, la intensidad de su resonancia debería haber aumentado respecto a la de la creatina en la muestra de AOBs, en comparación con las intensidades detectadas en los *phantoms* y en las muestras de *minimal buffer*. Por ejemplo, si el coeficiente de partición del DMSO en el compartimento de las gotículas fuese de 1, el cociente Creatina/DMSO en la muestra de AOBs sería mucho más baja que en el *phantom* o *minimal buffer*. La explicación para este fenómeno sería que mientras el DMSO se retendría preferentemente asociado a las AOBs, la creatina (sustancia hidrofílica) no lo haría. Los resultados obtenidos con los experimentos descritos en esta sección no permiten confirmar la hipótesis.

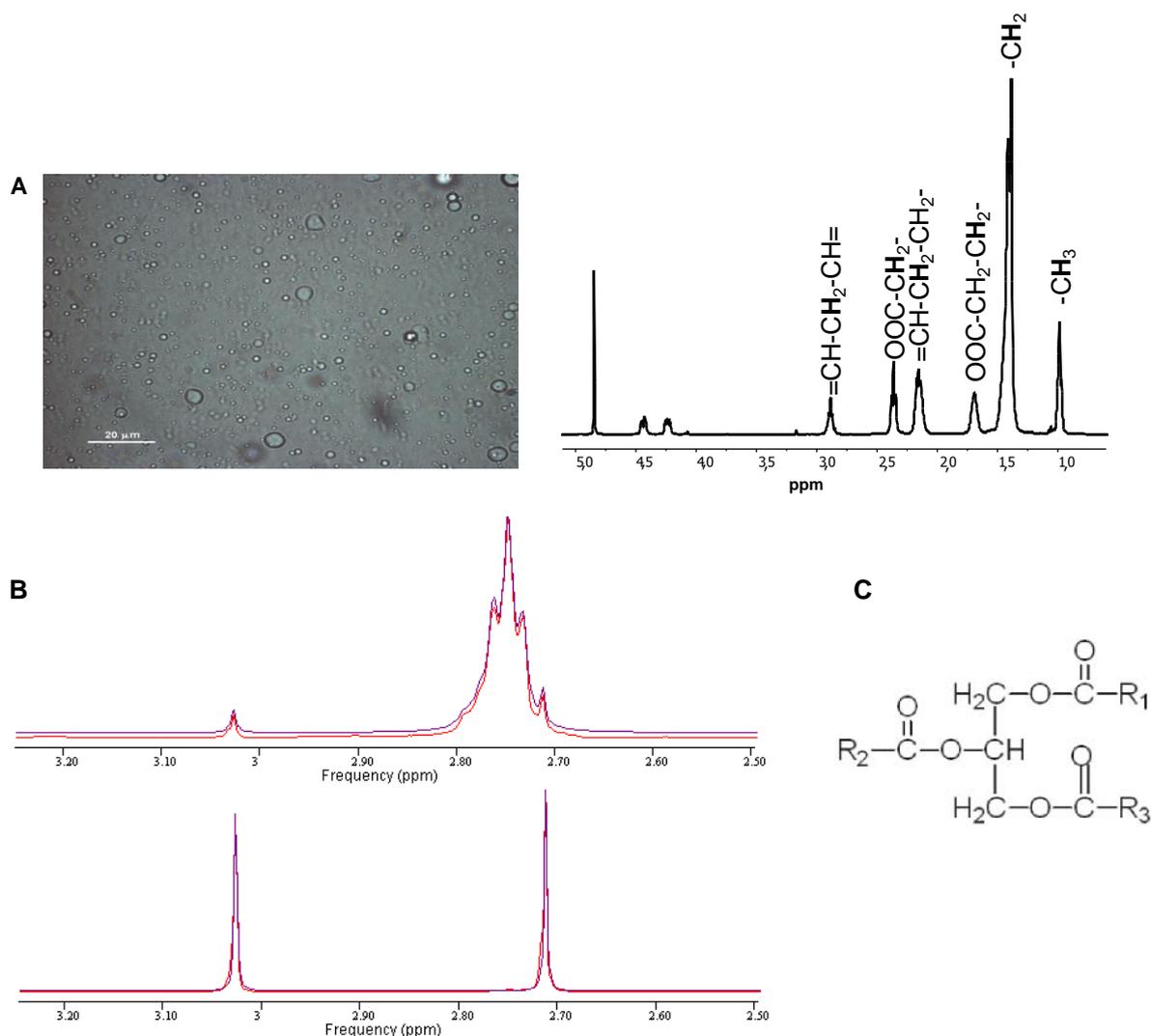


FIGURA 4.33: A) A la izquierda, imagen adquirida con un microscopio óptico de contraste de fases de las AOBs de oleosina utilizadas en los experimentos de HR-MAS. El tamaño de la barra de referencia es de 20 μm . A la derecha, un espectro representativo de una muestra de AOBs adquirido a 3000 Hz de frecuencia de giro y 37°C. Las resonancias entre 0,8 y 2,5 ppm pertenecen a los lípidos móviles de las cadenas de ácidos grasos del TAG (ver también Pérez et al (153) para las asignaciones), mientras que el HDO residual aparece a 4,8 ppm. Las señales de DMSO y creatina son prácticamente indetectables a esa escala. **B)** Ajuste de AMARES (en morado el patrón ajustado y en rojo el espectro original). En la parte superior se muestra un espectro de AOBs en el rango de 0,5 a 3,5 ppm. La resonancia del DMSO está parcialmente superpuesta a la señal de lípidos de 2,8 ppm, por lo que el uso del AMARES permite asignar de manera precisa el área perteneciente a cada metabolito. La resonancia de la creatina es también visible a 3,03 ppm. En la parte inferior se muestra un espectro de una muestra de tampón

minimal buffer conteniendo DMSO y creatina, en la misma concentración que la solución de AOBs. **C)** Fórmula química de un TAG.

4.3.1.5 Estudios con IERM en tumores en tratamiento

Ante los resultados obtenidos en los estudios PE-IERM con DMSO (apartado 4.3.1.2 de Resultados), se procedió a realizar el mismo protocolo con tumores GL261 tratados con el mejor de los protocolos de terapia estudiados (tres ciclos de TMZ, apartado 3.4.1.1.3 de Materiales y Métodos), para comprobar si la acumulación de dicho compuesto sufría variaciones como consecuencia de los cambios generados en las masas tumorales debidos a la terapia. Veintiséis animales fueron divididos en siete grupos (control pre terapia a día 10 (n=3); grupo tras el primer ciclo de TMZ a día 15 (n=3); grupo antes del segundo ciclo a día 18 (n=6); control sin terapia a día 18 (n=3); grupo justo después del segundo ciclo a día 22 (n=6); grupo después del tercer ciclo a día 26 (n=3) y grupo en recidiva (n=2)) (ver también Figura 4.12), estudiados por PE-IERM con DMSO y sacrificados en diferentes puntos temporales del protocolo de terapia para estudiarlos por histopatología (Figura 4.34). Los patrones espectrales promedio con su respectiva desviación estándar de los tumores, parénquima peritumoral/normal y regiones de *hot-spot* de acumulación de DMSO, tanto dentro como fuera de la masa anómala del tumor definida por la imagen T_{2w} HR de los distintos grupos pueden observarse en el Anexo 4.

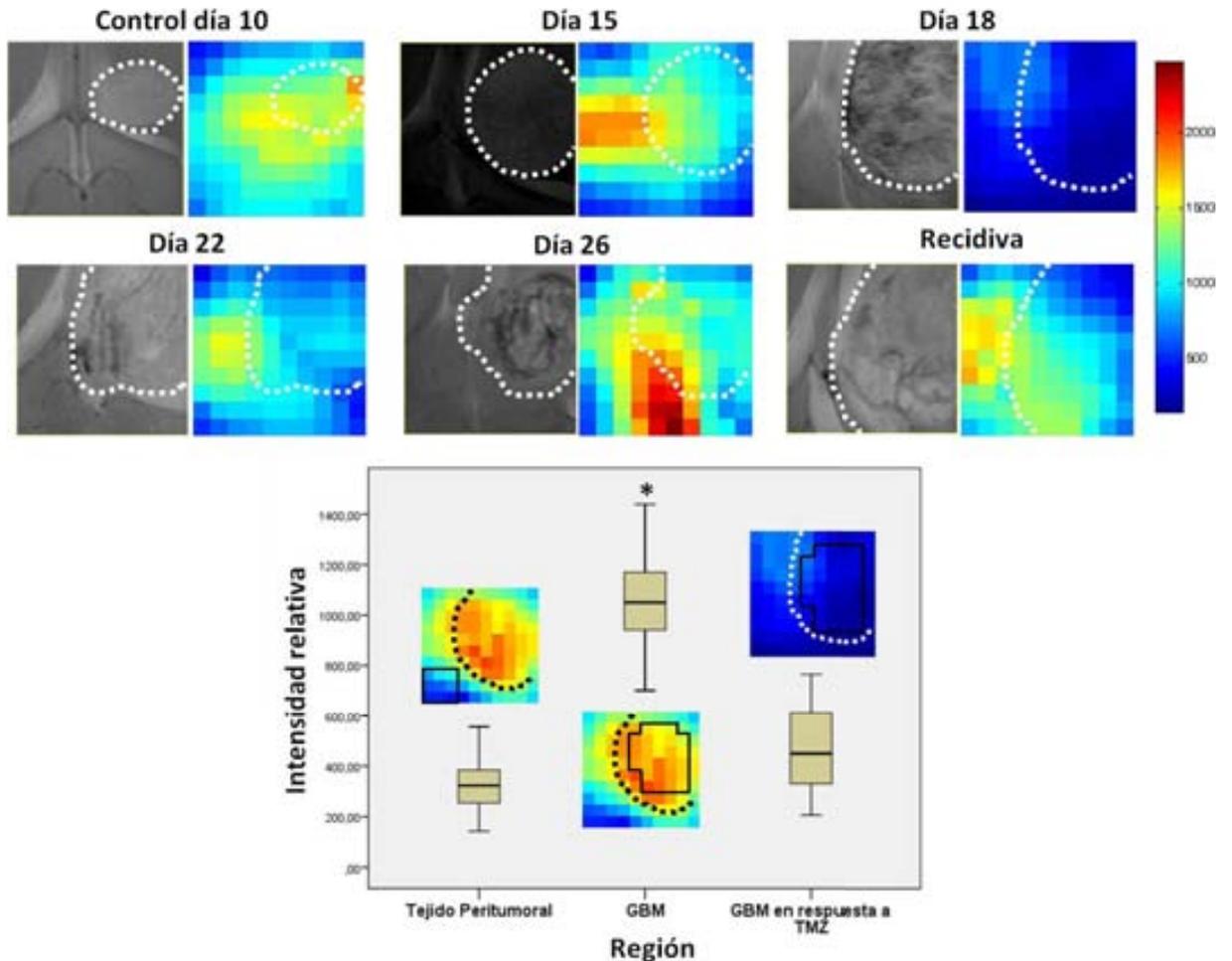


FIGURA 4.34: Mapas representativos de intensidad de DMSO calculados a partir de secuencias de PE-IERM adquiridas en tumores GL261 a diferentes tiempos durante el protocolo de terapia de tres ciclos con TMZ. El orden secuencial de las imágenes es de izquierda a derecha y de arriba abajo. En cada punto temporal se representa la imagen de referencia para la secuencia de IERM (T_{2w} HR) a la izquierda y el mapa de intensidad de DMSO en el punto de máxima acumulación a la derecha. La escala de intensidad es común para todos los mapas y se muestra a la derecha en la figura. En la parte inferior se compara la intensidad de DMSO detectada en el interior de tumores GL261 control ($n=3$) con la detectada en el interior de tumores tratados con TMZ en el momento de máxima respuesta registrada por PE-IERM ($n=3$) y con la región peritumoral/normal ($n=6$) en ratones afectados por tumores del mismo tipo sin tratar. Las regiones analizadas se representan delimitadas por una línea continua negra dentro de los mapas de intensidad de DMSO para los tres casos. La acumulación de DMSO fue significativamente mayor en el interior de los tumores sin tratamiento.

Como puede observarse en la Figura 4.34 el DMSO mostró una retención diferencial variable en los tumores GL261 dependiendo del punto temporal en el que se encontraban dentro del protocolo de tres ciclos de terapia con TMZ. El día antes de iniciar el protocolo (día 10) el compuesto mostró una retención mayor dentro del tumor y en las zonas peri-tumorales. Justo después del primer ciclo de terapia el interior del tumor mostró una disminución en la intensidad de señal de DMSO, lo cual fue todavía más apreciable justo antes de iniciar el segundo ciclo (antes que la respuesta volumétrica detectada por IRM, ver Figura 4.12). En el periodo de respuesta detectable por IRM (días 21-28) la señal del DMSO dentro de las masas tumorales continuó siendo menor que en los tumores control, volviendo a incrementarse durante el período de recidiva. Al comparar estadísticamente la señal de DMSO detectada dentro de un tumor GL261 estándar con la detectada en un tumor en el momento de máxima respuesta a terapia con TMZ caracterizada por PE-IERM y con la registrada en el parénquima cerebral peritumoral/normal, pudo comprobarse que el tumor tratado se comportaba como el parénquima peritumoral, mientras que el tumor GL261 control acumulaba significativamente más DMSO en su interior. Por otra parte, a lo largo del protocolo de administración de TMZ pudo comprobarse como, además de disminuir la concentración de DMSO dentro de los tumores tratados, aparecían regiones de acumulación a modo de *hot-spot* en la periferia de dichos tumores (Figura 4.34).

4.3.1.6 Discusión de los resultados obtenidos por IERM en los tumores tratados con 3 ciclos de TMZ

La IRM combinada con agentes de contraste, como por ejemplo el gadolinio, es el *gold standard* (154) utilizado para el asesoramiento de la eficacia de los tratamientos en los tumores del sistema nervioso central. Sin embargo, una de sus mayores limitaciones es la baja sensibilidad que dicha técnica demuestra a la hora de diferenciar entre tumores en recidiva con cambios producidos por radioterapia (radionecrosis) o edema generado por procesos post-operatorio (155). Además la IRM tiende a subestimar el alcance de las lesiones tumorales, ya que en algunas ocasiones pueden detectarse espectros de patrón tumoral fuera del borde de la masa detectada por IRM (155). La detección de respuesta temprana a terapia es muy importante en el caso de los tumores cerebrales, ya que puede permitir investigar diferentes terapias para un mismo paciente en búsqueda de la más apropiada para cada caso individual, además de frenar una terapia ineficaz a tiempo para mejorar la calidad de vida del paciente. La ERM y la IERM han sido descritas como técnicas eficaces para asesorar en la efectividad del tratamiento de dicha enfermedad, específicamente en lo referente a los cambios detectados en colina en pacientes respondedores y no respondedores a terapia (154): valores elevados en el cociente colina/creatina se asocian con una menor supervivencia libre de progresión tumoral. Dichos cambios pueden ser detectados por IERM antes de que puedan observarse diferencias destacables en las imágenes adquiridas con IRM.

Por otra parte, en el caso de los tumores pediátricos la disminución en el volumen o ralentización en el crecimiento de los tumores cerebrales no siempre es una característica de respuesta a terapia, por lo que la IERM resulta ser una herramienta útil en el seguimiento de dicha patología (156). En este caso se ha comprobado que la disminución de colina total en las masas tumorales se correlaciona con un mejor pronóstico de la enfermedad y un aumento de la supervivencia de los pacientes. Un aumento en la concentración de este metabolito supondría una menor supervivencia, a pesar de que se detecte en tumores que aparentemente están disminuyendo en volumen por efecto de la terapia.

Actualmente se están desarrollando terapias para sectores de población muy concretos basadas en características moleculares determinadas de los tumores. Para detectar si dichas terapias son efectivas en el menor tiempo posible se están buscando y desarrollando biomarcadores, que son características que miden objetivamente y evalúan los procesos biológicos normales, patológicos o en respuesta a intervenciones terapéuticas (157). Los biomarcadores pueden por tanto utilizarse para detectar y monitorizar respuesta temprana a determinados agentes terapéuticos (158). En el caso de la IERM, metabolitos presentes en tumores cerebrales, de mama o próstata (colina, NAA, creatina o lactato) han sido utilizados eficazmente para el diagnóstico y pronóstico de dichas patologías (47). Un biomarcador ideal detectable por imagen para investigar respuesta a terapia debería expresarse en el tejido en estudio y no en tejidos sanos que no están sufriendo la enfermedad, para evitar la detección de falsos positivos. Además, debería ser capaz de detectar respuestas a nivel molecular en el tejido para mejorar el pronóstico de respuesta a agentes dirigidos a mutaciones o vías metabólicas concretas. Asimismo, en el caso de tratarse de agentes exógenos, es importante determinar la toxicidad de los mismos. (158).

En nuestro caso, dados los resultados de la sección anterior (4.3.1.5), proponemos un biomarcador para respuesta a TMZ en GBM murinos: el DMSO. Este compuesto se acumula en condiciones normales dentro de los tumores significativamente más que en el parénquima peritumoral. Sin embargo, cuando los tumores están sometidos a un protocolo de terapia transitoriamente efectivo, se producen cambios moleculares en su interior que hacen que el DMSO deje de retenerse de la manera “estándar”. Dichos cambios son detectables antes de que los cambios de volumen registrados por IRM sean significativos y están siendo caracterizados por estudios histopatológicos en curso actualmente, utilizando marcadores inmunohistoquímicos de diferentes tipos, como marcadores de apoptosis (caspasa 3), de células madre (nestina, CD133), de glía reactiva (GFAP) etc. Los resultados preliminares hasta ahora obtenidos (no mostrados) sugieren que el punto temporal en el que dichos cambios resultan más significativos es el día 18 post-inoculación, justo antes de la administración del

segundo ciclo de terapia, lo cual concordaría con la idea de que el DMSO serviría para detectar respuesta a tratamiento más rápidamente que utilizando secuencias de IRM, convirtiéndolo en un buen biomarcador potencial.

En cuanto a la posibilidad de utilizarlo en estudios clínicos, se ha demostrado que el DMSO (1g/Kg) se excreta totalmente en unas 120 horas post-administración oral en humanos (159). Este compuesto se utiliza habitualmente para el tratamiento de algunas enfermedades, como por ejemplo la cistitis intersticial (160) y como coadyuvante para otras drogas en estudios pre-clínicos (161) y su administración no representa riesgos para la salud humana (162). A pesar de que la detección de DMSO en cerebro humano todavía no ha sido descrita, compuestos similares como la dimetilsulfona han sido observados por ^1H ERM SV tras su administración en pacientes (120,163,164).

En lo referente a cambios detectables en metabolitos propios de los tumores analizados debidos a la administración de terapia, no se analizaron cocientes individuales como en el caso de espectros de ERM, sino que se utilizaron los espectros obtenidos por IERM sin perturbación con DMSO para desarrollar clasificadores que permitiesen diferenciar entre tejido normal, GBM GL261 control y GBM GL261 en respuesta a terapia con TMZ (ver sección 4.3.2.2), obteniendo resultados preliminares satisfactorios.

Una nueva tecnología que se está aplicando recientemente al estudio de tumores cerebrales en respuesta a terapia es la obtención de espectros de IERM mediante la hiperpolarización de ^{13}C de sustancias participantes en el metabolismo tumoral, como por ejemplo el piruvato. Así se ha logrado detectar respuesta a tratamiento incluso dejando transcurrir sólo un día post-terapia, analizando la reducción del cociente lactato/piruvato en las masas tumorales. Esta respuesta contrasta con los resultados obtenidos mediante IRM, que indican que esos mismos tumores continúan creciendo mientras se está dando la respuesta a nivel metabólico (165).

Por último, hay que señalar la presencia de *hot-spots* de acumulación de DMSO en la periferia del tumor durante el protocolo de terapia con TMZ. Mientras la señal de dicho

compuesto pierde intensidad progresivamente en el interior de los tumores, su detección aumenta en regiones focalizadas de tejido, aparentemente normales en imágenes de IRM. Actualmente se están llevando a cabo estudios inmunohistoquímicos en cortes histopatológicos correspondientes a la zona del encéfalo donde se adquirieron las secuencias de PE-IERM para intentar caracterizar mejor el tejido que retiene DMSO durante la respuesta a terapia. Una posible hipótesis que explique este fenómeno sería la presencia de células iniciadoras/madre de glioma (GICs). Esto concordaría con el modelo jerárquico que defienden actualmente muchos autores, según el cual la mayoría de los tumores sólidos se caracterizan por una organización jerárquica en la que existe una pequeña población de células tumorales con características de células madre capaces de regenerar el tumor completamente (166). Este tipo celular se localiza normalmente en la periferia de los vasos sanguíneos tumorales así como en entronos hipóxicos (167) y juega un papel crucial en el crecimiento, invasividad y evasión del sistema inmune de los tumores (92). La localización de las GICs es determinante para determinar su fenotipo y los marcadores que expresan. En condiciones normales dichas células estarían en estado quiescente, pero ante el estímulo de determinadas señales comienzan a proliferar y a diferenciarse (168). En nuestro caso podríamos suponer que las células tumorales diferenciadas que proliferan son las que resultan vulnerables a la administración de TMZ. Una vez que gran parte de la masa tumoral se ha visto afectada por el agente terapéutico, las GICs remanentes recibirían señales para proliferar y diferenciarse y así regenerar la masa perdida, y es este proceso el que podríamos estar visualizando a través de la acumulación de DMSO.

Por otro lado, las GICs están asociadas con microglía y macrófagos, que representan la mayor población de células infiltrantes inflamatorias en los gliomas malignos (pueden constituir el 5-30% del glioma) y que promueven el crecimiento, la invasividad y la angiogénesis (169). El número de estas células infiltrantes varía según el grado de malignidad del tumor, aumentando proporcionalmente con la agresividad (92). La astrogliosis es un fenómeno que se ha descrito como relacionado con el crecimiento tumoral y que se localiza principalmente en la periferia del tumor, existiendo un intercambio de información a modo de señalización continua entre ambas

zonas de tejido (98). Esta relación genera el microambiente necesario para que se desarrolle la masa tumoral. Teniendo estos hechos en cuenta, otra hipótesis a estudiar es que los “hot-spots” que estamos viendo alrededor de la masa sólida del tumor durante la respuesta a terapia tengan contribución de esta población de glía reactiva, que se está activando considerablemente en respuesta a las señales emitidas por el tumor en tratamiento. Este tipo de células ha sido también detectado en el caso de metástasis cerebrales originadas a partir de cáncer de pulmón y ha sido reportado como el inductor del crecimiento del tumor en un órgano diferente al de origen (97). En nuestro caso estamos llevando a cabo una revisión completa de los mejores marcadores propuestos para detectar los dos tipos de poblaciones celulares y ya hemos iniciado algunos estudios dirigidos a caracterizar la región de parénquima cerebral que retiene DMSO en forma de “hot spot” durante el protocolo de terapia con TMZ.

4.3.2 OBTENCIÓN DE CLASIFICADORES DE TUMORES CEREBRALES BASADOS EN LOS EFECTOS DE LA HIPERGLICEMIA (MODELO ORTOTÓPICO DE GBM MURINO Y MODELO GEM) Y DEL TRATAMIENTO CON TMZ (MODELO ORTOTÓPICO DE GBM MURINO).

4.3.2.1 Clasificadores de gliomas alto y bajo grado (GL261, GEM) mediante PE-IERM con glucosa

Dada la experiencia previa del grupo en alterar el patrón espectral de tumores cerebrales murinos mediante hiperglicemia transitoria en condiciones de hipotermia ligera (~30°C) (107,108), se decidió investigar la posibilidad de generar imágenes moleculares/nosológicas mostrando la clasificación diferencial de dichos tumores a partir del patrón espectral detectado mediante ERM/IERM.

Para conseguir llegar a esto, se desarrolló un clasificador (con datos obtenidos anteriormente en el grupo) de estudios PE-IERM con glucosa en tumores GL261 y ODG de animales transgénicos. La idea en este caso era optimizar la clasificación de tumores de alto y bajo grado y perfeccionar dicho sistema para conseguir posteriormente la distinción de tumores de un mismo grado/tipo con alguna característica molecular diferencial que permitiese predecir

respondedores o no respondedores a un cierto tipo de terapia. Se utilizaron para el desarrollo del clasificador seis tumores GL261 y tres ODG, cuyos patrones espectroscópicos promedio a TEC y TEL junto con el patrón del tejido peritumoral circundante extraídos de estudios de IERM se muestran en la parte superior de la Figura 4.35. Los tumores de los animales GEM fueron clasificados en clase y grado por histopatología, utilizando las características descritas anteriormente en la sección 4.3.1.2 b. Dos de ellos resultaron ser ODG-II y el tercero ODG-II con zonas de transición a grado IV (fue el animal S768 utilizado también en los estudios de PE-IERM con DMSO). Ante estos resultados se decidió incluir a los ODG de bajo grado en el grupo de entrenamiento y al ODG en transición en el grupo de test, para ver si los clasificadores diseñados eran capaces de clasificar correctamente las distintas regiones de tejido tumoral.

El tiempo destinado al desarrollo de cada clasificador (sección 3.8), utilizando un ordenador con 2,4 GHz de CPU (unidad central de procesamiento) y 3 GB (gigabytes) de RAM (*random access memory*), fue de unos cinco minutos para la selección de las variables (ppm de los espectros correspondientes a características espectrales de metabolitos que permitiesen la distinción entre tipos tumorales) y tres segundos para realizar el análisis lineal discriminante de Fisher, incluyendo los datos de los grupos de entrenamiento y test. Con los grupos de entrenamiento se obtuvieron clasificadores con un 90 % de acierto, evaluados por *Bootstrapping*, al seleccionar al menos 5 variables. Las características espectrales seleccionadas se muestran en el Anexo 5.

Sin embargo, la evaluación de la robustez de los clasificadores con los grupos de test independientes demostró que los mejores resultados eran los obtenidos con espectros adquiridos a TEC en hiperglicemia (BER < 5 %), con cuatro y catorce variables seleccionadas mediante el sistema SFFS. En el caso de cuatro variables el sistema seleccionó las siguientes: 1,28 ppm (lípidos móviles, lactato), 1,47 ppm (alanina), 2,14 ppm (glutamina/glutamato, glutatión), 3,56 ppm (mio-inositol, glicina, glucosa). En el resto de clasificadores desarrollados a partir de los otros grupos de espectros se observaron características de sobre-entrenamiento (BER > 14 %), demostrando que dichos clasificadores no presentaban resultados robustos al

intentar clasificar datos completamente nuevos introducidos en el sistema. Los resultados obtenidos con los espectros a TEC en hiperglicemia y selección de cuatro y catorce variables se muestran también en la Figura 4.35 utilizando el espacio latente bidimensional del LDA de Fisher. El grupo de entrenamiento se clasifica mejor utilizando catorce variables (100% acierto), mientras que el clasificador obtenido con cuatro variables resulta ser más robusto al analizar el grupo de test. En el caso del ODG heterogéneo que fue utilizado en el grupo de test independiente los resultados se muestran en forma de mapa nosológico. Utilizando el clasificador de cuatro variables algunos spv pertenecientes al ODG se clasificaron incorrectamente como GBM; sin embargo, un análisis más exhaustivo utilizando las muestras histopatológicas y las imágenes T_{1w} -CE demostró que los spv mal clasificados se encontraban en la región con características de grado IV (tejido transicional).

El análisis de LOO para comprobar la reproducibilidad de los clasificadores confirmó que los espectros adquiridos a TEC en condiciones de hiperglicemia e hipotermia permitían obtener los mejores resultados tanto con el grupo de entrenamiento ($\geq 95\%$ de precisión utilizando incluso sólo dos variables) como con el de test ($\leq 10\%$ BER con al menos cuatro variables), e incluso combinando ambos grupos ($\geq 90\%$ de acierto global utilizando de cuatro variables en adelante).

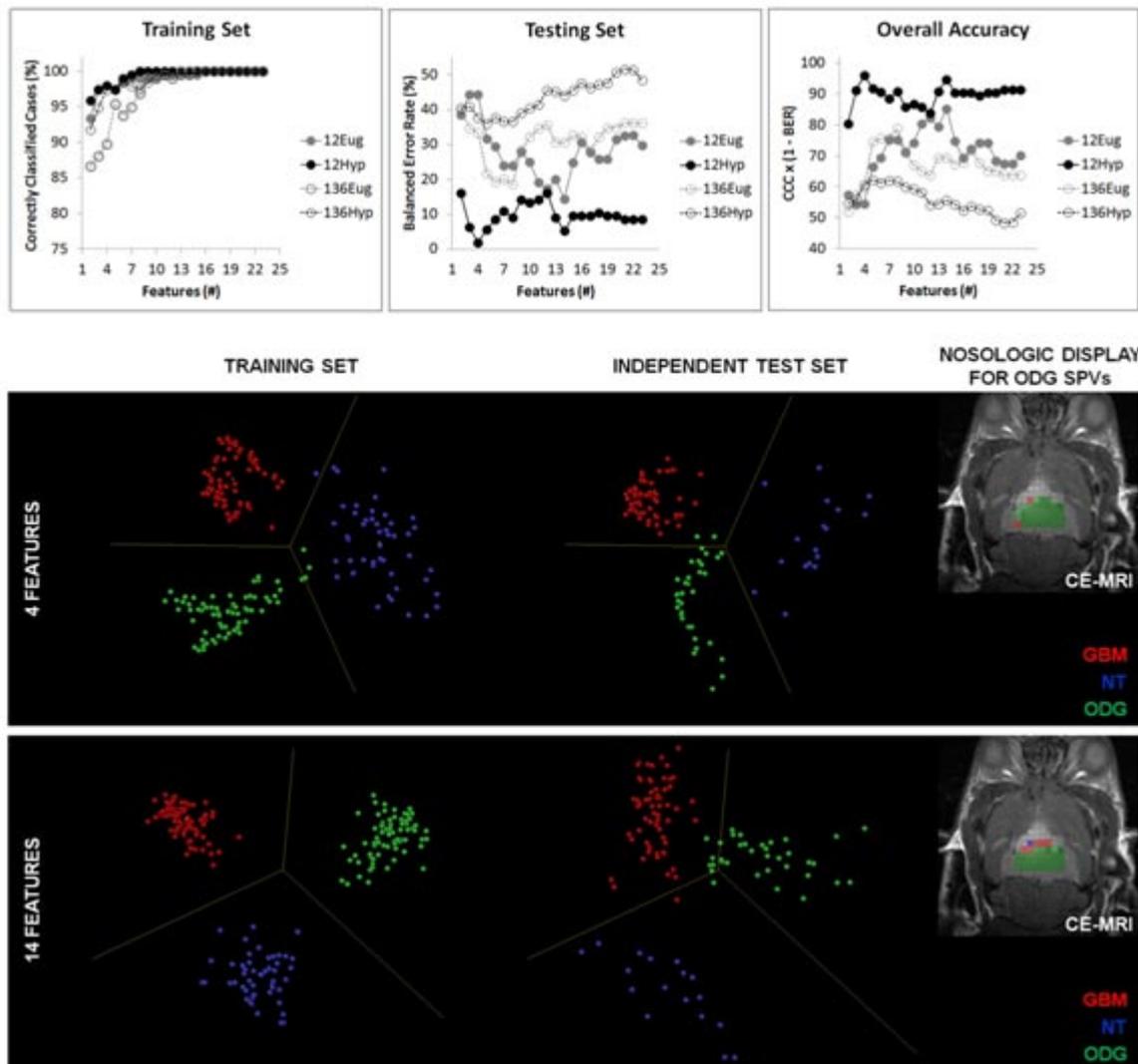


FIGURA 4.35: Evaluación del clasificador desarrollado para la discriminación entre GBM vs ODG vs NT y mapas nosológicos derivados. Arriba se representan todas las variables exploradas y el número de casos correctamente clasificados (CCC) evaluados por *Bootstrapping* para el grupo de entrenamiento (gráfico a la izquierda) y las variables con el valor de BER obtenido para el grupo de test (gráfico central). En parte inferior de la imagen se muestra el espacio latente para el clasificador obtenido con el LDA de Fisher para el grupo de spv de TEC en hiperglicemia con cuatro (centro) y catorce variables (abajo). La distribución de los casos se muestra a modo de mapa bidimensional para el grupo de entrenamiento (izquierda) y de test (centro) con los spv de tejido normal en azul, los de GBM en rojo y los de ODG en verde. Las fronteras que dividen los tres grupos según el clasificador desarrollado se representan en amarillo. A la derecha puede verse el mapa nosológico correspondiente al animal con histopatología heterogénea S768 utilizado en el grupo de test, superpuesto sobre una imagen de T_{1w} -CE.

4.3.2.2 Clasificadores de GBM y GBM respondiendo a terapia con TMZ.

Una vez se hubo diseñado un clasificador robusto para tumores cerebrales murinos de alto y bajo grado a partir de espectros obtenidos de secuencias de IERM en hiperglicemia, se llevo a cabo el desarrollo de un clasificador capaz de diferenciar entre GBM murinos estándar y GBM respondiendo a terapia (según lo detectado por IRM y ERM en las secciones 4.2.1.2.a y 4.2.1.3) en condiciones de normotermia. Además se desarrollaron imágenes moleculares/nosológicas para tumores tratados y no tratados a partir de este nuevo clasificador según lo descrito en la sección anterior (4.3.2.1).

Se utilizaron para ello nueve tumores GL261 estándar y ocho tumores del mismo tipo tratados con TMZ, en el momento de respuesta detectable por IRM (entre los días 21 y 26 post-implantación). Los patrones espectroscópicos promedio a TEC junto con el patrón del tejido peritumoral circundante extraídos de estudios de IERM con dichos animales se muestran en el Anexo 4. Las secuencias de IERM seleccionadas para extraer los spv correspondientes fueron, en primer lugar, las adquiridas antes de la inyección intraperitoneal de DMSO. Posteriormente se realizaron más pruebas utilizando las secuencias de máxima acumulación de DMSO en cada animal para comprobar si la señal de DMSO mejoraba los resultados obtenidos con el clasificador.

El tiempo y metodología utilizados para el desarrollo de dicho sistema de clasificación fueron los mismos que los comentados previamente para el clasificador de tumores GL261 y ODG en hiperglicemia. Con el grupo de entrenamiento utilizando spv sin DMSO, se obtuvo un clasificador con un 93,77 % de acierto (evaluados por *Bootstrapping*), al seleccionar al menos 13 variables. Las características espectrales seleccionadas se muestran en el Anexo 5.

La evaluación de la robustez de los clasificadores con el grupo de test independiente demostró que los mejores resultados eran los obtenidos con doce variables ($BER < 6\%$) (Anexo 5), entre las que se encontraron las siguientes: 1,01 ppm (ML), 1,28 ppm (ML, lactato), 2,02 ppm (NAA), y 2,84 ppm (AML). El grupo de entrenamiento se clasificó mejor utilizando veinte

variables (96,5 % acierto); sin embargo, el clasificador obtenido con doce variables resultó ser más robusto al analizar el grupo de test (Figura 4.36). En dos de los casos incluidos en el grupo de test independiente los resultados se muestran en forma de mapa nosológico.

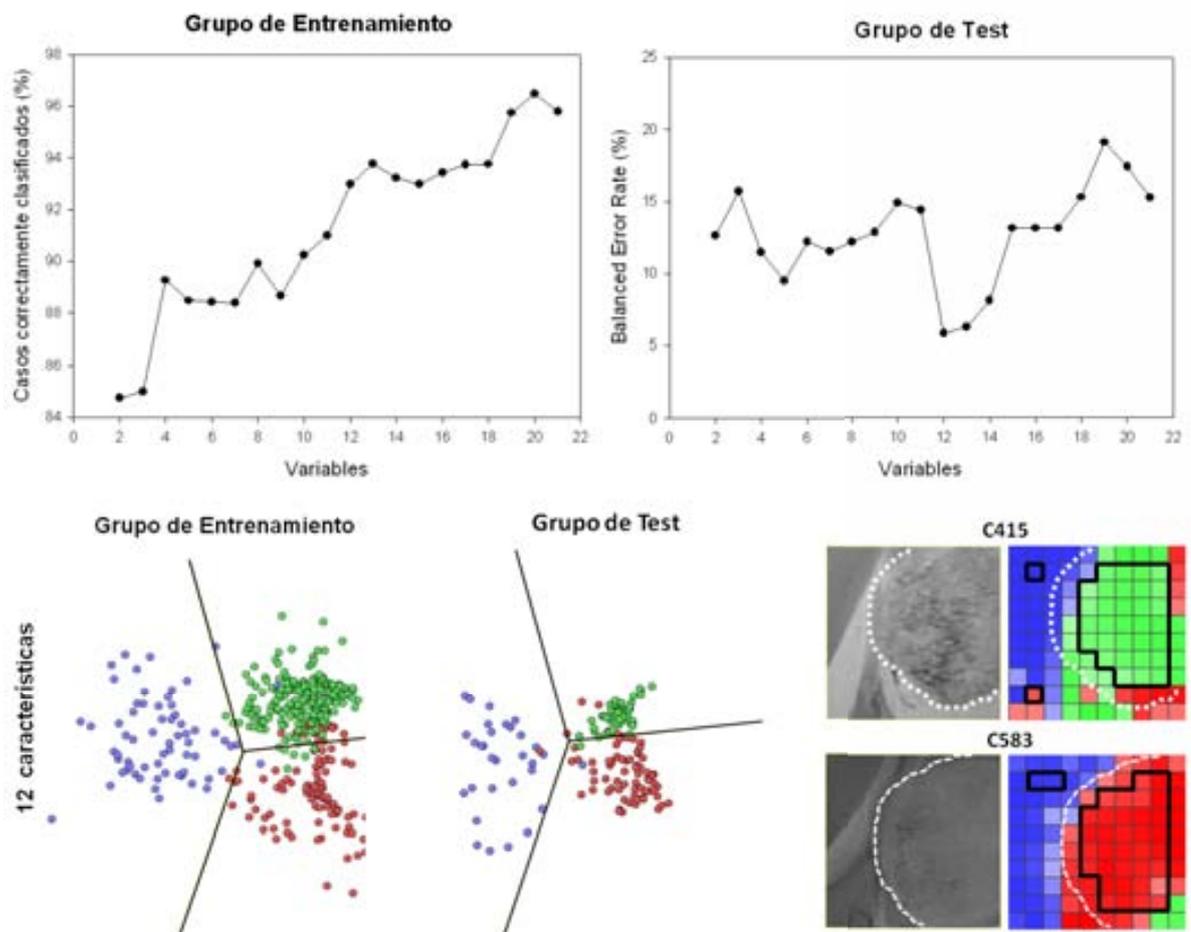


FIGURA 4.36: Clasificador para GBM control y GBM respondiendo a terapia con TMZ. En la parte superior se muestra el número de casos correctamente clasificados (CCC) evaluados por *Bootstrapping* para el grupo de entrenamiento (gráfico a la izquierda) y las variables con el valor de BER obtenido para el grupo de test (gráfico a la derecha). En parte inferior de la imagen se muestra el espacio latente del clasificador obtenido con el LDA de Fisher utilizando doce variables (izquierda). La distribución de los casos se muestra a modo de mapa bidimensional para el grupo de entrenamiento (izquierda) y de test (derecha) con los spv de tejido normal en azul, los de GBM en rojo y los de GBMr en verde. Las fronteras que dividen los tres grupos se representan en negro. A la derecha pueden verse los mapas nosológicos

correspondientes a los animales C385 y C415 (control y tratado respectivamente) incluidos en el grupo de test, superpuestos sobre la imagen de referencia para IERM (T_{2w} HR).

4.3.2.3 Discusión de los resultados obtenidos con clasificadores para GBM, GBM en respuesta a terapia y ODGs.

Estos resultados demuestran que es posible desarrollar clasificadores robustos para tumores cerebrales en modelos preclínicos murinos basados en datos de IERM, de una manera rápida y semi-automática, utilizando un grupo de test independiente para evaluarlos. Todo ello es posible utilizando el software de acceso gratuito *SpectraClassifier 3.0* (62).

De acuerdo con resultados previos (107,108), la hiperglicemia inducida no produjo cambios notables en los espectros adquiridos a TEL, por lo que no se detectó una clara mejoría en los clasificadores que utilizaron dichos datos al pasar de euglicemia a hiperglicemia. Sin embargo, en el caso de los espectros adquiridos a TEC (12 ms), la perturbación del patrón provocada por la glucosa permitió optimizar los clasificadores y aumentar su robustez. En el caso del clasificador para tumores control y tratados con TMZ se pudieron clasificar los datos de manera bastante precisa en ausencia de perturbación del patrón de IERM. Sin embargo, la adquisición de dichos datos tras la inyección de DMSO fue crucial para la selección de spv dentro de cada caso, evitando aquellos que estando fuera del volumen tumoral detectable por IRM mostraban un claro *hot-spot* de acumulación de DMSO y, por tanto, pertenecían a tejido de origen “dudoso” en cuanto a su idoneidad para ser usado en el conjunto de entrenamiento.

Para evitar el sobre-entrenamiento que puede producirse al seleccionar demasiadas características para el LDA (170,171); es decir, generar un clasificador con un buen resultado para un conjunto de datos específicos pero que no resulte útil a la hora de clasificar nuevos casos independientes, el número de características seleccionadas fue, aproximadamente, tres veces menor que el de casos spvs en el grupo más pequeño del conjunto de entrenamiento (172). Sin embargo, el criterio definitivo acerca de la robustez de los clasificadores siempre fue el resultado obtenido con el conjunto de test independiente (173).

A pesar de que los clasificadores fueron diseñados con un número elevado de variables y pocos casos, resultaron ser extremadamente descriptivos (CCC) y predictivos (BER) en el conjunto de test.

Los espectros adquiridos con 12 ms de TE en hiperglicemia e hipotermia permitieron el desarrollo de los clasificadores más robustos para los grupos de entrenamiento y test, independientemente del número de características seleccionadas. En el caso de selección de cuatro variables se obtuvieron valores de CCC del 98 % y BER del 2 %. El análisis de LOO con ese mismo número de características reportó valores de CCC del 97% y BER del 11%. De ello puede deducirse que la hiperglicemia es capaz de provocar cambios en las vías metabólicas celulares que se reflejan en los patrones de IERM y que por tanto son útiles para el diseño de clasificadores basados en dicha información. Este hecho fue observado en la representación nosológica de los resultados de los diferentes clasificadores (Figura 4.35), en donde los patrones espectrales de GBMs y ODGs fueron correctamente identificados tanto en el grupo de entrenamiento como en el de test, al mismo tiempo que fueron diferenciados del parénquima cerebral normal.

Las posiciones en ppm seleccionadas por el método SFFS para el clasificador de 12 ms en hiperglicemia correspondían a la posición de metabolitos involucrados en el metabolismo energético, por ejemplo en la glicolisis, ciclo del ácido cítrico y vías asociadas: glucosa, lactato, alanina, glicina y glutamina/glutamato. En el caso del clasificador para tumores GL261 control o en respuesta a terapia y parénquima cerebral normal, las principales variables seleccionadas (correspondientes a las resonancias de AML, ML y lactato) participarían fundamentalmente en la discriminación entre ambos tipos de tumor, describiendo estados de proliferación y apoptosis entre otros. Esto concuerda con lo descrito previamente por otros autores (135) acerca de que la concentración de AML aumenta con la apoptosis en respuesta a terapia (especialmente a Ganciclovir). Por otro lado, las variables correspondientes a NAA, creatina y quizás mio-inositol/glicina y glutamato/glutamina diferenciarían tejido tumoral (control o en respuesta) frente a tejido normal.

Anteriormente se han descrito métodos de representación de imágenes nosológicas para datos de IERM clasificados mediante LDA en tumores cerebrales humanos explorados a 1,5 T. El primer caso, publicado por De Edelenyi et al (126), utilizó métodos de clasificación muy similares a los descritos por Preul et al (174): seis áreas de resonancias de metabolitos normalizadas además de la intensidad media del agua normalizada (obtenida a partir de secuencias de IRM T_{2w}) fueron utilizadas como características para el LDA. Posteriormente, Simonetti et al (51) utilizaron el sistema de análisis de componentes principales (PCA) con un conjunto de entrenamiento basado en siete características extraídas de espectros de IERM y cuatro características de IRM. Esta estrategia fue también seguida por De Vos et al (127) y Luts et al (18,175). Ambos autores utilizaron áreas integradas de picos como características de IERM, aunque Luts et al (175) subrayaron también la relevancia de utilizar métodos objetivos de selección de características para el desarrollo de DSS en aplicaciones clínicas.

En nuestro caso, las imágenes nosológicas obtenidas no contienen ninguna característica extraída de secuencias de IRM sino solamente de secuencias de IERM. Por lo tanto, nuestro modelo podría mejorar potencialmente incluyendo parámetros de este tipo. Sin embargo, es necesario mencionar que en nuestro caso se aplicó un método de selección automático (SFFS) que no requiere un análisis previo cuantitativo de los datos, como se propone en (175), lo que contribuye a que el desarrollo del clasificador sea semi-automático.

En lo referente al desarrollo de los clasificadores, hemos utilizado el mismo método que en (51,126,174): el LDA. Edelenyi et al (126) utilizaron como método de asignación de pixels a una clase determinada el siguiente umbral: el cociente entre el más alto y el segundo más alto. Los pixels por debajo de este valor quedaron sin clasificar. Simonetti et al (51) también utilizaron un umbral, en este caso basado en el criterio de la distancia de Mahalanobis, para calcular la probabilidad de los diferentes pixels de pertenecer a una clase u otra, así como para identificar casos solapados entre clases que fueron definidos como de clase desconocida. En nuestro caso, la probabilidad de pertenencia a una clase fue codificada como el nivel de intensidad de color, siendo los píxeles con menor intensidad los menos probables de pertenecer a una clase determinada (bajo nivel de confianza en la predicción). Sólo se clasificaron como desconocidos

los spv del ODG transicional pertenecientes a la zona frontal del tumor, clasificada por histopatología como zona de transición entre grados II y IV.

Otra limitación potencial de nuestro sistema es en que los métodos de clasificación basados en LDA utilizados, hemos considerado todos los voxels pertenecientes al mismo ratón como casos independientes entre sí. En el caso de los spv mal clasificados (spv “outliers”) pero rodeados de spv correctamente etiquetados sería interesante que la imagen nosológica tuviese en cuenta esta información, por ejemplo etiquetando la propuesta de asignación a clase de dicho spv/voxel como dudosa. A este respecto, los sistemas desarrollados por De Vos et al (127), Luts et al (18) y Laudadio et al (176) se basan en el análisis de correlación canónica (CCA) en vez de en el LDA y tienen en cuenta el efecto de los voxels vecinos al producir las imágenes nosológicas y por tanto cuentan con la información espacial de las matrices de IERM. Así mismo, técnicas de reconocimiento de patrones para la detección de “outliers” (177) pueden resultar útiles en este caso. Esto último unido a la inclusión de características de IRM podría ayudar a una mejor delimitación de los diferentes tejidos, especialmente cuando hay muchas clases incluidas en el clasificador (tipos, grados y/o subtipos) o cuando se trabaja con regiones heterogéneas o limítrofes entre dos tipos de tejido, como en el caso de los tumores gliales infiltrantes (60,176). Todo esto nos serviría, por ejemplo, en la clasificación de regiones que muestran características de dos tipos diferentes de tejido, como es el caso del ODG en transición (S768), el cual tiene características de ODG-II y IV.

En resumen, los patrones de IERM de parénquima cerebral normal de ratón, GBM y ODG de bajo grado son fácilmente diferenciables mediante el reconocimiento de patrones semi-automático. La hiperglicemia inducida provoca cambios en el patrón espectral a TEC que permite mejorar el acierto en la predicción de los clasificadores. Esto ilustra el interés potencial de los protocolos de IERM con perturbación para mejorar la caracterización no invasiva de tumores cerebrales a nivel preclínico y quizás, en un futuro, clínico, además de insinuar su utilidad en la investigación de la heterogeneidad regional existente en muchos tumores cerebrales. En lo referente a clasificadores para tumores tratados, también se ha demostrado el

potencial de este sistema de clasificación para discernir entre tumores que responden a un tratamiento determinado y los que aún no lo hacen, de manera que, después del correspondiente proceso de implementación y validación, dichos clasificadores podrían quizás tener aplicación en casos clínicos de seguimiento de respuesta temprana a terapia. Podría plantearse para estudios futuros una convergencia de metodologías entre las perturbaciones generadas con inyección de glucosa o DMSO para intentar diferenciar dentro de un mismo tumor regiones con distinta respuesta a la terapia y zonas de recidiva tumoral. Además sería interesante incluir espectros de tumores en las primeras fases del protocolo de terapia con TMZ para ver si las diferencias sirven para clasificarlos ya desde el inicio del tratamiento.

5. DISCUSIÓN GENERAL

A modo de resumen, estos son los resultados principales que se han obtenido a lo largo de este trabajo y las hipótesis de trabajo y conclusiones que se pueden extraer de ellos:

Se ha establecido un protocolo de terapia basado en la administración de TMZ en tres ciclos que produce respuesta detectable por IRM y ERM en los GBM murinos de células GL261, además de incrementar la supervivencia de los animales tratados. Este fármaco provoca un estado de crecimiento estacionario tras el segundo y tercer ciclo de terapia, además de producir cambios detectables en el patrón espectral de dichos tumores y por lo tanto en su metabolómica *in vivo*.

Tras un ciclo de terapia no se detectaron cambios significativos a nivel volumétrico en los tumores pero sí se observaron diferencias metabólicas: aumento de los cocientes AML/creatina, colina/creatina y ML/creatina. Las señales correspondientes a ML y AML son muy sensibles y buenos marcadores para detectar cambios metabólicos debidos a terapia, aumentando significativamente en casos de apoptosis (135). Estos resultados indican que la ERM detecta cambios más tempranos debidos a la acción del tratamiento sobre los tumores GL261 que los detectados por la IRM.

Sería interesante optimizar el punto temporal de respuesta a TMZ adelantándolo a estadios tumorales menos avanzados (por ejemplo iniciando el primer ciclo de terapia justo después de la inoculación de las células GL261 o incluso antes) para poder realizar un mayor número de pruebas combinando protocolos de terapia y de seguimiento con diferentes técnicas (por ejemplo con difusión) sin que los animales se vean demasiado afectados físicamente.

Otros agentes terapéuticos aplicados a dicho modelo no resultaron efectivos a nivel de supervivencia y de detección de respuesta por IRM (Metformina, Minerval o DCA), aunque

serían necesarios más estudios con distintas dosis y protocolos de administración para obtener conclusiones definitivas. Un ejemplo de estudios para planificar en un futuro serían los de terapia combinada de TMZ con el resto de agentes testeados, para comprobar si, aunque por si solos no son capaces de producir efectos de respuesta detectables en los tumores, resultan útiles como coadyuvantes de la TMZ. Este planteamiento se basaría en el trabajo de algunos autores como Zhu et al., Yamini et al. y Tentori et al., quienes han demostrado que la TMZ ejerce un efecto más eficaz en la supervivencia de los animales tratados cuando está combinada con otros agentes terapéuticos como anticuerpos contra la quimiocina CCL2, radioterapia, TNF- α o inhibidores de la poli-ADP ribosa polimerasa (75,130,131).

Por otro lado, el uso del DMSO como vehículo de administración de la TMZ ha permitido la detección de su señal por ERM en el parénquima cerebral normal de ratón y en GBM y ODG de bajo grado a 2,72 ppm, así como la caracterización de su curva de lavado en los diferentes tejidos. Los resultados obtenidos sugieren un nuevo potencial para este compuesto, ya que su acumulación diferencial aporta contraste en tumores de bajo y alto grado respecto al parénquima cerebral normal. Además, este contraste se obtiene tanto si la BHE está intacta como si está rota, lo cual aporta ventajas tangibles respecto a otros medios de contraste actualmente utilizados, como por ejemplo el gadolinio (143). El mecanismo de unión preferencial del DMSO al tejido tumoral sigue en estudio, así como la heterogeneidad en su acumulación en algunos tumores, posiblemente debida a las características de perfusión concretas de cada uno. No se ha podido comprobar la hipótesis de unión del DMSO a las gotículas lipídicas presentes en el citoplasma de las células tumorales, por lo que es necesario elaborar una nueva hipótesis de interacción entre dicho compuesto y el tejido tumoral.

Sin embargo, se ha comprobado mediante estudios por PE-IERM que los tumores tratados con TMZ muestran una acumulación de DMSO diferente a la de los tumores estándar sin

tratamiento. La retención de este compuesto varía dentro de los tumores tratados a lo largo del protocolo de tres ciclos, disminuyendo significativamente justo antes del inicio del segundo ciclo y aumentando de nuevo durante la recidiva tumoral, lo que indica que la IERM detecta respuesta a terapia en nuestro modelo de manera más temprana que la IRM (154,156). Esto revelaría otro potencial para el DMSO como biomarcador de respuesta temprana a terapia en tumores cerebrales (158).

Además, se han detectado *hot-spots* de acumulación de DMSO en el tejido peritumoral durante la respuesta a la terapia con TMZ, por lo que estudios futuros irán destinados a caracterizar el tipo de células presentes en dichas áreas para intentar comprender mejor el mecanismo de unión del DMSO. Dos posibles hipótesis al respecto serían las siguientes: Bien que en dicha región se está produciendo un incremento en la actividad de las células madre iniciadoras de glioma (GICs) para subsanar las parte del tumor que han sido diezmadas por efecto de la terapia (92,166), o bien que la glia reactiva que está en estrecha relación con el tumor está siendo activada para contribuir a la proliferación y regeneración tumorales (92,98). Si alguno de estos supuestos llegase a demostrarse, se podría pensar en desarrollar un protocolo de terapia para este modelo tumoral enfocado a estas poblaciones celulares, obligándolas a entrar en ciclo continuamente para pasar a ser sensibles a la TMZ, por ejemplo.

Finalmente, se han realizado estudios preliminares que demuestran que los espectros adquiridos por IERM en tumores GL261 control y tratados con TMZ pueden utilizarse en un sistema de clasificación automatizado para detectar características metabólicas que diferencien entre tumores que responden o no responden al tratamiento. La selección de los spv a utilizar en dicho clasificador dependería de los estudios PE-IERM con DMSO previos, los cuales indicarían aquellos espectros correspondientes a tejido de origen “dudoso” que acumula DMSO fuera de la región tumoral y que podrían confundir al sistema por tener características espectroscópicas diferentes al resto.

Por último, cabe señalar que sería interesante llevar a cabo los protocolos de terapia y detección de respuesta temprana por PE-IERM con DMSO, así como el desarrollo de mejores clasificadores para tumores control y sensibles al tratamiento utilizando modelos transgénicos de tumores cerebrales de bajo grado como el de ODG descrito en este trabajo, así como modelos *xenograft* de tumores cerebrales humanos. De esta manera se podría comprobar si el protocolo de TMZ desarrollado es igual de efectivo en diversos tipos de tumores o si el DMSO sirve como biomarcador general de respuesta a terapia y no es sólo efectivo en nuestro modelo ortotópico de GBM.

6. CONCLUSIONES

- Se ha puesto a punto un protocolo de terapia basado en tres ciclos de TMZ para un modelo ortotópico de GBM murino (GL261).
- Se ha detectado respuesta a la terapia en el modelo GL261 de GBM mediante medición del volumen de los tumores tratados a partir de imágenes adquiridas por IRM y mediante el estudio del patrón espectroscópico pre y post-terapia a partir de secuencias de ERM.
- Se han iniciado estudios combinando la administración de TMZ y el seguimiento con imagen molecular basada en IERM en animales Swiss nude inoculados con muestras de GBM humano de pacientes respondedores y no respondedores a terapia.
- Se ha demostrado el potencial del DMSO como agente de contraste para tumores cerebrales de alto y bajo grado.
- Se ha detectado respuesta temprana a terapia en el modelo GL261 de GBM a través de secuencias PE-IERM con inyección i.p. de DMSO.
- Se han obtenido imágenes moleculares de tipo nosológico de grado y tipo de tumor glial preclínico basadas en el patrón metabolómico detectado por IERM de perturbación.
- Se ha utilizado la imagen molecular basada en IERM de perturbación con DMSO para diferenciar zonas de tumor en respuesta a terapia de otras con patrón anómalo (“hot-

spots”). Dicha información a permitido un correcto entrenamiento de los clasificadores utilizados para producir imagne molecular de tipo nosológico de respuesta a la terapia.

- Se han obtenido imágenes moleculares de tipo nosológico de respuesta temprana a terapia en GBM preclínico (GL261) basadas en el patrón metabólico basal detectado por IERM.

7. REFERENCIAS

1. Rabi I. A new method of measuring nuclear magnetic moment. *Phys Rev* 1938; 53:318.
2. Filler AG. The History, Development and Impact of Computed Imaging in Neurological Diagnosis and Neurosurgery: CT, MRI, and DTI. *Nature precedings* 2009.
3. Damadian R. Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science* 1971;171:1151-1153.
4. Lauterbur PC. Image formation by induced local interactions: Examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature* 1973; 242:190-191.
5. Ernst R; United States Patent Office, assignee. Gyromagnetic resonance fourier transform zeugmatography. US. 1978.
6. Gadian DG. NMR and its applications to living systems. In: Publications NYOS, editor. 2nd ed; 1996.
7. Westbrook C. MRI at a Glance: Blackwell Science Ltd.; 2002.
8. Majos C, Alonso J, Aguilera C, Serrallonga M, Perez-Martin J, Acebes JJ, Arus C, Gili J. Proton magnetic resonance spectroscopy ((¹H MRS) of human brain tumours: assessment of differences between tumour types and its applicability in brain tumour categorization. *Eur Radiol* 2003; 13(3):582-591.
9. Catherine Westbrook CK. MRI in Practice. 2nd ed: Blackwell Science Ltd., Osney Mead, Oxford; 1998.
10. Mark A. Brown RCS. MRI BASIC PRINCIPLES AND APPLICATIONS. 3rd ed: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.; 2003.
11. Garcia I, Marradi M, Penades S. Glyconanoparticles: multifunctional nanomaterials for biomedical applications. *Nanomedicine (Lond)*; 5(5):777-792.
12. Gili Planas JCC, A., editor. Resonancia Magnética: Centre Diagnòstic Pedralbes DL: Barcelona; 1992.

13. Weybright P, Maly P, Gomez-Hassan D, Blaesing C, Sundgren PC. MR spectroscopy in the evaluation of recurrent contrast-enhancing lesions in the posterior fossa after tumor treatment. *Neuroradiology* 2004; 46(7):541-549.
14. Brown TR, Kincaid BM, Ugurbil K. NMR chemical shift imaging in three dimensions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79(11):3523-3526.
15. Segebarth CM, Baleriaux DF, Luyten PR, den Hollander JA. Detection of metabolic heterogeneity of human intracranial tumors in vivo by ¹H NMR spectroscopic imaging. *Magn Reson Med* 1990; 13(1):62-76.
16. Grütter R. Automatic, localized in Vivo adjustment of all first-and second-order shim coils. *Magnetic Resonance in Medicine* 1993; 29(6):804-811.
17. Pohmann R, Rommel E, von Kienlin M. Beyond k-space: spectral localization using higher order gradients. *J Magn Reson* 1999; 141(2):197-206.
18. Luts J, Laudadio T, Idema AJ, Simonetti AW, Heerschap A, Vandermeulen D, Suykens JA, Van Huffel S. Nosologic imaging of the brain: segmentation and classification using MRI and MRSI. *NMR Biomed* 2009; 22(4):374-390.
19. Simões RV, Candiota AP, Julià-Sapé M, C. A. Chapter 33 - In vivo Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging (MRSI) and ex vivo Quantitative Neuropathology by High Resolution Magic Angle Spinning Proton Magnetic Resonance Spectroscopy (HRMAS).
20. Tkac I, Rao R, Georgieff MK, Gruetter R. Developmental and regional changes in the neurochemical profile of the rat brain determined by in vivo ¹H NMR spectroscopy. *Magn Reson Med* 2003; 50(1):24-32.
21. Millis KK, Maas WE, Cory DG, Singer S. Gradient, high-resolution, magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy of human adipocyte tissue. *Magn Reson Med* 1997; 38(3):399-403.
22. Cheng LL, Ma MJ, Becerra L, Ptak T, Tracey I, Lackner A, Gonzalez RG. Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(12):6408-6413.

-
23. Sitter B, Bathen T, Tessem M, Gribbestad I. High-resolution magic angle spinning (HR MAS) MR spectroscopy in metabolic characterization of human cancer. *J Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 2009; 54(3):239-254.
 24. Andrew ER, Newing RA. The narrowing of nuclear magnetic resonance spectra by molecular rotation in solids. *Proc Physical Society* 1958; 72:959-972.
 25. Lowe IJ. Free Induction Decays of Rotating Solids. *Phys Rev Lett* 1959; 2:285-287.
 26. Lindon JB, OP.; Holmes, E.; Nicholson, JK. High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy: Application to biomedical studies. *J Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 2009;5 5(2):79-100.
 27. Cuellar-Baena S, Morales JM, Martinetto H, Calvar J, Sevlever G, Castellano G, Cerda-Nicolas M, Celda B, Monleon D. Comparative metabolic profiling of paediatric ependymoma, medulloblastoma and pilocytic astrocytoma. *Int J Mol Med* 2010; 26(6):941-948.
 28. De Silva SS, Payne GS, Thomas V, Carter PG, Ind TE, deSouza NM. Investigation of metabolite changes in the transition from pre-invasive to invasive cervical cancer measured using (1)H and (31)P magic angle spinning MRS of intact tissue. *NMR Biomed* 2009; 22(2):191-198.
 29. Grinde MT, Moestue SA, Borgan E, Risa O, Engebraaten O, Gribbestad IS. (13) C High-resolution-magic angle spinning MRS reveals differences in glucose metabolism between two breast cancer xenograft models with different gene expression patterns. *NMR Biomed* doi: 101002/nbm1683 2011.
 30. Levin YS, Albers MJ, Butler TN, Spielman D, Peehl DM, Kurhanewicz J. Methods for metabolic evaluation of prostate cancer cells using proton and (13)C HR-MAS spectroscopy and [3-(13)C] pyruvate as a metabolic substrate. *Magn Reson Med* 2009; 62(5):1091-1098.
 31. Chen JH, Wu YV, DeCarolis P, O'Connor R, Somberg CJ, Singer S. Resolution of creatine and phosphocreatine 1H signals in isolated human skeletal muscle using HR-MAS 1H NMR. *Magn Reson Med* 2008; 59(6):1221-1224.

32. Monleon D, Morales JM, Gonzalez-Darder J, Talamantes F, Cortes O, Gil-Benso R, Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Celda B. Benign and atypical meningioma metabolic signatures by high-resolution magic-angle spinning molecular profiling. *J Proteome Res* 2008; 7(7):2882-2888.
33. Project G. <http://globocan.iarc.fr/>. Volume 2011.
34. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; 114(2):97-109.
35. Louis D, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. WHO Classification of Tumours of Tumours of the Central Nervous system. IARC, Lyon Press; 2007.
36. Bernstein M. BM, editor. Neuro-Oncology The essentials. Thieme New York; 2001.
37. Kaye A. LE, editor. Brain Tumours. . 2ª Edición ed: Churchill Livingstone, USA; 2001.
38. Stewart BW KP, editor. Eds World Health Organization, World Cancer Report,: Lyon, IARC Press. ; 2003.
39. Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran NL, Hoelzinger DB, Berens ME. Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(4):458-478.
40. Shetty P, Moiyadi A, Pantvaidya G, Arya S. Cystic metastasis versus brain abscess: role of MR imaging in accurate diagnosis and implications on treatment. *J Cancer Res Ther* 2010; 6(3):356-358.
41. Khan SH, Buwembo JE, Li Q. Concurrence of glioma and multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 2005; 32(3):349-351.
42. Doolittle ND, Abrey LE, Bleyer WA, Brem S, Davis TP, Dore-Duffy P, Drewes LR, Hall WA, Hoffman JM, Korfel A, Martuza R, Muldoon LL, Peereboom D, Peterson DR, Rabkin SD, Smith Q, Stevens GH, Neuwelt EA. New frontiers in translational research in neuro-oncology and the blood-brain barrier: report of the tenth annual Blood-Brain Barrier Disruption Consortium Meeting. *Clin Cancer Res* 2005; 11(2 Pt 1):421-428.

43. Essig M, Rohrer M, Giesel F, Tuttonberg J, Weber MA, Michaely H, Gerigk L, Voth M. Human brain tumor imaging with a protein-binding MR contrast agent: initial experience. *Eur Radiol* 2010; 20(1):218-226.
44. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C. Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 67(2):139-152.
45. Hlaihel C, Guilloton L, Guyotat J, Streichenberger N, Honnorat J, Cotton F. Predictive value of multimodality MRI using conventional, perfusion, and spectroscopy MR in anaplastic transformation of low-grade oligodendrogliomas. *J Neurooncol* 2010; 97(1):73-80.
46. Attenberger UI, Runge VM, Morelli JN, Williams J, Jackson CB, Michaely HJ. Evaluation of gadobutrol, a macrocyclic, nonionic gadolinium chelate in a brain glioma model: comparison with gadoterate meglumine and gadopentetate dimeglumine at 1.5 T, combined with an assessment of field strength dependence, specifically 1.5 versus 3 T. *J Magn Reson Imaging* 2010; 31(3):549-555.
47. Nelson SJ. Assessment of therapeutic response and treatment planning for brain tumors using metabolic and physiological MRI. *NMR Biomed* 2011;24(6):734-749.
48. Favre J, Taha JM, Burchiel KJ. An analysis of the respective risks of hematoma formation in 361 consecutive morphological and functional stereotactic procedures. *Neurosurgery* 2002; 50(1):48-56.
49. Field M, Witham TF, Flickinger JC, Kondziolka D, Lunsford LD. Comprehensive assessment of hemorrhage risks and outcomes after stereotactic brain biopsy. *J Neurosurg* 2001; 94(4):545-551.
50. Tate AR, Underwood J, Acosta DM, Julia-Sape M, Majos C, Moreno-Torres A, Howe FA, van der Graaf M, Lefournier V, Murphy MM, Loosemore A, Ladroue C, Wesseling P, Luc Bosson J, Cabanas ME, Simonetti AW, Gajewicz W, Calvar J, Capdevila A, Wilkins PR, Bell BA, Remy C, Heerschap A, Watson D, Griffiths JR, Arus C. Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours

- using in vivo magnetic resonance single voxel spectra. *NMR Biomed* 2006; 19(4):411-434.
51. Simonetti AW, Melssen WJ, van der Graaf M, Postma GJ, Heerschap A, Buydens LM. A chemometric approach for brain tumor classification using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Anal Chem* 2003; 75(20):5352-5361.
52. Sibtain NA, Howe FA, Saunders DE. The clinical value of proton magnetic resonance spectroscopy in adult brain tumours. *Clin Radiol* 2007; 62(2):109-119.
53. Julià-Sapé M. Millora de la Diagnosi no invasiva dels tumors cerebrals humans Cerdanyola del Vallès.: Universitat Autònoma de Barcelona; 2006.
54. el-Deredy W. Pattern recognition approaches in biomedical and clinical magnetic resonance spectroscopy: a review. *NMR Biomed* 1997; 10(3):99-124.
55. Julià-Sapé M, Coronel I, Majósa C, Candiota AP, Serrallong M, Cosd M, Aguilera C, Acebes JJ, Griffiths JR, Arús C. Prospective diagnostic performance evaluation of single-voxel ¹H MRS for typing and grading of brain tumours. *NMR in Biomed* 2011; DOI: 10.1002/nbm.1782.
56. Fellows GA, Wright AJ, Sibtain NA, Rich P, Opstad KS, McIntyre DJ, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. Combined use of neuroradiology and ¹H-MR spectroscopy may provide an intervention limiting diagnosis of glioblastoma multiforme. *J Magn Reson Imaging* 2010; 32(5):1038-1044.
57. INTERPRET DSS, Decision Support System, v3.0. <http://gabrmn.uab.es/dss>.
58. Martinez-Bisbal MC, Celda B. Proton magnetic resonance spectroscopy imaging in the study of human brain cancer. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2009; 53(6):618-630.
59. Laprie A. [Proton magnetic resonance spectroscopic imaging and other types of metabolic imaging for radiotherapy planning in adult and pediatric high-grade gliomas]. *Cancer Radiother* 2009; 13(6-7):556-561.
60. Wright AJ, Fellows G, Byrnes TJ, Opstad KS, McIntyre DJ, Griffiths JR, Bell BA, Clark CA, Barrick TR, Howe FA. Pattern recognition of MRSI data shows regions of glioma

- growth that agree with DTI markers of brain tumor infiltration. *Magn Reson Med* 2009; 62(6):1646-1651.
61. Weybright P, Sundgren PC, Maly P, Hassan DG, Nan B, Rohrer S, Junck L. Differentiation between brain tumor recurrence and radiation injury using MR spectroscopy. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 185(6):1471-1476.
62. <http://gabrmn.uab.es/SC>.
63. Short S, Tobias J. Radiosurgery for brain tumours. *BMJ* 2010; 340:c3247.
64. Rodrigues LM, Stubbs M, Robinson SP, Newell B, Mansi J, Griffiths JR. The C-neu mammary carcinoma in Oncomice; characterization and monitoring response to treatment with herceptin by magnetic resonance methods. *MAGMA* 2004; 17(3-6):260-270.
65. Saraswathy S, Crawford FW, Lamborn KR, Pirzkall A, Chang S, Cha S, Nelson SJ. Evaluation of MR markers that predict survival in patients with newly diagnosed GBM prior to adjuvant therapy. *J Neurooncol* 2009; 91(1):69-81.
66. Rabinov JD, Lee PL, Barker FG, Louis DN, Harsh GR, Cosgrove GR, Chiocca EA, Thornton AF, Loeffler JS, Henson JW, Gonzalez RG. In vivo 3-T MR spectroscopy in the distinction of recurrent glioma versus radiation effects: initial experience. *Radiology* 2002; 225(3):871-879.
67. Rock JP, Scarpace L, Hearshen D, Gutierrez J, Fisher JL, Rosenblum M, Mikkelsen T. Associations among magnetic resonance spectroscopy, apparent diffusion coefficients, and image-guided histopathology with special attention to radiation necrosis. *Neurosurgery* 2004; 54(5):1111-1117; discussion 1117-1119.
68. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; 343(19):1350-1354.
69. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross

- JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10):997-1003.
70. Warren KE, Gururangan S, Geyer JR, McLendon RE, Poussaint TY, Wallace D, Balis FM, Berg SL, Packer RJ, Goldman S, Minturn JE, Pollack IF, Boyett JM, Kun LE. A phase II study of O6-benzylguanine and temozolomide in pediatric patients with recurrent or progressive high-grade gliomas and brainstem gliomas: a Pediatric Brain Tumor Consortium study. *J Neurooncol* 2011; DOI:10.1007/s11060-011-0709-z.
71. Villano JL, Seery TE, Bressler LR. Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 64(4):647-655.
72. Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, D'Amati G, Vergati M, Portarena I, Xu W, Kalish V, Zupi G, Zhang J, Graziani G. Systemic administration of GPI 15427, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, increases the antitumor activity of temozolomide against intracranial melanoma, glioma, lymphoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(14):5370-5379.
73. Goldhoff P, Warrington NM, Limbrick DD, Jr., Hope A, Woerner BM, Jackson E, Perry A, Piwnica-Worms D, Rubin JB. Targeted inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase-4 promotes brain tumor regression. *Clin Cancer Res* 2008; 14(23):7717-7725.
74. Park JA, Joe YA, Kim TG, Hong YK. Potentiation of antiglioma effect with combined temozolomide and interferon-beta. *Oncol Rep* 2006; 16(6):1253-1260.
75. Yamini B, Yu X, Pytel P, Galanopoulos N, Rawlani V, Veerapong J, Bickenbach K, Weichselbaum RR. Adenovirally delivered tumor necrosis factor-alpha improves the antiglioma efficacy of concomitant radiation and temozolomide therapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13(20):6217-6223.
76. McConville P, Hambardzumyan D, Moody JB, Leopold WR, Kreger AR, Woolliscroft MJ, Rehemtulla A, Ross BD, Holland EC. Magnetic resonance imaging determination of tumor grade and early response to temozolomide in a genetically engineered mouse model of glioma. *Clin Cancer Res* 2007; 13(10):2897-2904.

-
77. Lovelock JE, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 1959; 183(4672):1394-1395.
 78. Yokota H, Guo J, Matoba M, Higashi K, Tonami H, Nagao Y. In-vitro ¹H-MRS of excised rabbit lung: evaluation of preservation method of the lung using 10% DMSO solution. *Radiat Med* 2005; 23(8):590-593.
 79. Silveira PC, Victor EG, Schefer D, Silva LA, Streck EL, Paula MM, Pinho RA. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. *Ultrasound Med Biol* 2010; 36(1):44-50.
 80. Notman R, Noro M, O'Malley B, Anwar J. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *J Am Chem Soc* 2006;128(43):13982-13983.
 81. Sul JH, A. Malignant Gliomas: New Translational Therapies. *Mount Sinai Journal of Medicine* 2010; 77:655-666.
 82. Chamberlain MC. Bevacizumab for the treatment of recurrent glioblastoma. *Clin Med Insights Oncol* 2011; 5:117-129.
 83. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsiichlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res* 2009; 69(19):7507-7511.
 84. Papandreou I, Goliassova T, Denko NC. Anticancer drugs that target metabolism: Is dichloroacetate the new paradigm? *Int J Cancer* 2011; 128(5):1001-1008.
 85. Cao W, Yacoub S, Shiverick KT, Namiki K, Sakai Y, Porvasnik S, Urbanek C, Rosser CJ. Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate* 2008; 68(11):1223-1231.
 86. Barcelo F, Prades J, Funari SS, Frau J, Alemany R, Escriba PV. The hypotensive drug 2-hydroxyoleic acid modifies the structural properties of model membranes. *Mol Membr Biol* 2004; 21(4):261-268.

87. Llado V, Teres S, Higuera M, Alvarez R, Noguera-Salva MA, Halver JE, Escriba PV, Busquets X. Pivotal role of dihydrofolate reductase knockdown in the anticancer activity of 2-hydroxyoleic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(33):13754-13758.
88. Llado V, Gutierrez A, Martinez J, Casas J, Teres S, Higuera M, Galmes A, Saus C, Besalduch J, Busquets X, Escriba PV. Minerval induces apoptosis in Jurkat and other cancer cells. *J Cell Mol Med* 2010; 14(3):659-670.
89. Escriba PV. Minerval® in Oncology, Scientific Report.: Lipopharma Therapeutics; 2010.
90. Geletneky K, Kiprianova I, Ayache A, Koch R, Herrero YCM, Deleu L, Sommer C, Thomas N, Rommelaere J, Schlehofer JR. Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models. *Neuro Oncol* 2010; 12(8):804-814.
91. Kroeger KM, Muhammad AK, Baker GJ, Assi H, Wibowo MK, Xiong W, Yagiz K, Candolfi M, Lowenstein PR, Castro MG. Gene therapy and virotherapy: novel therapeutic approaches for brain tumors. *Discov Med* 2010; 10(53):293-304.
92. Yi L, Xiao H, Xu M, Ye X, Hu J, Li F, Li M, Luo C, Yu S, Bian X, Feng H. Glioma-initiating cells: a predominant role in microglia/macrophages tropism to glioma. *J Neuroimmunol* 2010; 232(1-2):75-82.
93. Anido J, Saez-Borderias A, Gonzalez-Junca A, Rodon L, Folch G, Carmona MA, Prieto-Sanchez RM, Barba I, Martinez-Saez E, Prudkin L, Cuartas I, Raventos C, Martinez-Ricarte F, Poca MA, Garcia-Dorado D, Lahn MM, Yingling JM, Rodon J, Sahuquillo J, Baselga J, Seoane J. TGF-beta Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* 2010; 18(6):655-668.
94. Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, Small JE, Herrlinger U, Ourednik V, Black PM, Breakefield XO, Snyder EY. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(23):12846-12851.

-
95. Dwain I, Xiangpeng Y, Zeng Z, Patricia T, Joh SY. Neural stem cells--a promising potential therapy for brain tumors. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006; 1(1):79-84.
 96. Kojima T, Hirota Y, Ema M, Takahashi S, Miyoshi I, Okano H, Sawamoto K. Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells* 2010; 28(3):545-554.
 97. Seike T, Fujita K, Yamakawa Y, Kido MA, Takiguchi S, Teramoto N, Iguchi H, Noda M. Interaction between lung cancer cells and astrocytes via specific inflammatory cytokines in the microenvironment of brain metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2011; 28(1):13-25.
 98. Lee J, Borboa AK, Baird A, Eliceiri BP. Non-invasive quantification of brain tumor-induced astrogliosis. *BMC Neurosci* 2011; 12:9.
 99. Cordeau P, Jr., Lalancette-Hebert M, Weng YC, Kriz J. Live imaging of neuroinflammation reveals sex and estrogen effects on astrocyte response to ischemic injury. *Stroke* 2008; 39(3):935-942.
 100. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massague J. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 2009; 139(7):1315-1326.
 101. Newcomb EW, Zagzag D. Chapter 12: The murine GL261 glioma experimental model to assess novel brain tumor treatments. In: Van Meir EG, editor. *CNS Cancer Models, markers, prognostic factors, targets and therapeutic approaches*. Atlanta (USA); 2009. p 227-241
 102. Cha S, Johnson G, Wadghiri YZ, Jin O, Babb J, Zagzag D, Turnbull DH. Dynamic, contrast-enhanced perfusion MRI in mouse gliomas: correlation with histopathology. *Magn Reson Med* 2003; 49(5):848-855.
 103. Szatmari T, Lumniczky K, Desaknai S, Trajcevski S, Hidvegi EJ, Hamada H, Safrany G. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci* 2006; 97(6):546-553.

104. Gutmann DH, Baker SJ, Giovannini M, Garbow J, Weiss W. Mouse models of human cancer consortium symposium on nervous system tumors. *Cancer Res* 2003;63(11):3001-3004.
105. Weiss WA, Burns MJ, Hackett C, Aldape K, Hill JR, Kuriyama H, Kuriyama N, Milshteyn N, Roberts T, Wendland MF, DePinho R, Israel MA. Genetic determinants of malignancy in a mouse model for oligodendroglioma. *Cancer Res* 2003;63(7):1589-1595.
106. Fomchenko EI, Holland EC. Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Clin Cancer Res* 2006;12(18):5288-5297.
107. Simoes RV, Garcia-Martin ML, Cerdan S, Arus C. Perturbation of mouse glioma MRS pattern by induced acute hyperglycemia. *NMR Biomed* 2008;21(3):251-264.
108. Simoes RV, Delgado-Goni T, Lope-Piedrafita S, Arus C. ¹H-MRSI pattern perturbation in a mouse glioma: the effects of acute hyperglycemia and moderate hypothermia. *NMR Biomed* 2010;23(1):23-33.
109. Houghton PJ, Stewart CF, Cheshire PJ, Richmond LB, Kirstein MN, Poquette CA, Tan M, Friedman HS, Brent TP. Antitumor activity of temozolomide combined with irinotecan is partly independent of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and mismatch repair phenotypes in xenograft models. *Clin Cancer Res* 2000;6(10):4110-4118.
110. Kato Y, Okollie B, Raman V, Vesuna F, Zhao M, Baker SD, Bhujwalla ZM, Artemov D. Contributing factors of temozolomide resistance in MCF-7 tumor xenograft models. *Cancer Biol Ther* 2007;6(6):891-897.
111. Park SD, Kim CH, Kim CK, Park JA, Sohn HJ, Hong YK, Kim TG. Cross-priming by temozolomide enhances antitumor immunity of dendritic cell vaccination in murine brain tumor model. *Vaccine* 2007;25(17):3485-3491.
112. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Harry G, Hashimoto K, Porter CJ, Andrade MA, Thebaud B, Michelakis ED. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer

- and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 2007;11(1):37-51.
113. Chen MC, Chyan CL, Lee TT, Huang SH, Tzen JT. Constitution of stable artificial oil bodies with triacylglycerol, phospholipid, and caleosin. *J Agric Food Chem* 2004;52(12):3982-3987.
114. Peng CC, Chen JC, Shyu DJ, Chen MJ, Tzen JT. A system for purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* via artificial oil bodies constituted with their oleosin-fused polypeptides. *J Biotechnol* 2004;111(1):51-57.
115. Ernst T, Hennig J. Improved water suppression for localized in vivo ¹H spectroscopy. *J Magn Reson B* 1995;106(2):181-186.
116. Andrasi M, Bustos R, Gaspar A, Gomez FA, Klekner A. Analysis and stability study of temozolomide using capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010; 878(21):1801-1808.
117. Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 1994;33(31):9045-9051.
118. Boska MD, Lewis TB, Destache CJ, Benner EJ, Nelson JA, Uberti M, Mosley RL, Gendelman HE. Quantitative ¹H magnetic resonance spectroscopic imaging determines therapeutic immunization efficacy in an animal model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2005;25(7):1691-1700.
119. de Graaf RA, Brown PB, McIntyre S, Nixon TW, Behar KL, Rothman DL. High magnetic field water and metabolite proton T1 and T2 relaxation in rat brain in vivo. *Magn Reson Med* 2006;56(2):386-394.
120. Rose SE, Chalk JB, Galloway GJ, Doddrell DM. Detection of dimethyl sulfone in the human brain by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Imaging* 2000;18(1):95-98.

121. Tate AR, Majos C, Moreno A, Howe FA, Griffiths JR, Arus C. Automated classification of short echo time in in vivo 1H brain tumor spectra: a multicenter study. *Magn Reson Med* 2003;49(1):29-36.
122. Ortega-Martorell S, Olier I, Julia-Sape M, Arus C. SpectraClassifier 1.0: a user friendly, automated MRS-based classifier-development system. *BMC Bioinformatics* 2010;11:106.
123. Vanhamme L, van den Boogaart A, Van Huffel S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J Magn Reson* 1997;129(1):35-43.
124. Hall MA, editor. Correlation-based feature subset selection for machine learning: Hamilton, New Zealand: University of Waikato; 1999.
125. Garcia-Gomez JM, Luts J, Julia-Sape M, Krooshof P, Tortajada S, Robledo JV, Melssen W, Fuster-Garcia E, Olier I, Postma G, Monleon D, Moreno-Torres A, Pujol J, Candiota AP, Martinez-Bisbal MC, Suykens J, Buydens L, Celda B, Van Huffel S, Arus C, Robles M. Multiproject-multicenter evaluation of automatic brain tumor classification by magnetic resonance spectroscopy. *MAGMA* 2009;22(1):5-18.
126. De Edelenyi FS, Rubin C, Esteve F, Grand S, Decorps M, Lefournier V, Le Bas JF, Remy C. A new approach for analyzing proton magnetic resonance spectroscopic images of brain tumors: nosologic images. *Nat Med* 2000;6(11):1287-1289.
127. De Vos M, Laudadio T, Simonetti AW, Heerschap A, Van Huffel S. Fast nosologic imaging of the brain. *J Magn Reson* 2007;184(2):292-301.
128. Harris MA, Yang H, Low BE, Mukherjee J, Guha A, Bronson RT, Shultz LD, Israel MA, Yun K. Cancer stem cells are enriched in the side population cells in a mouse model of glioma. *Cancer Res* 2008;68(24):10051-10059.
129. Lathia JD, Gallagher J, Myers JT, Li M, VasANJI A, McLendon RE, Hjelmeland AB, Huang AY, Rich JN. Direct in vivo evidence for tumor propagation by glioblastoma cancer stem cells. *PLoS One* 2011;6(9):e24807.

130. Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, d'Amati G, Portarena I, Zupi G, Bonmassar E, Graziani G. Combined treatment with temozolomide and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor enhances survival of mice bearing hematologic malignancy at the central nervous system site. *Blood* 2002;99(6):2241-2244.
131. Zhu X, Fujita M, Snyder LA, Okada H. Systemic delivery of neutralizing antibody targeting CCL2 for glioma therapy. *J Neurooncol* 2010;104(1):83-92.
132. Kim CH, Woo SJ, Park JS, Kim HS, Park MY, Park SD, Hong YK, Kim TG. Enhanced antitumour immunity by combined use of temozolomide and TAT-survivin pulsed dendritic cells in a murine glioma. *Immunology* 2007;122(4):615-622.
133. Ortega-Martorell S, Lisboa P, Vellido A, Simoes R, Julia-Sape M, Arus C. Brain tumor pathological area delimitation through Non-negative Matrix Factorization. The Second Workshop on Biological Data Mining and its Applications in Healthcare Vancouver, Canada; 2011.
134. Zhou Q, Gallo JM. Differential effect of sunitinib on the distribution of temozolomide in an orthotopic glioma model. *Neuro Oncol* 2009;11(3):301-310.
135. Hakumaki JM, Poptani H, Sandmair AM, Yla-Herttuala S, Kauppinen RA. ¹H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the in vivo detection of apoptosis. *Nat Med* 1999;5(11):1323-1327.
136. McCann CM, Waterman P, Figueiredo JL, Aikawa E, Weissleder R, Chen JW. Combined magnetic resonance and fluorescence imaging of the living mouse brain reveals glioma response to chemotherapy. *Neuroimage* 2009;45(2):360-369.
137. Mirbahai L, Wilson M, Shaw CS, McConville C, Malcomson RD, Griffin JL, Kauppinen RA, Peet AC. ¹H magnetic resonance spectroscopy metabolites as biomarkers for cell cycle arrest and cell death in rat glioma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43(7):990-1001.
138. He T, Doblaz S, Saunders D, Casteel R, Lerner M, Ritchey JW, Snider T, Floyd RA, Towner RA. Effects of PBN and OKN007 in rodent glioma models assessed by ¹H MR spectroscopy. *Free Radic Biol Med* 2011;51(2):490-502.

139. Valonen PK, Griffin JL, Lehtimaki KK, Liimatainen T, Nicholson JK, Grohn OH, Kauppinen RA. High-resolution magic-angle-spinning ¹H NMR spectroscopy reveals different responses in choline-containing metabolites upon gene therapy-induced programmed cell death in rat brain glioma. *NMR Biomed* 2005;18(4):252-259.
140. Delgado-Goñi T SR, Acosta M, Martín-Sitjar J, Lope-Piedrafita S, Arús C. . Detection of DMSO in mouse brain during temozolomide therapy. . *MAGMA, Book of abstracts ESMRMB* 22:271. ; 2009.
141. Tkac I, Henry PG, Andersen P, Keene CD, Low WC, Gruetter R. Highly resolved in vivo ¹H NMR spectroscopy of the mouse brain at 9.4 T. *Magn Reson Med* 2004; 52(3):478-484.
142. Delgado-Goñi T SR, Acosta M, Martín-Sitjar J, Lope-Piedrafita S, Arús C. . DMSO as a potential contrast agent for brain tumours.: *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 18; 2787; 2010.
143. Claes A, Gambarota G, Hamans B, van Tellingen O, Wesseling P, Maass C, Heerschap A, Leenders W. Magnetic resonance imaging-based detection of glial brain tumors in mice after antiangiogenic treatment. *Int J Cancer* 2008; 122(9):1981-1986.
144. Jacob SW, Herschler R. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology* 1986;23(1):14-27.
145. Miller L, Hansbrough J, Slater H, Goldfarb IW, Kealey P, Saffle J, Kravitz M, Silverstein P. Sildimac: a new delivery system for silver sulfadiazine in the treatment of full-thickness burn injuries. *J Burn Care Rehabil* 1990; 11(1):35-41.
146. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 2003; 65(7):1035-1041.
147. Quintero M, Cabanas ME, Arus C. A possible cellular explanation for the NMR-visible mobile lipid (ML) changes in cultured C6 glioma cells with growth. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771(1):31-44.

-
148. Bunch W, Edwards C. The permeation of non-electrolytes through the single barnacle muscle cell. *J Physiol* 1969; 202(3):683-697.
 149. Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 1999; 7(6):499-508.
 150. Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mao XO, Batteur S, Greenberg DA. Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci* 2003; 24(1):171-189.
 151. Kato Y, Holm DA, Okollie B, Artemov D. Noninvasive detection of temozolomide in brain tumor xenografts by magnetic resonance spectroscopy. *Neuro Oncol* 2010; 12(1):71-79.
 152. Tokuhiko T ML, Szmant HH. . Contribution of relaxation and chemical shift results to the elucidation of the structure of the water-DMSO liquid system. *J Chem Phys* 1974; 61 ((6)): 2275-2282.
 153. Perez Y, Lahrech H, Cabanas ME, Barnadas R, Sabes M, Remy C, Arus C. Measurement by nuclear magnetic resonance diffusion of the dimensions of the mobile lipid compartment in C6 cells. *Cancer Res* 2002; 62(20):5672-5677.
 154. Balmaceda C, Critchell D, Mao X, Cheung K, Pannullo S, DeLaPaz RL, Shungu DC. Multisection 1H magnetic resonance spectroscopic imaging assessment of glioma response to chemotherapy. *J Neurooncol* 2006; 76(2):185-191.
 155. Nelson SJ, Huhn S, Vigneron DB, Day MR, Wald LL, Prados M, Chang S, Gutin PH, Sneed PK, Verhey L, Hawkins RA, Dillon WP. Volume MRI and MRSI techniques for the quantitation of treatment response in brain tumors: presentation of a detailed case study. *J Magn Reson Imaging* 1997; 7(6):1146-1152.
 156. Lazareff JA, Gupta RK, Alger J. Variation of post-treatment H-MRSI choline intensity in pediatric gliomas. *J Neurooncol* 1999; 41(3):291-298.
 157. de Bono JS, Ashworth A. Translating cancer research into targeted therapeutics. *Nature* 2010; 467(7315):543-549.

158. Morse DL, Gillies RJ. Molecular imaging and targeted therapies. *Biochem Pharmacol* 2010; 80(5):731-738.
159. Hucker HB, Miller JK, Hochberg A, Brobyn RD, Riordan FH, Calesnick B. Studies on the absorption, excretion and metabolism of dimethylsulfoxide (DMSO) in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1967; 155(2):309-317.
160. Sea J, Teichman JM. Paediatric painful bladder syndrome/interstitial cystitis: diagnosis and treatment. *Drugs* 2009; 69(3):279-296.
161. Sanmartin-Suarez C, Soto-Otero R, Sanchez-Sellero I, Mendez-Alvarez E. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2011; 63(2):209-215.
162. Brobyn RD. The human toxicology of dimethyl sulfoxide. *Ann N Y Acad Sci* 1975; 243:497-506.
163. Cecil KM, Lin A, Ross BD, Egelhoff JC. Methylsulfonylmethane observed by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in a 5-year-old child with developmental disorder: effects of dietary supplementation. *J Comput Assist Tomogr* 2002; 26(5):818-820.
164. Lin A, Nguy CH, Shic F, Ross BD. Accumulation of methylsulfonylmethane in the human brain: identification by multinuclear magnetic resonance spectroscopy. *Toxicol Lett* 2001; 123(2-3):169-177.
165. Park I, Bok R, Ozawa T, Phillips JJ, James CD, Vigneron DB, Ronen SM, Nelson SJ. Detection of early response to temozolomide treatment in brain tumors using hyperpolarized ¹³C MR metabolic imaging. *J Magn Reson Imaging* 2011; 33(6):1284-1290.
166. Vlashi E, Kim K, Lagadec C, Donna LD, McDonald JT, Eghbali M, Sayre JW, Stefani E, McBride W, Pajonk F. In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101(5):350-359.

-
167. Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 2009; 8(20):3274-3284.
 168. Christensen K, Schroder HD, Kristensen BW. CD133+ niches and single cells in glioblastoma have different phenotypes. *J Neurooncol* 2011; 104(1):129-143.
 169. Zhai H, Acharya S, Gravanis I, Mehmood S, Seidman RJ, Shroyer KR, Hajjar KA, Tsirka SE. Annexin A2 promotes glioma cell invasion and tumor progression. *J Neurosci* 2011; 31(40):14346-14360.
 170. Bishop CM, editor. *Pattern Recognition and Machine Learning*.: Springer: New York, ; 2006.
 171. Duda ROH, P. E. , editor. *Stork, Pattern Classification*. Secound ed. ed: John Wiley & Sons, Inc.: New York; 2001.
 172. Tate AR, Griffiths JR, Martinez-Perez I, Moreno A, Barba I, Cabanas ME, Watson D, Alonso J, Bartumeus F, Isamat F, Ferrer I, Vila F, Ferrer E, Capdevila A, Arus C. Towards a method for automated classification of 1H MRS spectra from brain tumours. *NMR Biomed* 1998; 11(4-5):177-191.
 173. Altman DG, Royston P. What do we mean by validating a prognostic model? *Stat Med* 2000; 19(4):453-473.
 174. Preul MC, Caramanos Z, Collins DL, Villemure JG, Leblanc R, Olivier A, Pokrupa R, Arnold DL. Accurate, noninvasive diagnosis of human brain tumors by using proton magnetic resonance spectroscopy. *Nat Med* 1996; 2(3):323-325.
 175. Luts J, Heerschap A, Suykens JA, Van Huffel S. A combined MRI and MRSI based multiclass system for brain tumour recognition using LS-SVMs with class probabilities and feature selection. *Artif Intell Med* 2007; 40(2):87-102.
 176. Laudadio T, Martinez-Bisbal MC, Celda B, Van Huffel S. Fast nosological imaging using canonical correlation analysis of brain data obtained by two-dimensional turbo spectroscopic imaging. *NMR Biomed* 2008; 21(4):311-321.

177. Vellido A, Lisboa PJ. Handling outliers in brain tumour MRS data analysis through robust topographic mapping. *Comput Biol Med* 2006; 36(10):1049-1063.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Clasificación WHO de Tumores del Sistema Nervioso (35)

TUMOURS OF NEUROEPITHELIAL TISSUE

Astrocytic tumours

Pilocytic astrocytoma	9421/1 ¹
Piloxyoid astrocytoma	9425/3*
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3
Diffuse astrocytoma	9400/3
Fibrillary astrocytoma	9420/3
Gemistocytic astrocytoma	9411/3
Protoplasmic astrocytoma	9410/3
Anaplastic astrocytoma	9401/3
Glioblastoma	9440/3
Giant cell glioblastoma	9441/3
Gliosarcoma	9442/3
Gliomatosis cerebri	9381/3

Oligodendroglial tumours

Oligodendroglioma	9450/3
Anaplastic oligodendroglioma	9451/3

Oligoastrocytic tumours

Oligoastrocytoma	9382/3
Anaplastic oligoastrocytoma	9382/3

Ependymal tumours

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

Choroid plexus tumours

Choroid plexus papilloma	9390/0
Atypical choroid plexus papilloma	9390/1*
Choroid plexus carcinoma	9390/3

Other neuroepithelial tumours

Astroblastoma	9430/3
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1
Angiocentric glioma	9431/1*

Neuronal and mixed neuronal-glial tumours

Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	9493/0
Desmoplastic infantile astrocytoma/ganglioglioma	9412/1
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Gangliocytoma	9492/0
Ganglioglioma	9505/1
Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Central neurocytoma	9506/1
Extraventricular neurocytoma	9506/1*
Cerebellar liponeurocytoma	9506/1*
Papillary glioneuronal tumour	9509/1*
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	9509/1*
Paraganglioma	8680/1

Tumours of the pineal region

Pineocytoma	9361/1
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3
Pineoblastoma	9362/3
Papillary tumour of the pineal region	9395/3*

Embryonal tumours

Medulloblastoma	9470/3
Desmoplastic/nodular medulloblastoma	9471/3
Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3*
Anaplastic medulloblastoma	9474/3*
Large cell medulloblastoma	9474/3
CNS primitive neuroectodermal tumour	9473/3
CNS Neuroblastoma	9500/3
CNS Ganglioneuroblastoma	9490/3
Medulloepithelioma	9501/3
Ependymoblastoma	9392/3
Atypical teratoid / rhabdoid tumour	9508/3

TUMOURS OF CRANIAL AND PARASPINAL NERVES

Schwannoma (neurilemoma, neurinoma)	9560/0
Cellular	9560/0
Plexiform	9560/0
Melanotic	9560/0

Neurofibroma	9540/0
Plexiform	9550/0

¹ Morphology code of the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (814A) and the Systematized Nomenclature of Medicine (<http://snomed.org>). Behaviour is coded 0 for benign tumours, 3 for malignant tumours and 1 for borderline or uncertain behaviour.

* The italicised numbers are provisional codes proposed for the 4th edition of ICD-O. While they are expected to be incorporated into the next ICD-O edition, they currently remain subject to change.

Perineurioma		Haemangiopericytoma	9150/1
Perineurioma, NOS	9571/0	Anaplastic haemangiopericytoma	9150/3
Malignant perineurioma	9571/3	Angiosarcoma	9120/3
Malignant peripheral		Kaposi sarcoma	9140/3
nerve sheath tumour (MPNST)		Ewing sarcoma - PNET	9364/3
Epithelioid MPNST	9540/3	Primary melanocytic lesions	
MPNST with mesenchymal differentiation	9540/3	Diffuse melanocytosis	8728/0
Melanotic MPNST	9540/3	Melanocytoma	8728/1
MPNST with glandular differentiation	9540/3	Malignant melanoma	8720/3
		Meningeal melanomatosis	8728/3
TUMOURS OF THE MENINGES		Other neoplasms related to the meninges	
Tumours of meningotheial cells		Haemangioblastoma	9161/1
Meningioma	9530/0	LYMPHOMAS AND HAEMATOPOIETIC	
Meningothelial	9531/0	NEOPLASMS	
Fibrous (fibroblastic)	9532/0	Malignant lymphomas	9590/3
Transitional (mixed)	9537/0	Plasmacytoma	9731/3
Psammomatous	9533/0	Granulocytic sarcoma	9930/3
Angiomatous	9534/0		
Microcystic	9530/0	GERM CELL TUMOURS	
Secretory	9530/0	Germinoma	9064/3
Lymphoplasmacyte-rich	9530/0	Embryonal carcinoma	9070/3
Metaplastic	9530/0	Yolk sac tumour	9071/3
Chordoid	9538/1	Choriocarcinoma	9100/3
Clear cell	9538/1	Teratoma	9080/1
Atypical	9539/1	Mature	9080/0
Papillary	9538/3	Immature	9080/3
Rhabdoid	9538/3	Teratoma with malignant transformation	9084/3
Anaplastic (malignant)	9530/3	Mixed germ cell tumour	9085/3
Mesenchymal tumours		TUMOURS OF THE SELLAR REGION	
Lipoma	8850/0	Cranioopharyngioma	9350/1
Angiolipoma	8861/0	Adamantinomatous	9351/1
Hibernoma	8880/0	Papillary	9352/1
Liposarcoma	8850/3	Granular cell tumour	9582/0
Solitary fibrous tumour	8815/0	Pituitoma	9432/1*
Fibrosarcoma	8810/3	Spindle cell oncocytoma	
Malignant fibrous histiocytoma	8830/3	of the adenohypophysis	8291/0*
Leiomyoma	8890/0	METASTATIC TUMOURS	
Leiomyosarcoma	8890/3		
Rhabdomyoma	8900/0		
Rhabdomyosarcoma	8900/3		
Chondroma	9220/0		
Chondrosarcoma	9220/3		
Osteoma	9180/0		
Osteosarcoma	9180/3		
Osteochondroma	9210/0		
Haemangioma	9120/0		
Epithelioid haemangioendothelioma	9133/1		

ANEXO 2: Principales resonancias de metabolitos que pueden detectarse por ERM de ^1H *in vivo* a 1,5 T en cerebro humano, normal y/o patológico (Reproducido de (53)).

Metabolite	ppm	Multiplicity
Mobile lipids	Several resonances from 0.5 to 5.40, the most detectable ones at 0.9, 1.3 and 2.0	Apparent singlets
Lactate	1.33	Doublet
Alanine	1.47	Doublet
Acetate	1.92	Singlet
N-acetyl aspartate	2.02	Singlet
Glutamate	2.10	Multiplet
Glutamine	2.14	Multiplet
Glutamate	2.35	Triplet
Succinate	2.42	Singlet
Glutamine	2.46	Triplet
N-acetyl aspartate, Glutamate, Glutamine	2.61	Quadruplet
Creatine	3.03	Singlet
Trimethylamine group-containing compounds (Choline, Phosphocholine, Glycerophosphocholine and others), generically labelled as "choline"	3.21	Singlet
Scyllo-Inositol	3.35	Singlet
Taurine, Glucose	3.43	Triplet
Myo-Inositol	3.55	Multiplet
Glycine	3.56	Singlet
Glutamate	3.77	Triplet
Glutamine	3.78	Triplet
Alanine	3.79	Quadruplet
Glucose	3.80	Multiplet
Creatine	3.93	Singlet

ANEXO 3:

PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN DE ANIMALES AFECTADOS POR TUMORES CEREBRALES.

Procedimiento: 530-CEEAH, 3255-DMA **IP:** Carles Arús

Título: “Puesta a punto de un modelo animal murino para el estudio de tumores cerebrales in vivo mediante la imagen y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (MRI/MRS)”.

PARAMETROS DE SUPERVISIÓN (0-3 puntos)

Pérdida de Peso

- 0) Peso normal
- 1) Menor de un 10%
- 2) Entre un 10 y un 15%
- 3) Consistente o rápida, superior a un 20% mantenida durante 72h

Aspecto Físico

- 0) Normal
- 1) Deshidratación superior al 10%, condición corporal 2 (BC2) (ver página 194). Cambios en color de la piel
- 2) Pelo hirsuto. Palidez. Cianosis
- 3) Encorvamiento. Pérdida de masa muscular (emaciación)

Signos Clínicos

- 0) Ninguno
- 1) Tendencia de movimiento circular del animal hacia el lado de la implantación
- 2) Secreciones mucosas y/o sanguinolentas por cualquier orificio. Órganos hipertrofiados detectables (ganglios, bazo, hígado).
- 3) Distensión abdominal. Volumen de líquido ascítico superior al 10% de peso corporal inicial. Respiración dificultosa (particularmente a si va acompañada de descarga nasal y/o cianosis). Caquexia.

Alteraciones en la conducta

- 0) Ninguna
- 1) Incapacidad de moverse con normalidad
- 2) Imposibilidad de llegar a la comida/bebida. Aislamiento del resto de los animales de la jaula
- 3) Inconsciente o comatoso. Intención de “escondarse” en la viruta, no responde a estímulos (Moribundo)

Heridas

- 0) Ninguna
- 1) Arañazos
- 2) Heridas que no cicatrizan. Infección en la zona de incisión quirúrgica
- 3) Heridas ulceradas que pueden incluso supurar. Tumores ulcerados o necróticos

El criterio que se seguirá tendrá en cuenta:

- a) **0 puntos:** Animal sano
- b) **1 a 2 puntos:** Presenta signos leves, seguir con protocolo establecido.
- b) **3 a 11 puntos:** Supervisión diaria del animal. Hay que plantearse el uso de analgésicos, o bien el sacrificio* del animal.

* NOTIFICAR Y CONSULTAR CON EL INVESTIGADOR RESPONSABLE ANTES

c) **12 a 30 puntos:** Sacrificio* obligado del animal. Hay que plantearse el final del experimento.

* NOTIFICAR Y CONSULTAR CON EL INVESTIGADOR RESPONSABLE ANTES

Cuando se dé la circunstancia de que haya **más de un parámetro con un valor de 3**, automáticamente todos los 3 pasarán a 6.

Analgésico: Meloxicam s.c. (1.0 mg/Kg)

En el caso de los ratones en que se detecte dolor o sufrimiento, se aplicará analgesia prontamente y hasta el momento de su sacrificio.

NOTA: A medida que el tumor crece, si afecta zonas cerebrales relacionadas con la función motora, los animales podrían sufrir de: **paresia**, disminución de fuerzas; **plejia**, parálisis, ausencia de movimiento. En estos casos se pondrá **comida y agua en el interior de la jaula** (i.e., dieta y hidrogel o bien dieta humedecida con agua) para facilitar el acceso por parte del animal. En caso de que estos cuadros sean agudos se dará por finalizada la experimentación y **se sacrificará al animal.**

Condición Corporal (BC):



BC 1

Mouse is emaciated.

- *Skeletal structure extremely prominent; little or no flesh cover.*
- *Vertebrae distinctly segmented.*



BC 2

Mouse is underconditioned.

- *Segmentation of vertebral column evident.*
- *Dorsal pelvic bones are readily palpable.*



BC 3

Mouse is well-conditioned.

- *Vertebrae and dorsal pelvis not prominent; palpable with slight pressure.*



BC 4

Mouse is overconditioned.

- *Spine is a continuous column.*
- *Vertebrae palpable only with firm pressure.*



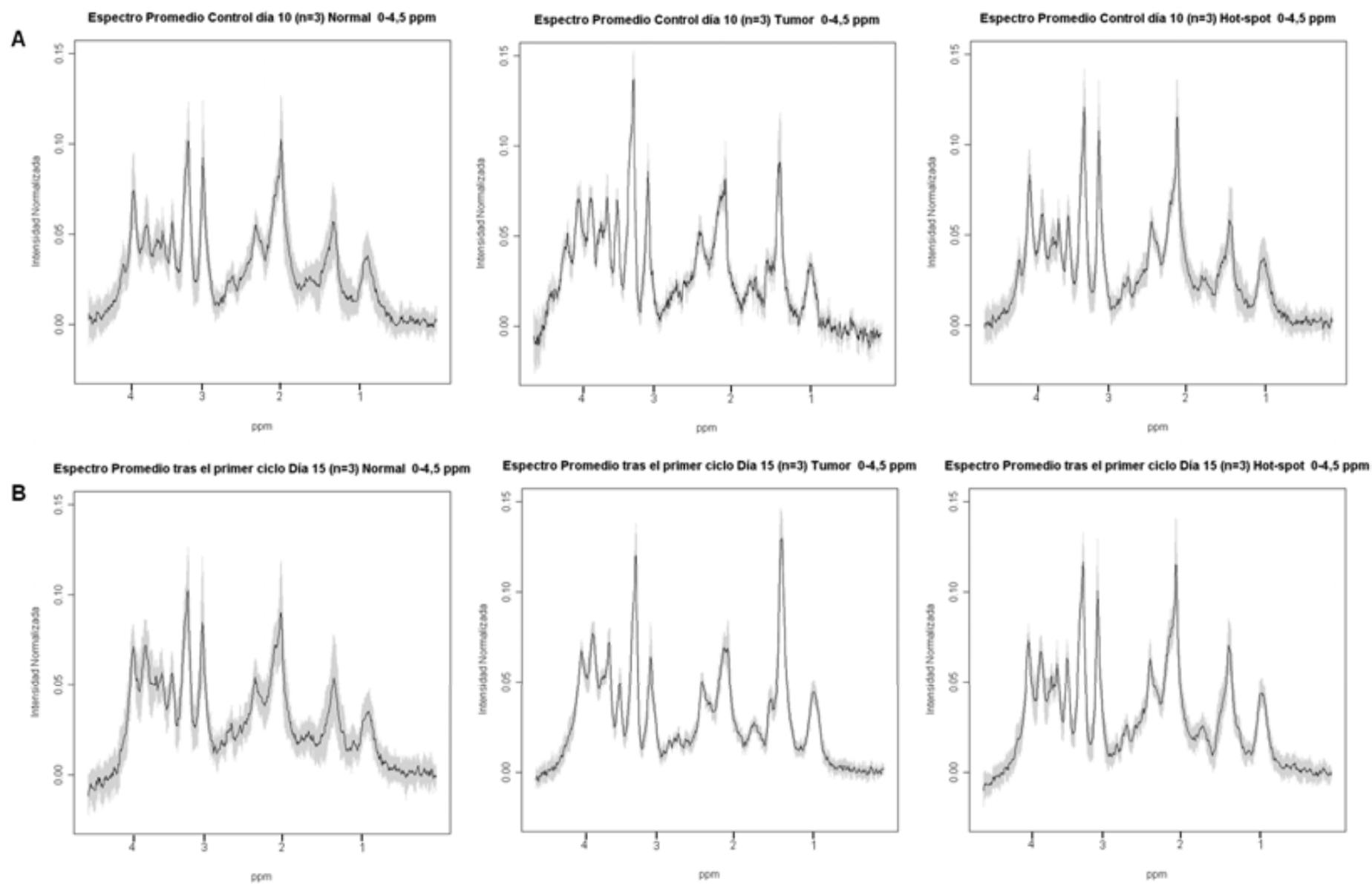
BC 5

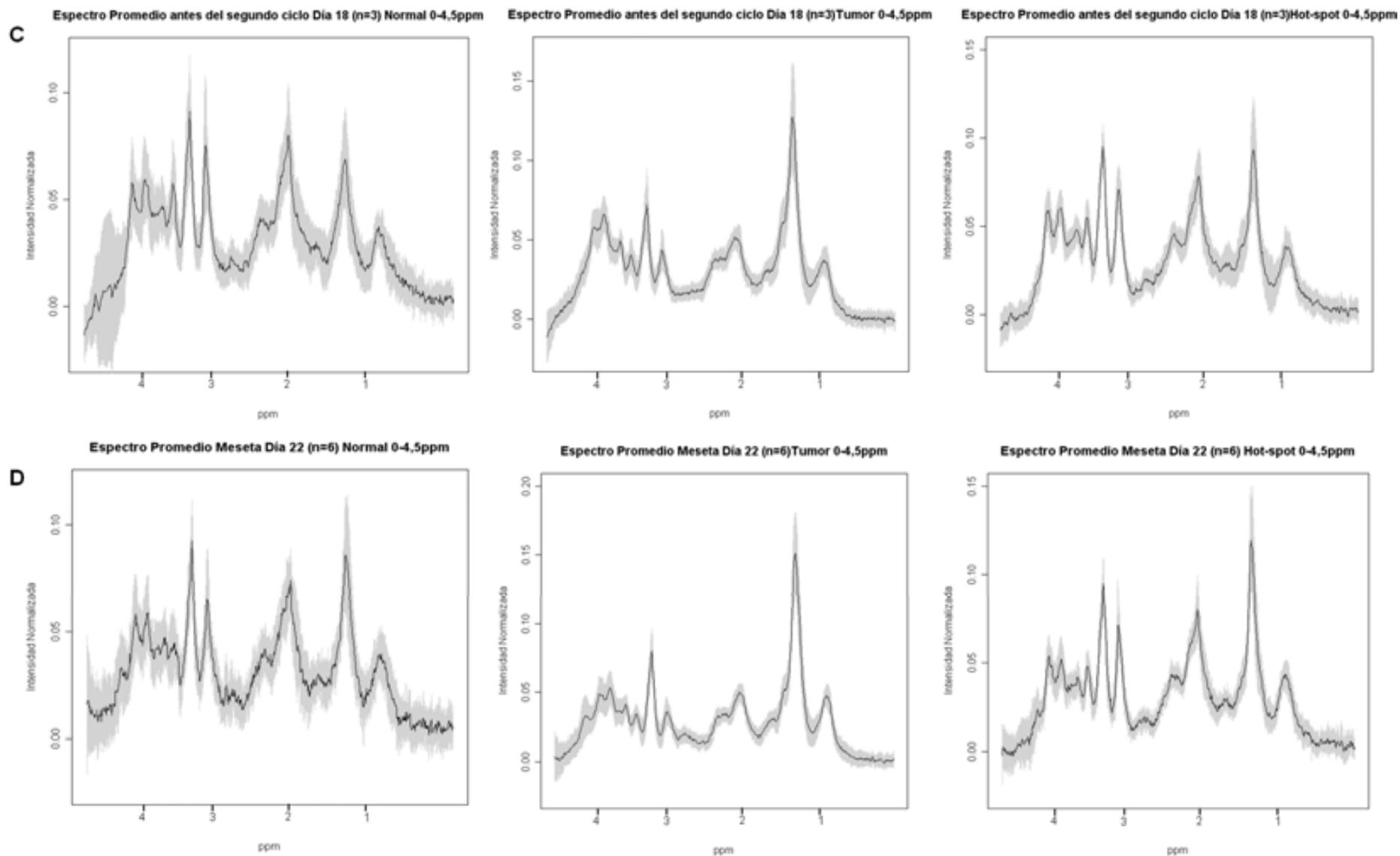
Mouse is obese.

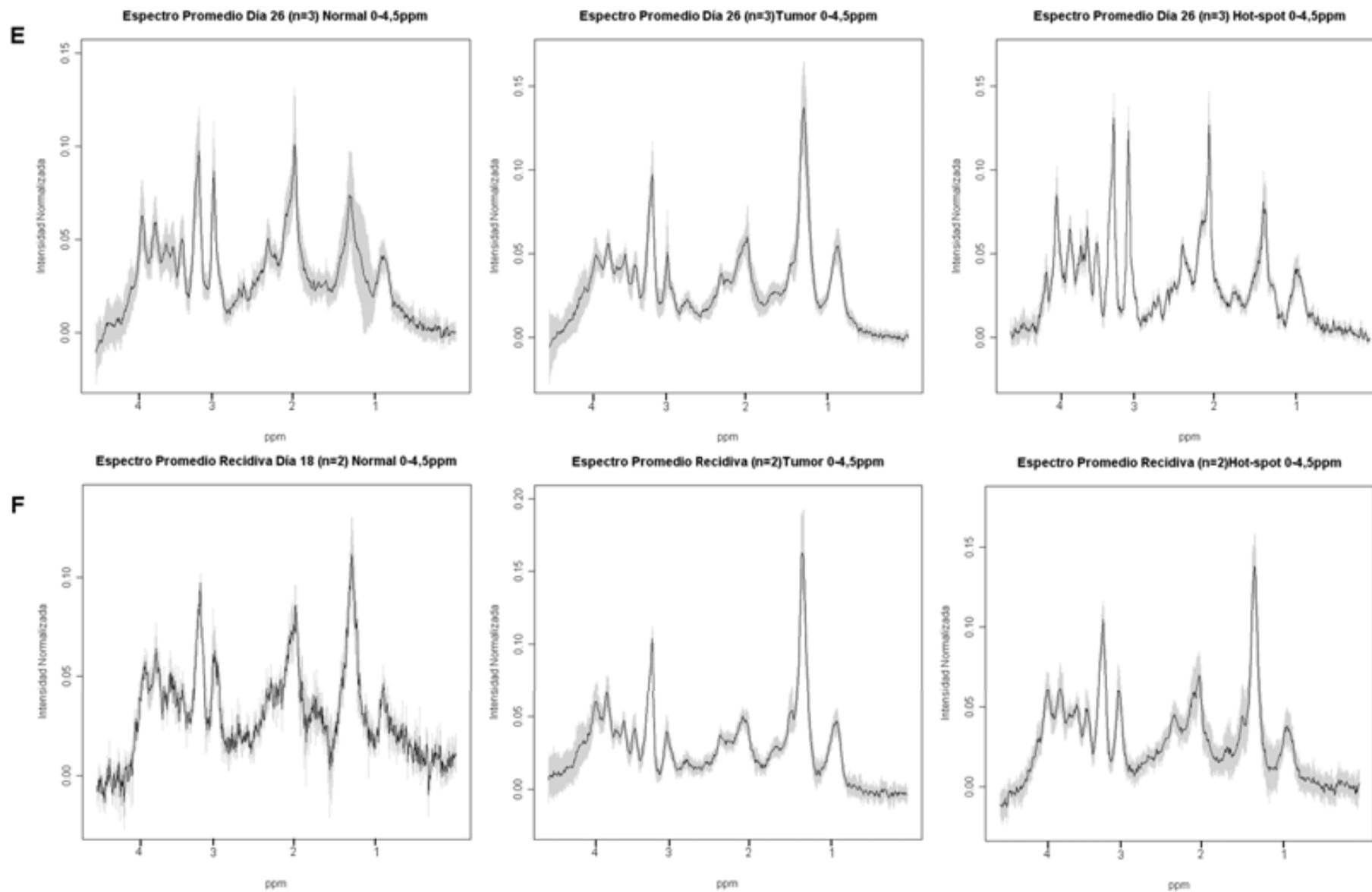
- *Mouse is smooth and bulky.*
- *Bone structure disappears under flesh and subcutaneous fat.*

ANEXO 4: Espectros promedio de los tumores GL261 (entre 0 y 4,5 ppm) estudiados por MRSI con DMSO en los diferentes puntos temporales del protocolo de tratamiento con tres ciclos de TMZ.

Este anexo muestra los espectros promedio a TEC (\pm SD en gris) obtenidos de tejido normal, tumoral y marcado como *hot-spot* en los estudios de PE-IERM con DMSO de seis grupos diferentes de ratones sometidos al protocolo de tres ciclos de TMZ, que fueron estudiados por PE-IERM en diferentes puntos temporales: Antes de comenzar la administración de TMZ (control a día 10 post-implantación, espectros en A, n=3), justo después del primer ciclo (día 15 post-implantación, espectros en B, n=3), antes del segundo ciclo (día 18 post-implantación, espectros en C, n=6), después del segundo ciclo (día 22 post-implantación, espectros en D, n=6), después del tercer ciclo (espectros en E, n=3) y en la recidiva tumoral (espectros en F, n=2). El DMSO se utilizó para detectar qué voxels correspondían a la zona de *hot-spot* peri-tumoral inducido por efecto de la terapia en cada caso, aunque los espectros promedio se calcularon utilizando el patrón registrado antes de inducir la perturbación. El término “meseta” se utilizó para designar a los espectros a día 22, cuando se inició el estado estacionario de crecimiento de los tumores debido al tratamiento con TMZ.







ANEXO 5: Resultados del análisis SFFS previo a la clasificación por LDA para los ratones GL261 y ODG estudiados en distintos estados de glicemia y para los ratones GL261 estudiados durante el protocolo de tres ciclos de TMZ. El número de variables exploradas varió entre 2 y 23 para los casos estudiados con PE-IERM con glucosa y entre 2 y 20 para los casos de GBM control y tratados con TMZ explorados por IERM sin perturbación.

A) Variables estudiadas para los clasificadores con distintos estados de glicemia (Eug = Euglicemia; Hyp = Hiperglicemia).

Número de variables (ppm)	12Eug	12Hyp	136Eug	136Hyp
1	3,562	1,465	1,485	1,263
2	2,103	2,136	1,335	1,315
3	3,504	3,556	2,331	3,224
4	3,569	1,283	2,032	2,032
5	1,289	2,025	2,279	3,295
6	3,621	2,292	1,342	3,562
7	3,041	2,130	3,836	1,276
8	3,556	1,361	2,019	2,025
9	3,490	2,286	0,612	1,276
10	2,097	2,156	1,504	1,459
11	1,459	1,439	3,341	2,618
12	3,816	3,061	3,556	1,322
13	3,575	3,614	3,210	1,257
14	1,954	2,650	3,152	2,429
15	1,426	3,569	1,478	0,918
16	2,520	2,188	1,967	3,230
17	3,354	1,335	0,866	3,953
18	3,601	3,608	3,582	1,244
19	1,335	1,954	2,025	1,335
20	3,022	2,462	2,370	1,309
21	2,168	1,485	1,511	2,045
22	3,549	2,123	3,041	2,924
23	2,006	2,253	2,286	3,002

B) Variables para los casos de GBM control y GBMr estudiados sin perturbación metabólica.

Número de variables (ppm)	ppm
1	1,993
2	1,016
3	1,283
4	2,826
5	1,901
6	3,556
7	2,025
8	1,009
9	3,002
10	2,195
11	2,839
12	2,449
13	2,683
14	2,820
15	3,504
16	1,954
17	1,022
18	2,344
19	3,562
20	2,722
21	2,631