

## ***RESULTATS I DISCUSSIÓ***



## RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 4.1 Estudis amb els líquids cístics de tumors cerebrals humans

El nostre interès per caracteritzar el patró espectral del líquid cístic d'un tumor cerebral va començar amb el cas d'un pacient amb un hemangioblastoma en que s'observava clarament una ressonància de compostos N-acetilats (NAC) a 2,03 ppm (figura 4.1A). El volum d'interès era centrat clarament a una zona cística, sense contaminació visible del vòxel per tumor o parènquima cerebral peritumoral. La RMN *in vivo* mostrava un pic prominent a 2,03 ppm, comparable en intensitat relativa a la ressonància de lactat a 1,33 ppm. La RMN *ex vivo* presentava un pic comparable a 2,03 ppm al que es veia a l'espectre *in vivo* (figura 4.1B). Per altra banda, l'extracció PCA mostrava el notable canvi de proporció d'aquest pic envers del pic de creatina a 3,03 ppm, considerada totalment extraïble per PCA (figura 4.1C).

Aquest tipus de comportament suggeria un origen macromolecular pel pic a 2,03 ppm *in vivo*, ja que els compostos de petit pes molecular són plenament recuperables en una extracció PCA. Quedava per tant caracteritzar adequadament aquest compost al líquid cístic de diferents tumors. Seguint aquest camí, s'ha aprofitat també per a la caracterització parcial de la resta del patró espectral dels líquids cístics obtinguts i pel desenvolupament d'un classificador preliminar d'agressivitat tumoral basat en el patró espectral detectat *in vivo*.

En la planificació de la caracterització del compost a 2,03 ppm (NAC), s'han treballat diverses hipòtesis, tal i com esquematitza la figura 4.2. Concretament, hem considerat la hipòtesi de que la part principal d'aquest senyal no fos degut al NAA, sinó a altres compostos N-acetilats de tipus macromolecular que es donen bé a la matriu extracel·lular, bé associats a molts tipus de tumors (Gowda i col, 1989; Adany i col, 1990; Liu i col, 1996; Renkonen i col, 1997; Zhang i col, 1998; Molist i col, 1998; Ohyama i col, 1999; Wu i col, 2001; Touab i col, 2002; Poongodi i col, 2002).

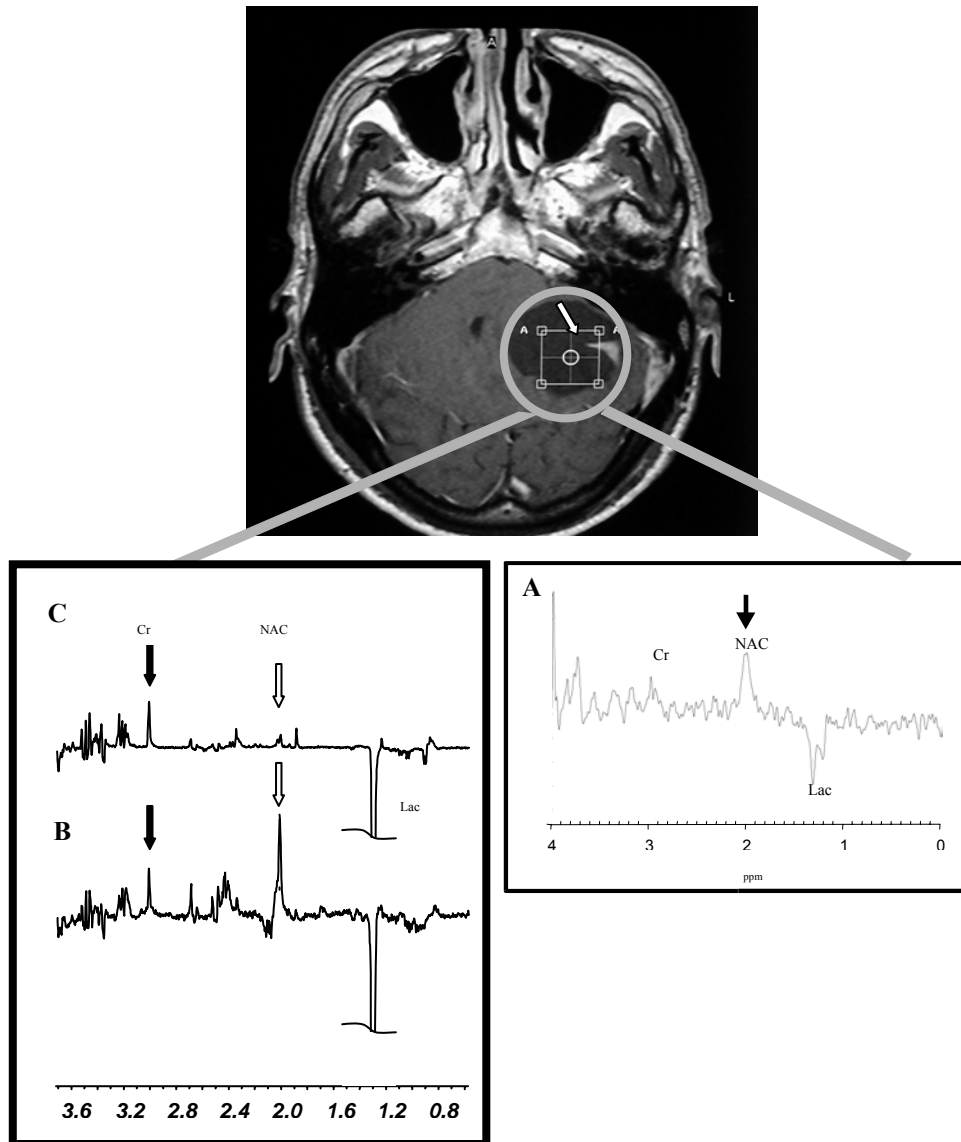


Figura 4.1: A dalt, IRM d'un pacient diagnosticat d'hemangioblastoma, amb el vòxel a dins del líquid cístic sense contaminació de la part sòlida, excepte el petit peduncle indicat per la fletxa blanca. A baix, A) espectre *in vivo* (PRESS 136 ms) del vòxel que s'ensenyava a IRM. Espectres a 9,4T (TE=136 ms) B) *ex vivo* del líquid cístic obtingut d'aquest pacient i C) *in vitro*, de l'extracció PCA realitzada d'aquest líquid. És notable la disminució de la proporció del pic de NAC a 2,03 ppm (fletxa blanca) quan comparat al pic de creatina a 3,03 ppm (fletxa negra) (espectre C *versus* espectres A i B). El pic de lactat a 1,33 ppm a B i C es mostra tallat. NAC = compostos N-acetilats; Cr= creatina, Lac= lactat

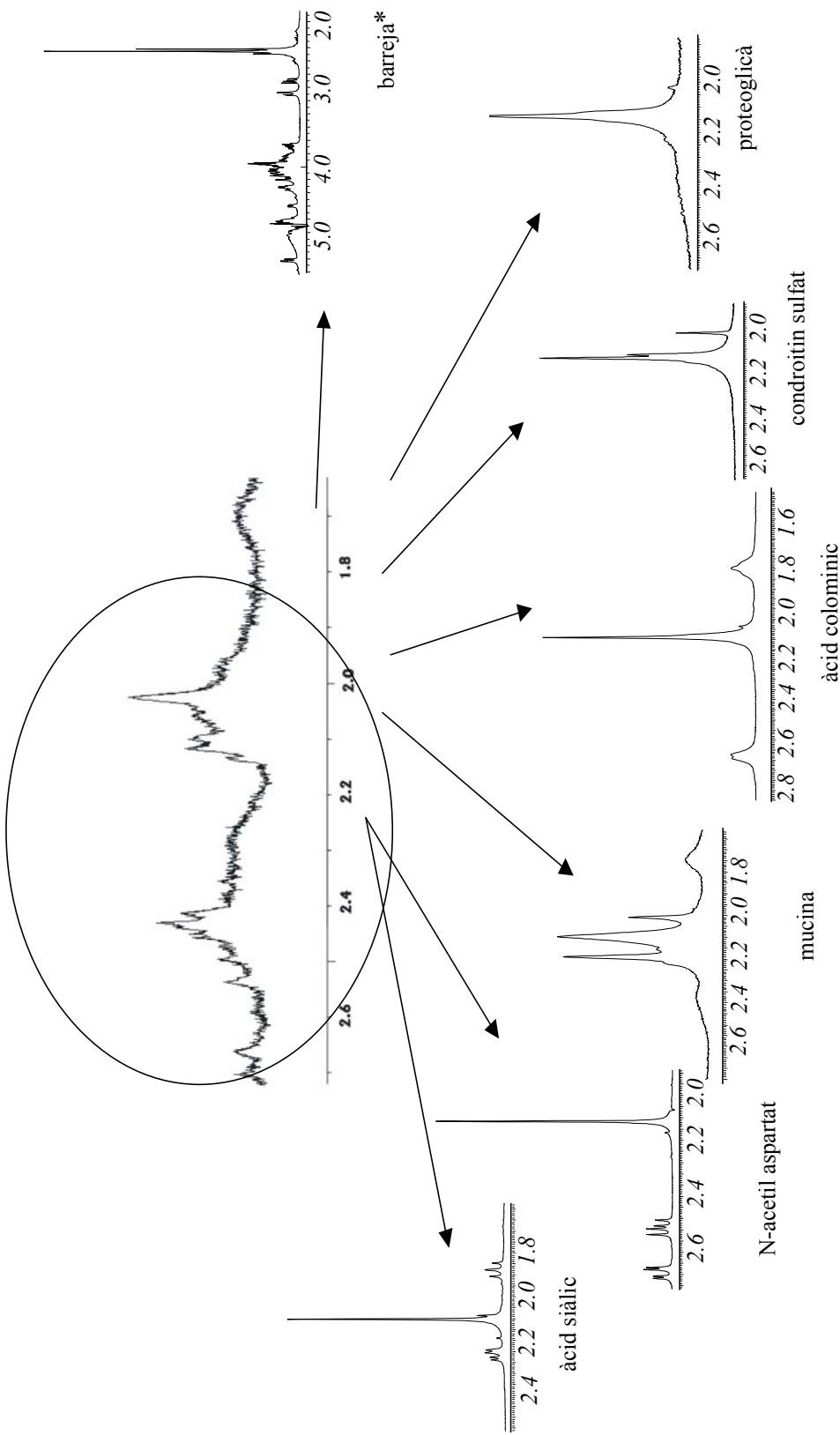


Figura 4.2: Segments de l'espectre de RMN de <sup>1</sup>H de possibles components de la ressonància d'interès al líquid cístic del pacient HB2 (cercle). (\*): barreja dels següents compostos: àcid colomínic, 0,19 mM; àcid siàlic 7,76 mM; NAA 25 mM; N-acetil galactosamina 30 mM; N-acetil glucosamina 20 mM. La resta dels espectres correspon a estàndars purs a concentracions variables segons la seva solubilitat. El proteoglicà és de septa nasal boví i la mucina, de glàndules submaxil·lars de boví. Tots els espectres han estat adquirits amb una seqüència de pols-adquisició com està descrit a material i mètodes, apartat 3.7.1

### 4.1.1 Espectroscòpia *In vivo*

La IRM de la lesió cística d'un pacient diagnosticat d'hemangioblastoma mostra clarament que, en aquest cas, no hi ha contaminació per volum parcial amb teixit normal ni amb teixit tumoral mentre la ERM (figura 4.1) presenta clarament un singlet a 2,03 ppm i un doblet centrat a 1,33 ppm, probablement lactat. No ha estat possible obtenir espectres *in vivo* de tots els pacients dels que hi ha neurocirurgia, perquè alguns dels pacients sotmesos a intervenció quirúrgica han realitzat exploració d'ERM a altres institucions, però en tots els casos en que estava disponible líquid cístic i espectre *in vivo*, aquests presentaven el pic de NAC a 2,03 ppm (figura 4.3). La figura 4.4 mostra espectres promig *in vivo* (TE 136 ms, PRESS) de volums cístics de diversos tumors presents a la base de dades INTERPRET (<http://carbon.uab.es/INTERPRET>).

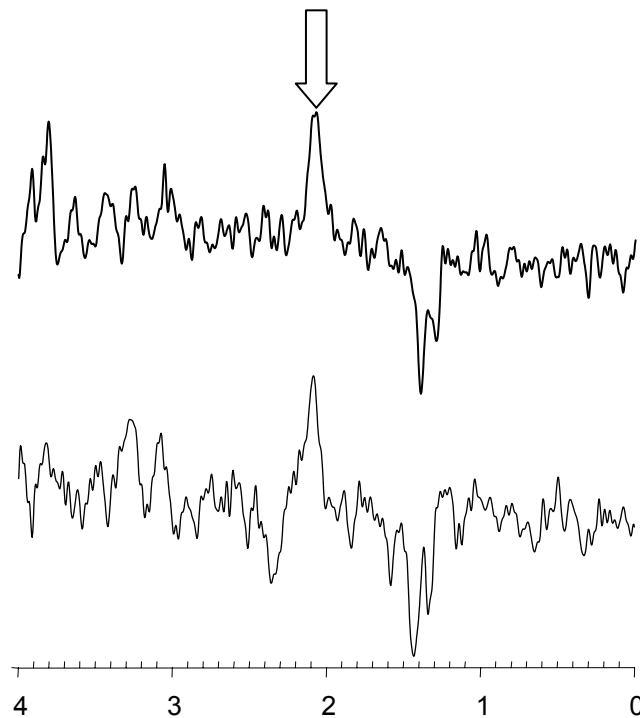


Figura 4.3: Espectres *in vivo* (TE = 136 ms, PRESS) de la part cística de dos hemangioblastomes (pacients HB1 i HB2). El pic de NAC a 2,03 ppm (fletxa) és clarament visible en ambdós casos

Els valors de SNR per la ressonància NAC pels grups A, B i C (figura 4.4) van ser de  $8,55 \pm 2,70$  (rang 4,88-14,80),  $5,28 \pm 0,76$  (rang 4,45-6,24) i  $2,16 \pm 0,21$  (rang 2,01-2,3), respectivament. Les mitges de SNR van presentar diferència estadísticament significativa (A vs B,  $p=0,03$ ; B vs C,  $p=0,006$  i A vs C,  $p=0,006$ ).

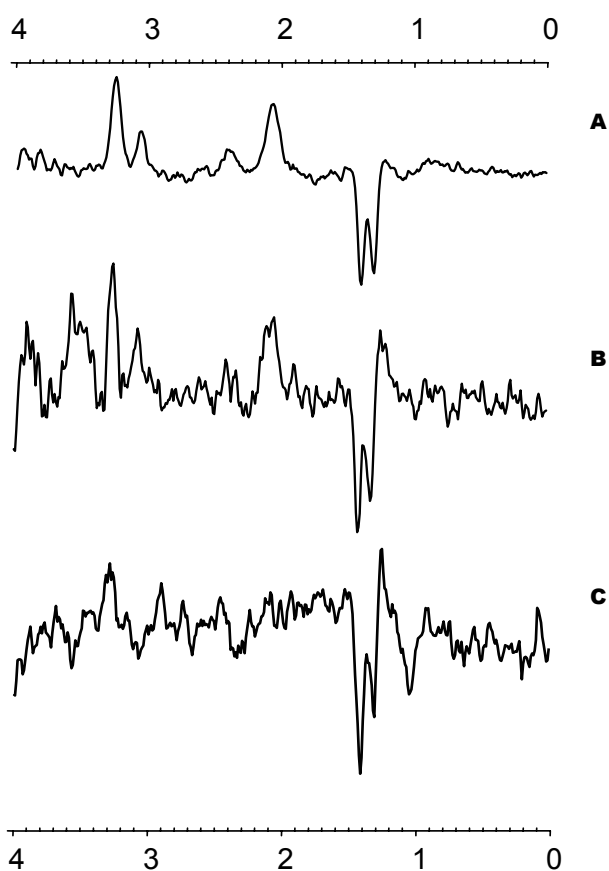


Figura 4.4: Espectres promig *in vivo* (TE = 136 ms, PRESS) de la part cística de diferents tumors de la base de dades INTERPRET. S'han format arbitràriament tres grups per inspecció visual de l'espectre. El pic de NAC era clarament detectable (A, n = 12), present però amb baixa relació senyal/soroll (B, n = 4) o quasi no detectable (C, n = 2)

#### 4.1.2 Espectroscòpia *ex vivo* i mesures de $T_2$

La inspecció visual dels 10 espectres *ex vivo* ha demostrat que el pic a 2,03 ppm estava present en tots (figura 4.6, un espectre representatiu de cada patologia). El diagnòstic del tipus tumoral associat al líquid cístic ha estat informat pel departament anatomopatològic de l'HUB, i estan tabulats a la taula 4.1.

A més del pic de NAC, l'espectre *ex vivo* ha presentat ressonàncies compatibles amb lactat, compostos amb grup de trimetilamina, creatina, glutamat, glutamina i altres aminoàcids. La quantificació del pic de NAC s'ha realitzat a l'espectre a 136 ms, ja que l'espectre obtingut per la seqüència de pols-adquisició presentava ressonàncies molt amples

en la regió d'interès, el que causava problemes en el càlcul de l'àrea del pic de NAC (figura 4.5).

Patologia	n
Craniofaringioma	3*
Hemangioblastoma	3
Glioblastoma	2
Astrocitoma pilocític	1
Metàstasis	1

Taula 4.1: Patologies dels tumors que produïen els líquids cístics recollits a neurocirurgia.

\* dues de les mostres provenien del mateix pacient que ha estat sotmès dues vegades a cirurgia

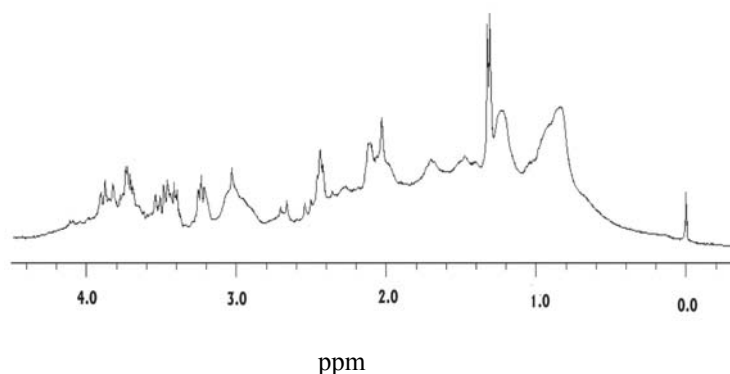


Figura 4.5: Espectre  $^1\text{H}$ -RMN a 9,4 T del líquid cístic del pacient HB2, amb una seqüència de pols-adquisició

Per quantificar la concentració del compost que origina la ressonància NAC per RMN cal evitar la contribució de ressonàncies amples amb  $T_2$  curt que no són rellevants per a interpretar els espectres *ex vivo*. Una manera de fer-ho es treballar a un temps d'eco en que aquestes ressonàncies ja no contribueixin a l'espectre *ex vivo*. Llavors, cal tenir en compte les pèrdues de senyal en la ressonància d'interès ocasionades per efectes de  $T_2$ . Per tenir en compte les pèrdues de senyal de NAC, s'han realitzat mesures del temps de relaxació  $T_2$  en al menys un líquid cístic representant de cada patologia, i els resultats es mostren en la taula 4.2 i la figura 4.7.

A més de les mesures realitzades amb els líquids cístics, s'han realitzat també experiments de càlcul de  $T_2$  amb els estàndards. Els ajusts obtinguts i els valors de  $T_2$  es mostren a la figura 4.7 i taula 4.3. Tots els ajustos han estat biexponencials, amb l'excepció de l'àcid siàlic, cas en que ha estat suficient un ajust monoexponencial.



Els valors de  $T_2$  han estat utilitzats doncs per extrapolar l'àrea de NAC dels espectres *ex vivo* dels líquids cístics adquirits a TE 136 ms a condicions de TE=0, com es descriurà a continuació (secció 4.1.3). Amb el TSP també s'han realitzat mesures de  $T_2$ , trobant-se un valor de 2,2 segons, que s'ha utilitzat també per extrapolar la seva àrea a condicions de TE=0. La concentració de NAC, suposant un origen metil, calculada a partir dels espectres de RMN *ex vivo* es pot trobar a la taula 4.4.

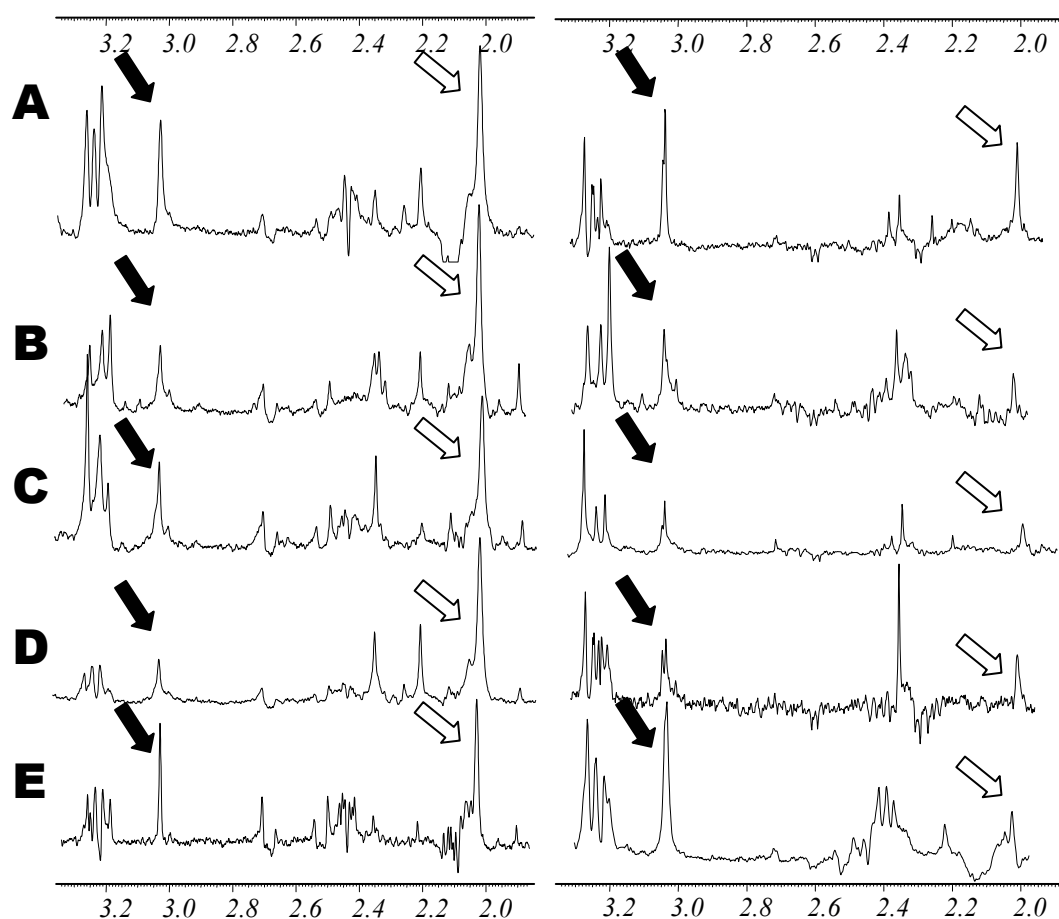


Figura 4.6: Espectres *ex vivo* i *in vitro* (després d'extracció PCA) de les mostres de líquid cístic de A) astrocitoma pilocític AP1; B) metàstasi ME1; C) glioblastoma multiforme GB1; D) craniofaringioma CF2 i E) hemangioblastoma HB2. Les fletxes blanques senyalen el pic de NAC a 2,03 ppm, i les negres el pic de creatina a 3,03 ppm

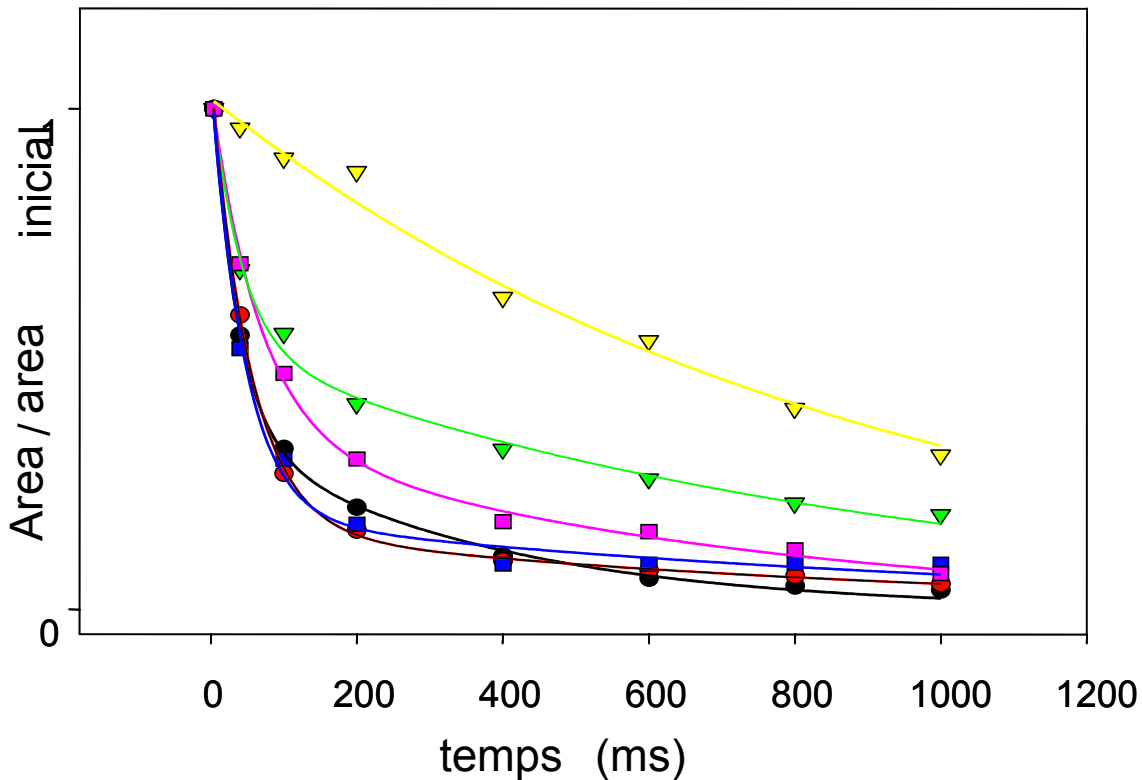


Figura 4.7: Corbes resultants dels experiments de càlcul de  $T_2$  per als estàndards analitzats i una mostra-problema (HB2). ●: condroitin sulfat; ●: mucina de glàndules submaxil·lars bovines; ▼: àcid colomínic; ▼: àcid siàlic; ■: proteoglicà de septe nasal boví; ■: mostra de líquid cístic del pacient HB2; tots els ajustos van ser biexponencials, a l'excepció de l'àcid siàlic que es va considerar un ajust monoexponencial

Mostra	$T_{2,A}$ (ms)	% de contribució del compost A al senyal a $TE=0$	$T_{2,B}$ (ms)	% de contribució del compost B al senyal a $TE=0$
HB2	$45,6 \pm 17,5$	64,6	$705,3 \pm 50,0$	35,4
CF2	$63,2 \pm 4,8$	78,8	$583,4 \pm 75,8$	21,2
GB1	$35,6 \pm 3,0$	73,6	$547,0 \pm 80,0$	26,4
ME1	$49,2 \pm 5,2$	72,8	$762,7 \pm 122,0$	27,2
AP1	$54,6 \pm 20,1$	65,2	$837,2 \pm 336,9$	34,8
Promig± sd	$49,6 \pm 10,3$	$71,0 \pm 6,0$	$687,1 \pm 121,4$	$29,0 \pm 6,0$

Taula 4.2: Temps de relaxació transversal ajustats a un comportament biexponencial (A,B) (mitja  $\pm$  SD) mesurats per mostres representatives de cada patologia tumoral, i percentatge de contribució del senyal a 2,03 ppm a  $TE=0$ ms, calculat amb el programa SIGMAPLOT. HB: hemangioblastoma, CF: craniofaringioma, GB: glioblastoma, ME: metàstasi, AP: astrocitoma pilocític

Estàndard	T <sub>2,A</sub> (ms)	T <sub>2,B</sub> (ms)
Condroitin sulfat (n=2)	35,4 ± 3,2	361,4 ± 36,6
Proteoglicà de septe nasal boví (n=2)	35,0 ± 4,9	585,2 ± 204,0
Àcid colomínic (n=2)	29,4 ± 2,8	486,7 ± 90,4
Mucina de glàndules submaxil·lars bovines (n=2)	47,3 ± 17,3	523,3 ± 147,3
Àcid siàlic	-	910,9 ± 43,6
Promig de les mostres de líquids cístics (n=10)	49,6 ± 10,3	687,1 ± 121,4

Taula 4.3: Valors obtinguts als experiments de T<sub>2</sub> amb els diferents estàndards i promig dels líquids cístics

#### 4.1.3 Quantificació de la ressonància a 2,03 ppm als espectres spin-eco

En els espectres *ex vivo* a TE 136 ms es va quantificar la ressonància a 2,03 ppm dels líquids cístics. Prèviament s'aplicava un pas de correcció pel perfil d'excitació sinusoidal (eq. 4.1). Considerant que el TE és de 136 ms i que hi ha atenuació de moltes ressonàncies degut a factors de T<sub>2</sub> durant el TE transcorregut, es va procedir al càlcul descrit a l'equació 4.2, la correcció per T<sub>2</sub>. En el cas del TSP també es corregia per T<sub>1</sub>, ja que el temps de reciclatge utilitzat no era suficient per la recuperació al 100% del senyal (Moreno, 1996). Un cop aplicades totes les correccions, s'obtenia la concentració aparent de NAC, comparant l'àrea calculada a TE=0 per NAC i TSP, i tenint en compte la calibració del capil·lar feta amb la dissolució de fumarat, com descriu la equació 4.3.

La correcció del valor de pols aplicat es fa perquè, al tractar-se d'una seqüència d'excitació sinusoidal, no tots els punts de l'espectre reben un pols de 90° (veure fig. 3.11). Per obtenir el percentatge de senyal observat, es feia servir la següent equació:

$$\left[ \sin\left( \frac{|ppm - 4,75| \times 400,13}{1381} \times \frac{\pi}{2} \right) \right] \times 100 = \% \text{ senyal observat} \quad \text{eq. 4.1}$$

En aquesta equació, 'ppm' és el desplaçament en ppm de la ressonància d'interès; 4,75 es refereix al desplaçament en ppm de l'*offset* O1 de la seqüència; 400,13 és la freqüència d'operació de l'espectròmetre; i 1381 és la distància en Hertz entre el màxim d'excitació de la seqüència i la freqüència portadora (O1). El resultat ens indica el percent del senyal que estem observant, considerant que el 100% equivaldria al senyal que rep un pols de 90°.

### CÀLCUL DE LES ÀREES A TE=0 A PARTIR DELS T<sub>2</sub> CALCULATS

Les àrees a TE=0 han estat calculades a partir de les àrees a 136 ms (eq. 4.2).

$$AreaTE0 = \frac{AreaTE136}{\left[ \left( C_A \times \exp(-136/T_{2,A}) \right) + \left( C_B \times \exp(-136/T_{2,B}) \right) \right]} \quad \text{eq. 4.2}$$

‘AreaTE136’ és l’àrea mesurada per NAC en aquest TE, ja corregida pel perfil d’excitació sinusoidal; C<sub>A</sub> i C<sub>B</sub> són els coeficients de contribució de cada component, A i B; T<sub>2,A</sub> i T<sub>2,B</sub> són els T<sub>2</sub> calculats pels components A i B.

Per al TSP, s’ha aplicat una correcció similar, excepte en que s’ha considerat que hi havia només un component de T<sub>2</sub>. Finalment, la concentració estimada pel NAC es calcula segons la següent equació:

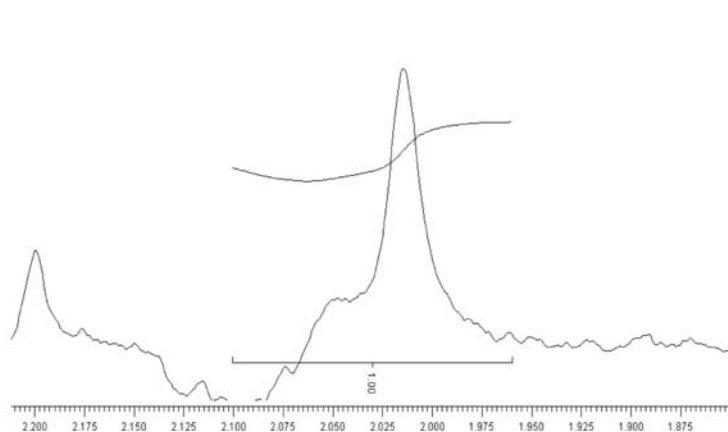
$$[NAC] = [fum] \times \frac{\left( \frac{NAC \text{ area } TE = 0}{TSP \text{ area } TE = 0} \right)}{\left( \frac{fum \text{ area}}{TSP \text{ area}} \right)} \times \frac{2}{3} \quad \text{eq. 4.3}$$

On [fum] és la concentració del fumarat, ‘fum area’ i ‘TSP area’ són les àrees obtingudes per a aquests compostos al pas de calibració (3.6.1); ‘NAC area TE=0’ i ‘TSP area TE=0’ són les àrees corregides d’aquests compostos considerant efectes de T<sub>2</sub> com ja descrit; i [NAC] és la concentració final de NAC, considerant que l’origen del senyal es dona en grups CH<sub>3</sub>.

Mostra	NAC (mM)
AP1	2,38
CF1	2,80
CF2	5,56
CF3	2,53
GB1	2,63
GB2	4,35
HB1	3,02
HB2	3,42
HB3	2,69
ME1	2,49
Promig $\pm$ desviació estàndard	3,19 + 1,01

Taula 4.4: Concentració de grups N-acetil a 2,03 ppm mesurada per RMN dels diferents líquids cístics. Abreviatures: HB= hemangioblastoma, GB= glioblastoma, CF= craniofaringioma, ME= metàstasis, AP= astrocitoma pilocític

Quan els espectres de pols-adquisició ( $TE=0$ ) s'integren directament en la regió  $2,03 \pm 0,07$  ppm (figura 4.8) , s'obtenia un valor superior de NAC ( $7,55 \pm 1,66$  mM), probablement degut a la contribució de compostos amb  $T_2$  curt.



(ppm)

Figura 4.8: Exemple d'integració per càlcul de l'alçada de la ressonància NAC a un espectre de líquid cístic (AP1)

#### 4.1.4 Extractes PCA dels estàndards i líquids cístics

El volum promig de líquid cístic utilitzat per als extractes PCA va ser de  $0,36 \pm 0,12$  ml, depenent essencialment de la quantitat de mostra disponible. Pel que fa als estàndards, s'utilitzava 0,5ml. El pH ajustat del sobrenedant d'extracció va ser de  $7,01 \pm 0,12$ . La solubilitat en PCA 0,5M dels diferents estàndards analitzats per extracció amb PCA es mostra a la taula 4.5. Aquestes dades suggereixen que, tal i com s'espera, les macromolècules com proteoglicans (proteoglicà de septe nasal boví), amb un pes molecular promig de 230 kDa (Pasternack i col, 1974), són bàsicament insolubles en PCA. Més sorprenents són els resultats obtinguts amb glicosaminoglicans, àcid colomínic (poli 2,8 àcid N-acetil neuramínic) i proteïnes amb contingut de siàlic (mucina) que són parcialment solubles en PCA (34-68% de recuperació). Resultats semblants s'han descrit per la proteïna de baix pes molecular timosina (PM=4963Da), que té una recuperació aproximada de 66,3% en l'extracció PCA (Kauppinen i col, 1993).

Estàndard/compost	Recuperació després de l'extracció PCA %
Condroitin sulfat (n=2)	$67,5 \pm 9,1$
Proteoglicà de septe nasal boví (n=2)	$1,4 \pm 0,1$
Àcid colomínic (n=2)	$48,4 \pm 5,0$
Mucina de glàndules submaxil·lars bovines (n=2)	$34,3 \pm 3,1$
Promig de les mostres de líquid cístic (n=10)#	$34,3 \pm 12,3$

Taula 4.5: Solubilitat en PCA 0,5M dels diferents estàndards i dels líquids cístics. # Veure taula 4.6

Les mostres de líquids cístics extretes per PCA s'han analitzat per RMN d'alta resolució per determinar quina part del senyal és insoluble en PCA i conseqüentment de tipus macromolecular. En aquest sentit, s'ha considerat la creatina un metabòlit totalment extraïble en PCA, i s'ha utilitzat aquest metabòlit com estàndard intern per calcular la recuperació del compost d'interès després de la extracció, comparant els espectres *ex vivo* i *in vitro*. Un exemple de la baixa solubilitat en PCA del compost NAC incògnita es veu en la figura 4.1 (pacient HB2) i taula 4.6.

### CÀLCUL DE LA RECUPERACIÓ ALS EXTRACTES PCA DELS LÍQUIDS CÍSTICS

La recuperació post-extracció PCA s'ha calculat a partir del quocient NAC/Cr. Considerant la creatina un metabòlit totalment extraïble per PCA, es mesurava l'àrea d'aquestes dues ressonàncies, tant *ex vivo* com *in vitro*, i després es procedia al següent càlcul:

$$\left[ \left[ \frac{\text{Area NAC}_{\text{INVITRO}}}{\frac{\text{Area NAC}_{\text{EXVIVO}} \times \text{Area Cr}_{\text{INVITRO}}}{\text{Area Cr}_{\text{EXVIVO}}}} \right] \times 100 \right] = \text{RECUPERACIÓ NAC} \quad \text{eq 4.4}$$

Mostra	Percentatge de recuperació després de l'extracció PCA
AP1	46,0
CF1	33,2
CF2	29,5
CF3	52,6
GB1	37,8
GB2	26,0
HB1	41,2
HB2	18,6 + 1,9 (n=2)
HB3	46,0
ME1	11,5
Promig ± desviació estàndard	34,3 + 12,3

Taula 4.6: Solubilitat en PCA 0,5M del component NAC de les mostres de líquids cístics. Abreviatures com a la taula 4.4

Els extractes PCA de líquids cístics de diferents patologies són semblants però no iguals, presentant un patró característic de lactat, NAC, compostos amb grup trimetilamina, creatina, glutamat i glutamina. La figura 4.1 mostrava, per exemple, espectres d'un mateix pacient, *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro*.

En la comparació dels dos grups d'espectres en la figura 4.6 (previ i posterior a l'extracció PCA) es veu que, a més del pic a 2,03 ppm, altres ressonàncies no assignades a 2,2 i 2,5 ppm són parcialment insolubles en PCA i suggereixen un origen macromolecular. A part d'això, la regió trimetilamina presenta diferències quantitatives i qualitatives entre els fluids

cístics, com per exemple a les mostres ME1 i GB1, que si representessin un patró reproduïble per un determinat tipus tumoral, podria tenir interès diagnòstic. És igualment interessant remarcar que tots els fluids cístics presenten una ressonància a 3,27 ppm, que pot ser atribuïda a betaïna (Brown i col, 1989); aquest compost podria derivar de la colina i tenir una funció d'osmolit. Per altra banda, la concentració de lactat, calculada a partir del grup metil *in vitro* (1,33 ppm) ha estat variable entre les mostres (rang 0,15 – 19,30 mM) (taula 4.7). Quan s'han calculat els promitjos per tumors malignes (glioblastoma, metàstasis) o benignes (astrocitoma pilocític, hemangioblastoma, craniofaringioma), s'han obtingut valors de  $11,9 \pm 0,9$  mM pels malignes (n=3) i  $4,0 \pm 2,6$  mM pels benignes (n=7), amb diferència estadísticament significativa (p=0,001) (figura 4.9).

El contingut de lactat d'aquests líquids, clarament superior als valors de plasma (0,5-2,8 mM), suggereix que el metabolisme del tumor al voltant del cist, més que el trencament de la barrera hematoencefàlica, contribueix fortament a la seva composició química (Lohle i col, 1998b). A més, el contingut de lactat ha estat descrit per aquests mateixos autors com a significativament més elevat quan es comparen tumors cístics malignes ( $11,98 \pm 4,6$  mM) i benignes ( $6,8 \pm 2,15$  mM), i els resultats d'aquesta Tesi concorden amb aquestes dades. Aquest resultat podria ser interessant per aplicacions diagnòstiques *in vivo* (veure secció 4.1.6).

Mostra	Lactat (mM)
AP1	1,63
CF1	3,21
CF2	6,79
CF3	7,81
GB1	19,30
GB2	10,78
HB1	4,32
HB2	0,15
HB3	1,51
ME1	6,65
Promig $\pm$ desviació estàndard	6,4 + 4,4
Promig $\pm$ desviació estàndard malignes	11,9 + 0,9**
Promig $\pm$ desviació estàndard benignes	4,0 + 2,6**

Taula 4.7: Valors obtingut per a la quantificació de lactat a l'extracte PCA. \*\* Marca diferència estadísticament significativa entre malignes i benignes



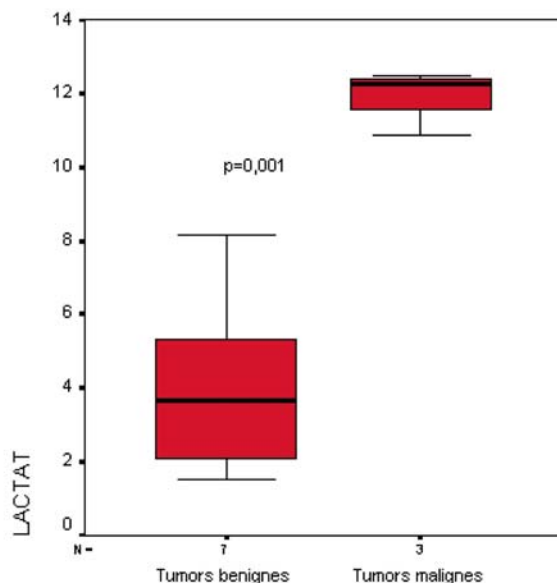


Figura 4.9: *Boxplot* dels valors de lactat calculat *in vitro* (mM) als líquids cístics provinents de tumors malignes i benignes<sup>9</sup>. N a abscissa= nombre de casos

#### 4.1.5 Determinacions químiques i de proteïnes als líquids cístics

L'anàlisi dels líquids cístics pel contingut de proteïnes no-col·lagenoses (taula 4.8) té com a resultat un promig de  $4,8 \pm 1,3$  g/dl (rang 2,8 – 6,8 g/dl) (n=10). Aquest rang és comparable amb valors prèviament descrits a la literatura (Szliwowski i Cumings, 1961; Lohle i col, 1998b; Jungreis i col, 1988). Lohle i col (1998b) van dividir els tumors estudiats en dos grups, benignes i malignes (total n=39). Per tal de comparar els valors d'aquest autor amb els nostres, hem calculat els promitjos dels valors descrits per ells, obtenint valors lleugerament inferiors per tumors malignes (3,92 g/dl, n=26) que no pas per benignes (4,49 g/dl, n=9). Els nostres resultats mostren tendències similars, (malignes, 4,54 g/dl, n=3 i benignes, 4,84 g/dl, n=7), però les diferències no han estat estadísticament significatives.

<sup>9</sup> El 'box' representa valors entre el primer i el tercer quartil; les 'whiskers' (barres) representen l'interval del percentil fins a l'últim valor més petit que l'interval interquartil (*interquartil range, IQR*) multiplicat per 1,5. IQR es defineix per la resta entre el 3<sup>er</sup> i el 1<sup>er</sup> quartil. Els valors extrems es representen de manera diferent: valors que estiguin entre IQR x 1,5 i IQR x 3 són representats amb una rodona, i valors superiors a IQR x 3 són representats amb un asterisc.

Mostra	Proteïna (g/dl)
AP1	5,4
CF1	2,8
CF2	5,7
CF3	6,8
GB1	3,5
GB2	5,7
HB1	3,5
HB2	5,2
HB3	4,2
ME1	4,4
Promig $\pm$ sd	4,8 + 1,3

Taula 4.8: Valors obtinguts a l'anàlisi de proteïna dels líquids cístics

#### 4.1.5.1 QUANTIFICACIÓ D'ÀCID HEXURÒNIC

L'assaig d'àcid hexurònic ha estat positiu per a totes les mostres. Els valors obtinguts es troben a la taula 4.10. El promig ha estat  $0,93 \pm 0,56$  mM, mentre el percentatge de compostos d'àcid hexurònic amb respecte al global calculat per RMN ha estat de 29,2%. Exemples de rectes obtingudes amb els mètodes de determinació química es mostren a la figura 4.10.

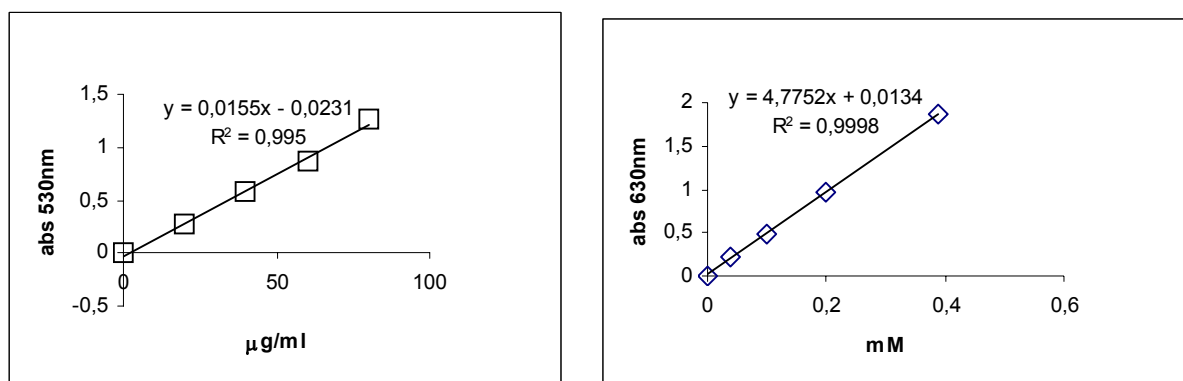


Figura 4.10: Exemples de recta patró obtingudes als anàlisis d'àcid hexurònic (esquerra) i àcid siàlic (dreta) en el rang d'interès de les mostres considerades

#### 4.1.5.2 QUANTIFICACIÓ D'ÀCID SIÀLIC

Al punt 3.9.1 s'ha descrit el canvi realitzat en relació a l'estàndard utilitzat per a la recta de calibració en la determinació d'àcid siàlic a les mostres-problema, canviant l'estàndard a mucina de glàndules submaxil·lars bovines. Prèviament al canvi, s'ha comprovat que el percentatge d'àcids siàlics descrit pel subministrador (9-15%) a la mucina era correcte, realitzant un test de determinació d'àcid siàlic en una solució de concentració coneguda de mucina. Després, a partir del resultat (11% d'àcids siàlics), s'ha calculat la quantitat de mucina necessària per cada punt de la recta de calibració (figura 4.11). La preparació de la recta de calibració es feia d'acord amb la següent taula (4.9):

Tub	conc calculada de siàlic μmol/0,5ml	ml sol mare <sup>§</sup>	ml H <sub>2</sub> O
1	0,194	0,25	0
2	0,10	0,128	0,122
3	0,05	0,064	0,186
4	0,02	0,025	0,225

Taula 4.9: Valors utilitzats per a la recta patró utilitzada a l'assaig d'àcid siàlic

§: solució mare: solució de mucina 0,12g/ml. Considerant la quantitat de siàlic detectada al test (11%), seria l'equivalent a 0,194μmol de siàlic /0,5ml.

La concentració promig d'àcid siàlic en la determinació a les mostres-problema ha estat de  $2,05 \pm 0,64$  mM i el percentatge d'aquest compost en relació al total calculat per RMN ha estat del 64,3%. Els valors individuals es troben a la taula 4.10. La metodologia analítica per la determinació quantitativa d'àcid siàlic presenta dues variacions segons el que es vulgui mesurar, àcid siàlic total o àcid siàlic lligat a altres estructures (Jourdain i col, 1971). Degut a que l'estàndard triat per a millor semblança amb la mostra (secció 3.9.1) no va ser l'àcid siàlic sinó la mucina, es van fer proves per comprovar si la pendent de la recta de calibració obtinguda variava. La figura 4.11 mostra la lleugera diferència observada en la pendent de la determinació quan s'utilitza àcid siàlic lliure o àcid siàlic lligat a mucina com a estàndard.

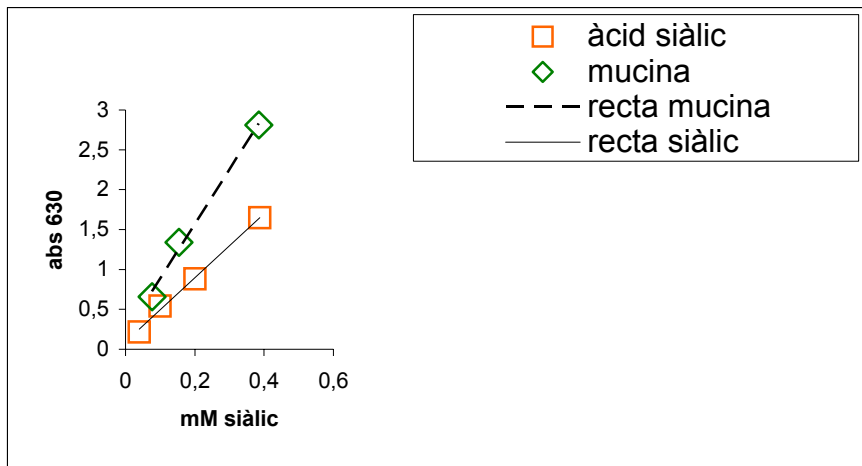


Figura 4.11: Recta de calibració per a la quantificació d'àcid siàlic en una mostra quan es fa servir com a estàndard l'àcid siàlic o la mucina

Mostra	NAC (mM)	Àcid hexurònic (mM)	Àcid siàlic (mM)	Percentatge del senyal de RMN explicat per anàlisi química
AP1	2,38	1,46	1,45	122,0
CF1	2,80	0,43	1,94	84,6
CF2	5,56	0,86	2,97	68,9
CF3	2,53	2,29	1,85	164,0
GB1	2,63	0,76	1,58	89,0
GB2	4,35	0,45	3,28	85,7
HB1	3,02	0,93	2,20	103,6
HB2	3,42	0,80 + 0,02 (n=5)	2,03	83,0
HB3	2,69	0,72	1,52	83,0
ME1	2,49	0,64	1,72	95,0
Promig ± desv. estàndard	3,19 + 1,01	0,93 + 0,56	2,05 + 0,64	93,4

Taula 4.10: Valors obtinguts per la quantificació de la ressonància NAC per RMN, per l'anàlisi d'àcid hexurònic i àcid siàlic als líquids cístics, així com el percentatge global, justificat per aquestes dues determinacions, del total quantificat per RMN

En totes les mostres de líquids cístics de tumors cerebrals humans analitzades *ex vivo* en aquest treball (n=10) s'ha detectat la ressonància NAC a 2,03 ppm que, quan comparada al quocient obtingut a l'espectre promig *in vivo* de volums cístics de tumors, ha presentat un valor semblant de quocient d'alçades NAC/creatina ( $2,82 \pm 2,25$  als espectres *in vivo* (n=19) *versus*  $2,43 \pm 1,01$  (n=10) als espectres *ex vivo*). Això suggereix que el líquid cístic obtingut

és representatiu dels patrons observats *in vivo* pel NAC. Anteriorment, també havia estat descrit un senyal a 2,03 ppm a l'espectre promig líquids cístics de 16 tumors (Tate i col, 1998), tot i que no es va continuar la seva caracterització.

Altres autors (Chang i col, 1998) també van detectar aquesta ressonància en un líquid cístic de meningioma i ho van atribuir a un compost desconegut, sense anar més enllà en la seva anàlisi. Burtscher i Holtås (2001), han descrit la ressonància NAC en un cist de metastasi i han concluït que no era coherent amb un origen del grup N-acetil del NAA. El NAC també va ser detectat en un cist glioependimal i els autors Shukla-Dave i col, 2001 ho van atribuir a "compostos N-acetilats" per inspecció visual del patró de RMN *in vivo*. L'absència d'un pic a 2,04 ppm ha estat comentada al mateix estudi, per un grup d'espectres de cists adquirits en un grup considerable de glioblastomes cístics (n=20). Només es van descriure colina i lípids/lactat. Es va enregistrar un espectre *in vivo* que també mostrava forta presència de lípids. Un treball previ d'aquests mateixos autors descriu la detecció de "NAA" a 2,02 ppm als volums cístics d'un grup de gliomes d'alt grau (n=8), baix grau (n=6) i un meningioma (Poptani i col, 1995). Això suggereix que Shukla-Dave i col (2001) podrien estar analitzant continguts necròtics, mentre els glioblastomes analitzats en aquesta tesi s'originarien parcialment de la secreció de fluid ric en proteïnes pel tumor, a més de les proteïnes exsudades de plasma degut al trencament de la barrera hematoencefàlica a causa de la progressió tumoral (Lohle i col, 1998a).

La intenció d'aquest apartat de la tesi era, doncs, caracteritzar l'origen molecular de la ressonància a 2,03 ppm per investigar patrons d'ERM que poguessin tenir aplicacions futures en la millora de tècniques no invasives de diagnòstic de tumors cerebrals humans (Tate i col, 2003) ja que actualment una part creixent del diagnòstic de tumors per ressonància magnètica està basada en la informació donada per l'empremta metabòlica obtinguda per ERM, a més de la informació donada per la IRM (Howe i Opstad, 2003).

El promig de la concentració de proteïna detectada als líquids cístics concorda amb dades prèvies de la literatura (Lohle i col, 1998b; Jungreis i col, 1988). Una revisió de les lesions cístiques de cervell (Go, 1993) descriu que 92% del contingut total de proteïna present als fluids associats a cists de tumors cerebrals humans consisteix en fraccions de proteïna plasmàtica, i se sap que algunes d'aquestes proteïnes contenen estructures glicosídiques N-acetilades (hexoses N-acetilades, àcid siàlic) que poden ser detectades per RMN a un TE de 136 ms (Bell i col, 1987; Torri i col, 1999). Seria raonable esperar contribucions d'aquestes substàncies d'alt pes molecular al patró espectral del cist per ERM. El fet de que només una

part del senyal de NAC sigui extraïble per PCA també ens indica un origen macromolecular. La fracció soluble en PCA (aproximadament 34%) pot ser explicada per la contribució de compostos de baix pes molecular, però també per la solubilitat parcial de compostos glicosídics polimèrics de siàlic o glucosamina (taula 4.5).

L'anàlisi química de les mostres per detecció d'àcid siàlic o hexurònic explica, en promig, aproximadament 93,4% de la concentració mesurada per RMN dels grups N-acetil, calculada a partir de l'espectre de 136 ms i extrapolada a TE=0. Aleshores, pràcticament tot el senyal detectable a 2,03 ppm als fluids cístics estudiats es pot originar en grups N-acetil dels compostos que contenen àcid siàlic (64%) o hexurònic (29%). Quan es considera l'espectre obtingut amb la seqüència de pols-adquisició (TE=0ms), la concentració promig calculada per integració a  $2,03 \pm 0,07$  ppm augmenta a més que el doble ( $7,55 \pm 1,66$  mM) suggerint que hi ha components de  $T_2$  curt, probablement aminoàcids a proteïnes, contribuint a aquesta ressonància. D'altra banda, aquests compostos no són rellevants per a la interpretació dels espectres *in vivo* obtinguts als temps d'eco habituals a la clínica (TE>20ms).

També s'ha de tenir en compte que, assumint que l'àcid hexurònic pot representar una bona estimació per als grups N-acetil presents en glicosaminoglicans (GAGs) (p.ex. condroitin sulfat), el quocient entre els grups N-acetil provinent de siàlic i els grups provinents de GAGs originada a les mostres analitzades en aquest treball és de 2,2 (calculada a partir de les concentracions detectades pels mètodes químics). Les dades descrites per aquest mateix quocient a Torri i col (1999), per plasma de pacients amb càncer, tenen un quocient calculat de 0,28; d'aquesta manera, hipotetitzem que per a aquesta ressonància NAC, la composició dels fluids cístics analitzats no segueixen, com tampoc ho feien en el cas del lactat, la composició i els valors típics de plasma, i ens apunten a una contribució important de substàncies derivades del tumor.

Havent discutit l'origen del pic a 2,03 ppm en fluids cístics, des del punt de vista espectroscòpic i cel·lular, és important considerar el possible origen en teixit sòlid, ja sigui normal o patològic. Hanstock i col (1989) han proposat que la ressonància de NAA a parènquima cerebral normal no podria ser deguda només a NAA ja que el quocient 2,05/2,65 ppm era més elevat en un espectre *in vivo* que en un espectre de dissolució model de NAA adquirit en condicions comparables. Altres autors (Gill i col, 1990; Gadian i col, 1991; Usenius i col, 1994b) també van observar que el quocient NAA/Cr del parènquima cerebral humà *in vivo* és superior al quocient esperat d'espectres d'extractes PCA, possiblement reflexant una contribució significativa al senyal "NAA" de compostos macromoleculares

insolubles en PCA. Usenius i col (1994b) descriuen al seu treball que el pic assignat a 'NAA' en astrocitomes malignes presentava una disminució del seu  $T_2$  (considerant el  $T_2$  esperat per NAA) en un ordre d'aproximadament 40%, el que també podria indicar que el pic assignat a NAA pot estar compostat d'altres substàncies d'estructura diferent.

Nadler i Cooper (1972) van estudiar el contingut en NAA del teixit nerviós boví i de tumors cerebrals, atribuint qualsevol senyal de NAA observat a la contaminació per teixit adjacent. Aquesta hipòtesi va ser recolçada per altres autors (Kinoshita i col, 1994); per altra banda, Gadian i col (1991) i Castillo i col (1998) ja havien ressaltat la possibilitat de que altres compostos que no fossin NAA poguessin contribuir al senyal detectat en tumors cerebrals humans. Això estaria d'acord amb els resultats presentats en aquesta tesi si tenim en compte els resultats obtinguts amb els líquids cístics i si considerem que quelcom semblant podria ocórrer en tumors sòlids. Actualment se sap que cèl·lules tumorals alliberen components macromoleculars que contenen àcid siàlic al medi extracel·lular que envolta el tumor (Heaney-Kieras i col, 1986; Badcock i col, 1999; Borsig i col, 2001). Segons Hollingsworth i Swanson (2004), les mucines tenen un rol central en la supervivència de la cèl·lula a condicions adverses de pH, hidratació i oxigenació, fet que podria ser summament important en les cèl·lules tumorals per garantir la seva viabilitat. Aquest mateix autor, a més ressaltava que algunes mucines associades a membrana presenten dominis homòlegs a la família del factor de creixement epidèrmic (EGF), que ja se sap que és molt important al desenvolupament d'alguns tipus de tumors, com els glioblastomes (Kleihues i Ohgaki, 1999). Les cèl·lules tumorals moltes vegades secreten mucines aberrants i anormals, amb alliberació de fragments actius que poden interaccionar amb altres molècules i receptors, i noves combinacions de mucines poden tenir un rol molt important en la invasió i metastàsis (Hollingsworth i Swanson, 2004). Aquests compostos alliberats, com les mucines i els glicosaminoglicans, podrien ser visibles per RMN, tot i estar associats a les cèl·lules o a la matriu extracel·lular tumoral.

Pel que fa a tumors sòlids, darrerament s'estan publicant molts estudis amb l'ús de HR-MAS, com per exemple Mahon i col (2004) que han investigat tumors cervicals, i han observat una ressonància a 2 ppm, tant *in vivo* com *ex vivo*, significativament diferent dels controls que no presentaven aquesta ressonància i que, per tant, podria tenir un origen macromolecular semblant a la dels líquids cístics estudiats en aquest treball.

## 4.1.6 Resultats obtinguts amb reconeixement de patrons d'espectres de líquids cístics *in vivo*

### 4.1.6.1 LÍQUIDS CÍSTICS PRODUÏTS PER TUMORS BENIGNES *VERSUS* MALIGNES *VERSUS* ABSCESSOS

En la primera de les cerques d'un possible classificador en líquids cístics *in vivo* comentades a mètodes (secció 3.11.1.3, tria de les variables), s'han obtingut com a variables correlacionades significativament amb les classes que ens interessaven un total de 24 variables del patró espectral, algunes d'elles punts veïns extremadament correlacionats. S'ha executat l'Anàlisi Lineal Discriminant (*Linear Discriminant Analysis*, LDA) amb totes aquestes variables, però deixant que el sistema (SPSS) triés les millors per a aquest cas. El programa ha triat inicialment 5 variables, que es detallen a continuació (taula 4.11).

Variable	Ppm	Coefficient X	Coefficient Y	Explicació possible
166	3,94	0,184	-0,06	Creatina
261	2,11	-0,336	-0,019	Glx, NAC
268	1,98	0,129	0,188	Acetat, GABA, NAC
302	1,33	0,148	-0,029	Lactat
307	1,23	-0,242	0,198	Lactat, Aa, lípids

Taula 4.11: Variables triades per a la discriminació entre líquids cístics de tumors benignes *vs* malignes *vs* abscessos; correlació amb ppm, coeficients en X i Y i possible explicació metabòlica.

Aquest nombre de variables s'ha considerat excessiu, donat que el grup 'líquids cístics benignes' tenia una  $n=6$  (el màxim recomanable per evitar sobreentrenament del sistema es aproximadament  $n/3$  del grup menys nombrós). S'han provat combinacions diverses de variables, de manera a aconseguir igualment una bona classificació però amb un nombre més adequat de variables.

El resultat de compromís més adient s'ha aconseguit amb les variables 261, 302 i 307, corresponent a les posicions en ppm de glx i lactat. El grau d'incert va ser de 88,9% i el nombre de variables, encara que no era l'ideal quant a maximitzar l'incert, va ser més adequat per a reduir el risc de sobreentrenament. Les figures 4.12 A i B mostren les representacions



obtingudes amb el prototip científic INTERPRET adaptat al GABRMN per al seu ús en aquest tipus de casos, emprant les variables triades pel programa SPSS. La fórmula utilitzada per a les representacions gràfiques són aquestes variables multiplicades pels respectius coeficients de ponderació (també proporcionats pel programa SPSS). Per a una explicació completa de les utilitats i pantalles del prototip científic veure l'annex VII.

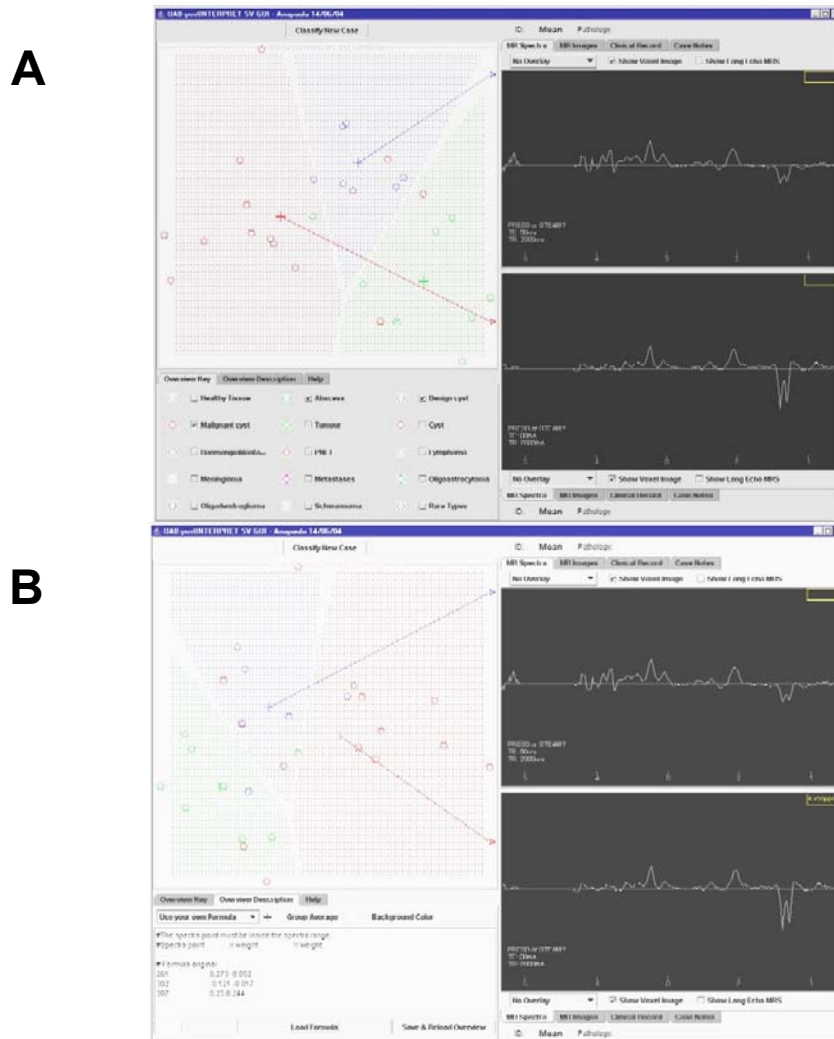


Figura 4.12: “Univers” dels casos d’espectres *in vivo* de líquids cístics a TE llarg (136 ms) al prototip científic INTERPRET, A) LDA amb 6 variables i B) LDA amb 3 variables. En detall, a les pantalles negres de la dreta, els espectres promig de líquids cístics de tumors benignes (amunt) i malignes (a baix). En vermell, els líquids cístics de tumors malignes; en blau, els líquids cístics de tumors benignes i en verd, els abscessos.

La separació és clara i el resultat dels promitjos és bastant informatiu, perquè denota clarament la diferència observada en el pic del lactat, un cop processats, normalitzats i fet el promig dels espectres. Una de les posicions importants per a aquesta discriminació (variable 307) es podria deure en part a ressonàncies d’aminoàcids, el que està amplament documentat

com a important per la discriminació dels abscessos (Martínez-Perez i col, 1997, Grand i col, 1999, Burtscher i Holtås, 1999). Quant al lactat, està també generalment present en espectres *in vivo* de líquids cístics (Chang i col, 1998) encara que en el cas d'aquests autors, no s'hagi quantificat ni comparat tumors benignes i malignes. Seguint la lògica aplicada als tumors malignes, revisions com la de Howe i Opstad (2003), entre altres, ens comproven que el lactat és freqüentment observat en patrons espectrals de tumors *in vivo*, sent més prominent en tumors de graus més alts. D'aquesta forma, és d'esperar que no només estigui més augmentat visualment als promitjos de líquids cístics, com també sigui una important variable discriminatòria. El pic de NAC, encara que sigui d'interès i que probablement tingui algun significat en el comportament tumoral, no ha estat triat pel programa com a variable important. La seva introducció forçosa no ha empitjorat la classificació però tampoc l'ha millorat. Això, entre altres motius, pot ser degut a la utilització del sistema de normalització d'espectres emprada (*unit length*).

Aquest classificador podria ser interessant en els casos que un tumor cístic no tingués un diagnòstic clar considerant les dades accessibles (història clínica, exploracions IRM, ERM de la part sòlida del tumor), i que la decisió entre benigne, maligne o abscess pogués ser determinant en la tria de terapèutica o procediments quirúrgics.

#### **4.1.6.2 COMPARACIÓ ENTRE PATRÓ ESPECTRAL DE LA PART SÒLIDA DE TUMORS, PARÈNQUIMA CEREBRAL NORMAL I LÍQUIDS CÍSTICS**

En un primer intent de trobar les correlacions de Pearson més significatives i elevades per a aquesta discriminació, el programa SPSS va suggerir un total de 110 variables significatives. Un altre cop, moltes de les variables eren diferents punts del perfil espectral d'un mateix metabòlit, i d'aquesta manera estaven altament correlacionades entre elles també. Utilitzant aquestes variables inicialment per a una LDA amb tria lliure de variables, una primera avaluació va tenir el resultat descrit a la taula 4.12.

En aquesta LDA, tot i que els grups eren més nombrosos que en l'anterior, un altre cop el nombre de variables era excessiu en relació al grup més petit (11 variables triades i grup més petit n=15). Novament era necessari reduir el nombre de variables. Per tant, observant les variables triades en aquest anàlisi, s'ha fet una aproximació conseqüent i, entre elles, s'han

seleccionat aquelles que s'haguessin repetit en més d'una comparació bilateral. Això era correcte per a les variables marcades a la taula 4.12 amb un asterisc.

Variable	ppm	Coefficient X	Coefficient Y	Explicació possible
153	4,18	0,043	-0,045	Lac
163*	3,99	-0,057	0,033	Lac
202*	3,24	-0,017	0,028	Trimetilamina
219	2,92	0,15	-0,111	Creatina
223	2,84	-0,134	0,19	Aspartat
230*	2,71	-0,189	0,06	?
261*	2,11	-0,067	-0,251	Glx
264*	2,06	0,236	0,107	NAC
270	1,94	-0,002	-0,102	GABA, acetat
281	1,73	0,077	-0,114	Macromolècules
296*	1,44	-0,064	0,12	Alanina

Taula 4.12: Variables triades per a la discriminació entre part sòlida de tots els tumors, parènquima cerebral normal i líquids cístics, i possible explicació metabòlica. Les variables marcades amb un asterisc s'han repetit com a altament correlacionades a més d'una comparació bilateral.

Una nova LDA forçant la utilització d'aquestes variables (les que s'havien repetit) ha donat un resultat de 96,3% d'encerts, el que encara és un molt bon resultat. El nombre de variables era més adequat, encara que no l'ideal, en relació al grup més petit. Les figures 4.13 A i B mostren la disposició de "l'univers" dels casos al prototip científic adaptat INTERPRET.

La correlació entre les variables triades pel sistema i els ppm és bastant lògica ja que els principals pics que es modifiquen radicalment quan un teixit cerebral passa de normal a tumoral són NAC i els compostos amb grup trimetilamina (també anomenats genèricament en la literatura del camp com "colina") (Howe i Opstad, 2003; Murphy i col, 2002). El NAC, en el cas de cervell normal és predominantment N-acetil aspartat i és un marcador neuronal; la seva disminució porta a deduir que el teixit normal està sent substituït per teixit tumoral o anormal (com és el cas, per exemple, de malalties degeneratives o desmielinitzants). La presència d'alanina al classificador pot ser el resultat de la elevada quantitat de meningiomes (n=67), caracteritzats per l'augment d'aquest metabòlit (Howe i Opstad, 2003). Per tant aquest compost pot ser important com a marcador de grup *tumors*, així com possiblement

també el glx. La “colina” és un marcador d’augment de proliferació exhaustivament estudiat, i tot i que *in vivo* representa la suma de diferents metabòlits, la seva correlació amb un augment del ritme de divisió cel·lular està bastant clara (Castillo i col, 1998).

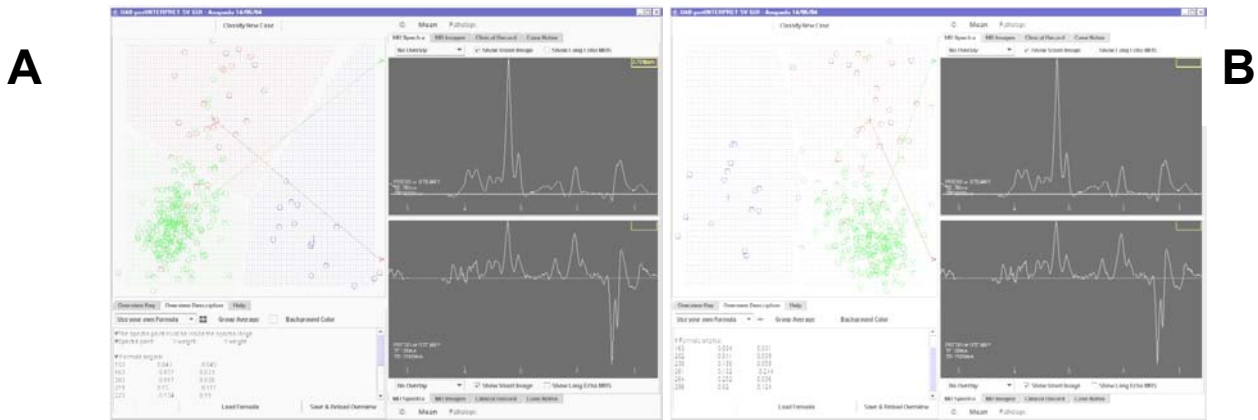


Figura 4.13: A l’esquerra, disposició dels casos d’espectres *in vivo* a TE llarg (136 ms) de tumors (en verd), parènquima cerebral normal (en blau) i líquids cístics (en vermell) al prototip científic INTERPRET, A) LDA amb 11 variables inicials i B) LDA amb 6 variables. A les pantalles negres de la dreta, amunt el promig dels espectres de tots els tumors, i a baix el de tots els líquids cístics.

De manera general, un clínic no necessita un classificador per decidir si una regió d’interès es tracta de teixit normal, tumor o líquid cístic. En la majoria dels casos, la captació de contrast, les característiques d’imatge i la història clínica donen els elements suficients per a aquesta decisió. Aquesta discriminació vindrà a ser important en casos poc clars, on la regió cística no sigui clarament delimitada, o bé en casos que no es tracten de cap dels tipus analitzats (tumor, normal, líquid cístic). El nostre grup ha fet assajos preliminars amb aquest classificador en un cas de malaltia desmielinitzant, i la informació donada com a resultat situava el cas de manera clara, fora de qualsevol grup patològic però també bastant allunyat del patró normal, sent un important missatge que, tot i que no seria una regió amb patró tumoral, ni abscess, tampoc es tractaria d’un patró de cervell normal.

Un altre punt important és que la informació espectroscòpica, a diferència de la imatge, és un promig de la zona estudiada; la col·locació del vòxel en una zona parcialment tumoral i parcialment cística podria distorsionar la possible interpretació espectral (Ricci i col, 2000). Per tant, un resultat del classificador suggerint un patró espectral compatible amb parènquima cerebral normal o amb líquid cístic (quan el radiòleg creia haver situat el vòxel sobre teixit tumoral sòlid principalment), suggeriria que no seria correcte intentar emprar el patró espectral obtingut per a classificar el tipus tumoral estudiat.

És evident que aquests estudis, sobretot la part de classificació amb subdivisió dels líquids cístics, necessita encara més casos per a un millor entrenament del sistema de classificació, així com casos de test independents que puguin comprovar la eficàcia del sistema desenvolupat.

En resum, s'ha desenvolupat, a partir dels casos d'espectres *in vivo* continguts a la base de dades INTERPRET, dos classificadors preliminars; un per reconèixer líquids cístics associats a tumors benignes, malignes o abscessos, amb un percentatge d'encert d'un 88,9%. Per altra banda, s'ha desenvolupat també un classificador per distingir entre vòxels posicionats en líquids cístics, tumors o bé teixit normal, amb un percentatge d'encert d'un 96,3%.

## **4.2 Estudis *in vitro* amb els extractes de les biòpsies sòlides de tumors cerebrals humans: resultats generals**

Els estudis realitzats amb extractes PCA i la seva quantificació s'ha basat en bona part en estudis ja començats en el nostre grup, estudis fets per altres autors i també en intents de resposta a les preguntes formulades pels radiòlegs que analitzen espectres de pacients *in vivo* diàriament en la clínica. L'objectiu era de, a més d'efectuar una comparació amb altres estudis ja fets, aportar més coneixement a la pràctica clínica degut a l'anàlisi en condicions d'alta resolució, confirmant o rebutjant hipòtesis formulades davant d'un espectre *in vivo*, portant a una millora de la confiança del radiòleg en la tipificació tumoral basada en el patró espectroscòpic.

### **4.2.1 Distribució de les patologies i dades dels extractes**

És important remarcar que alguns grups de patologies no tenen prou nombre d'observacions per confirmar o rebutjar les possibles hipòtesis o preguntes plantejades. En general, són patologies a les quals la pràctica clínica no orienta cap a una intervenció quirúrgica i per tant no es recull biòpsia, o bé que són tan poc freqüents que no hi ha un nombre significatiu de biòpsies per analitzar. Un altre problema és el factor limitant que ens imposa la mida de la biòpsia recollida, ja que la manipulació de mostres petites implica un percentatge de pèrdues molt elevat. El pes de teixit utilitzat va ser de  $0,126 \pm 0,136$ g (n=97) per a les mostres processades en aquest treball, i la distribució de les patologies s'ensenya a la

figura 4.14. Es van considerar, a efectes de resultats, també les biòpsies recollides i quantificades anteriorment a aquest treball dins del GABRMN.

Com es pot observar en aquest gràfic, els glioblastomes abarquen una bona part del total de les biòpsies estudiades; això es deu tant a que són molt freqüents, com a que la intervenció quirúrgica es practica gairebé sempre, amb poques excepcions. Juntament amb els meningiomes i les metàstasis, són responsables per més del 50% del total de les mostres estudiades, el que en certa forma concorda amb les proporcions citades a la introducció. Els astrocitomes de baix grau surten aquí poc representats en relació a la proporció de tumors esperada, bàsicament perquè en molts casos no s'operen i la terapèutica opta per un tractament no invasiu. Als astrocítics d'alt grau (grau III) s'opta per la intervenció, però la seva discriminació dels glioblastomes és molt difícil, i l'encert de l'anatomia patològica depèn del mostreig encertat del tumor, així com el patró de l'extracció PCA també depèn de la zona de la qual s'hagi realitzat la biòpsia.

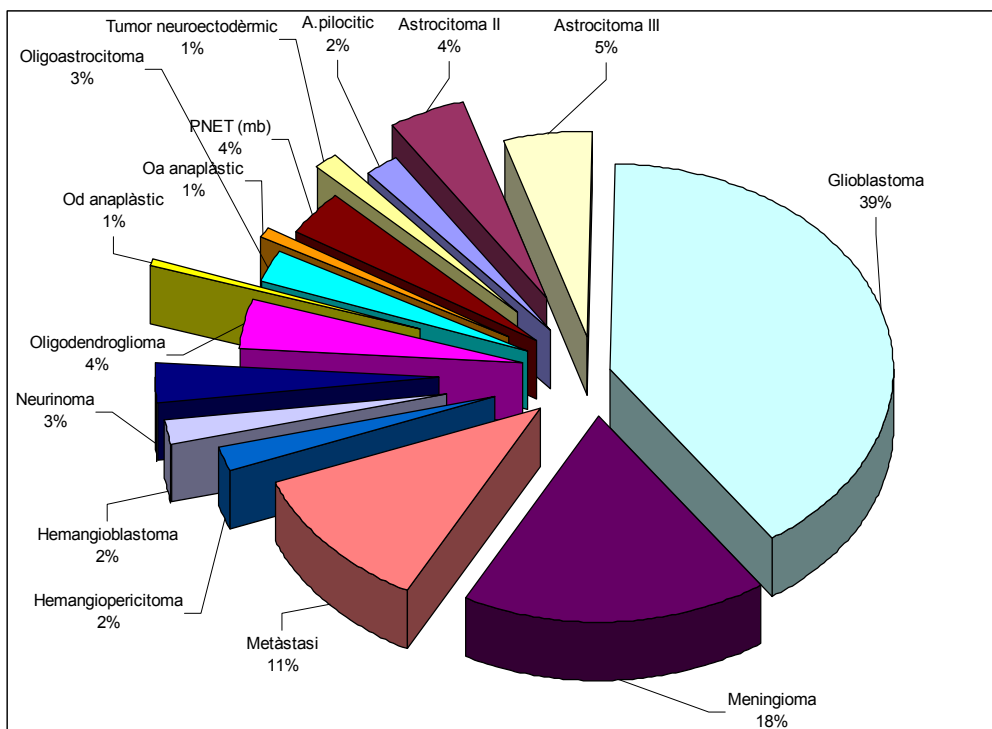


Figura 4.14: Representació percentual de les diferents patologies tumorals de les biòpsies estudiades. Od= oligodendroglioma; A.pilocític= astrocitoma pilocític; mb= medul·loblastoma, oa=oligoastrocitoma.

La figura 4.12 il·lustra un espectre característic d'extracte PCA de biòpsia, amb les principals assignacions. Les taules 4.13A i B presenten els valors tabulats de metabòlits. Els valors normals són recopilacions de bibliografia (Perry i col, 1981; Peeling i Sutherland, 1992; Kinoshita i col, 1994; Ala-Korpela i col, 1996).

El pH\* final ajustat del sobrenedant d'extracció va ser de  $7,06 \pm 0,22$  per als extractes PCA de biopsies sòlides. En línies generals, s'han analitzat els valors obtinguts a tots els espectres, amb la possible explicació metabòlica per l'augment o disminució del metabòlit en qüestió. Hem també adreçat qüestions específiques en relació a determinats tipus tumorals que poden ser dubte diagnòstic a la clínica i on seria de gran valia conèixer la composició metabòlica del tumor en qüestió. L'anàlisi *in vitro* pot donar respostes a aquestes preguntes i auxiliar la pràctica clínica, augmentant la confiança en la informació proporcionada pels classificadors basats en patrons espectrals *in vivo*.

#### 4.2.2 Anàlisi dels metabòlits quantificats

Els principals metabòlits detectats i quantificats estan llistats a la taula 4.14. Els metabòlits són quantificats directament dels espectres adquirits amb prou temps de reciclatge per a no saturar les ressonàncies d'interès (10 segons). La quantificació està descrita a la secció 3.7.1.1 de materials i mètodes. La rapidesa en la congelació de la mostra és un factor important a tenir en compte per interpretar el patró espectral degut al metabolisme post-ressecció i que es dona de manera molt ràpida. El lloc del qual el neurocirurgià recull la mostra és també molt important, ja que d'acord amb Peeling i Sutherland (1992) hi ha elevades diferències en la concentració de metabòlits segons la mostra pertany a la part superficial del tumor, al tumor pròpiament (part interna) o a un possible centre necròtic. Hi pot haver, doncs, discrepància entre grau de l'anatomia patològica i el patró espectral, si la mostra enviada a anatomia patològica no coincideix amb la regió explorada per RMN.

L'anàlisi d'aquestes dades es detalla en les seccions següents.

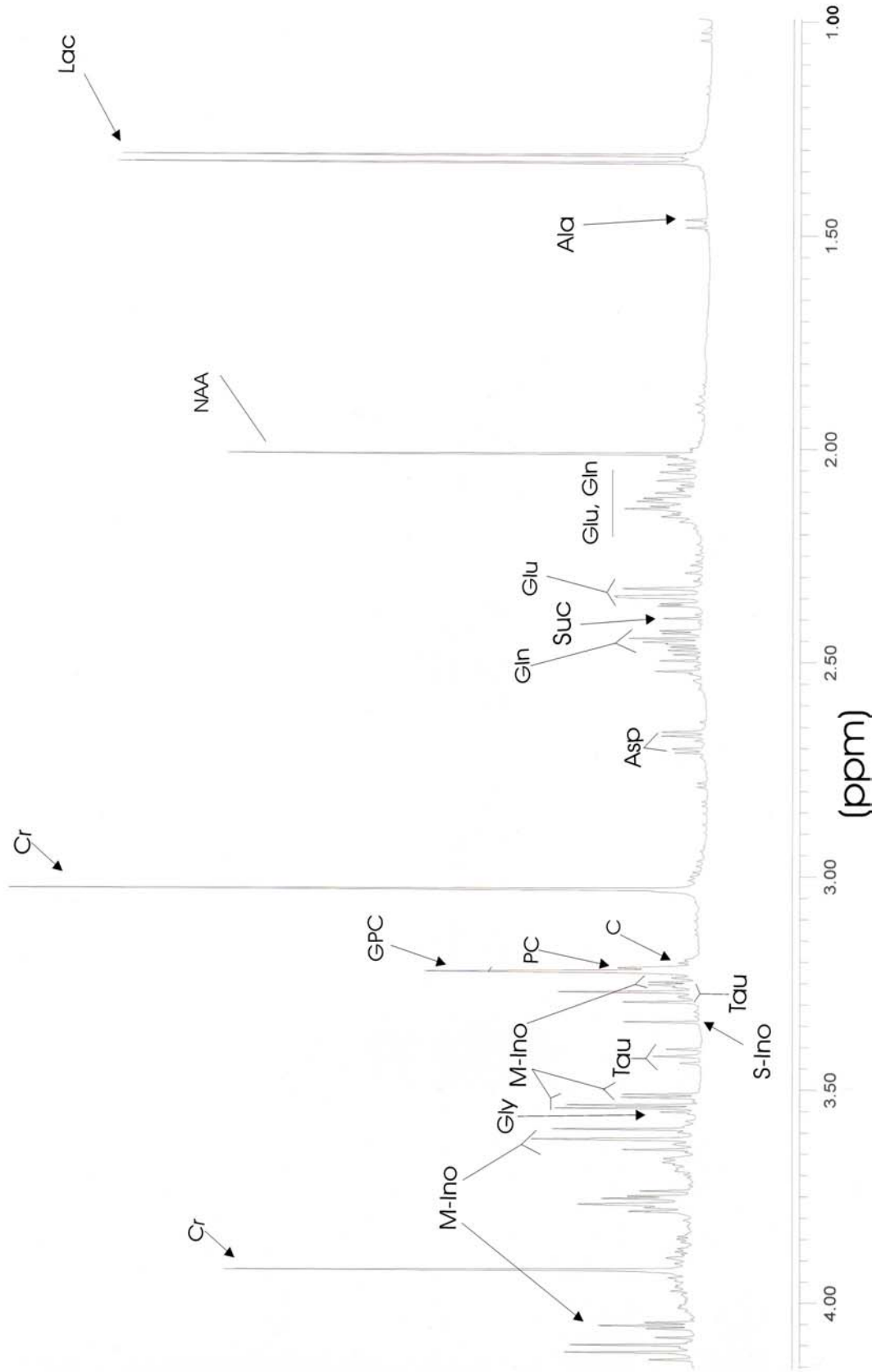


Figura 4.15: Fragment (0-4,1 ppm) d'espectre  $^1\text{H}$  a 9,4T d'extracte PCA de la biòpsia del pacient 179, diagnosticat d'astrocitoma anaplàstic, amb les principals assignacions espectrals. Abreviatures: lac= lactat, ala= alanina, gly= glicina, cr= creatina, GABA= àcid gama-aminobutíric, glu= glutamat, gln= glutamina, NAA= N-acetil aspartat, tau= taurina, m-Ino= myo-inositol, C= colina, PC= fosfocolina, GPC= glicerofosfocolina, Aa= aminoàcids, Suc= succinat, asp=aspartat, S-Ino= escil·lo inositol.



Patologia		A. Pilo (n=3)	A2 (n=7)	A3 (n=8)	GB (n=59)	MM (n=29)	MB (n=6)	ME (n=18)
Metabòlit	Normal							
gly	0,82±0,2*	2,10±1,08	1,98±0,54	1,18±0,29	3,22±0,62	1,80±0,22	2,27±1,05	3,18±0,71
m-Ino	5,55±0,2@	7,05±0,80	5,22±2,46	5,20±0,93	3,81±0,52	1,63±0,31	1,63±0,40	5,33±1,04
s-Ino	-	0,47±0,12	0,28±0,13	0,28±0,06	0,26±0,04	0,08±0,02	0,36±0,15	0,40±0,09
taurina	1,52±0,29*	2,53±0,90	0,91±0,20	1,27±0,24	2,05±0,26	2,39±0,34	4,37±2,45	5,76±1,15
Colina	0,17\$	0,34±0,14	0,44±0,14	0,23±0,08	0,62±0,13	0,26±0,04	0,70±0,57	1,22±0,39
Fosfocolina	0,09\$	0,40±0,20	0,47±0,14	0,38±0,11	0,59±0,07	0,69±0,07	1,35±0,49	1,31±0,26
Glicerofosfolina	0,98\$	0,95±0,33	1,12±0,50	0,83±0,22	0,59±0,07	0,32±0,06	1,79±0,90	0,66±0,13
Colina total &	1,24\$	1,69±0,63	2,03±0,71	1,44±0,34	1,80±0,18	1,27±0,14	3,91±1,73	3,19±0,61
Creatina	10,76±0,1*	3,64±0,86	2,66±1,33	4,44±1,31	3,15±0,30	1,19±0,18	3,67±1,15	1,85±0,28
GABA	-	2,16±2,16 [2-1]	0,95±0,52 [5-2]	1,66±0,99 [6-3]	2,43±0,48 [47-30]	5,87±2,37 [6-5]	2,47±1,52 [3-2]	3,00±1,12 [14-9]
Alanina	0,92±0,19*	0,99±0,24	1,40±0,24	1,05±0,25	3,55±0,61	2,99±0,60	1,82±0,62	7,05±2,62
Glutamat	9,04#	2,36±0,71	2,04±0,45	4,04±1,69	4,60±0,62	3,71±0,59	2,29±0,56	5,97±1,52
Glutamina	6,30#	3,43±1,16	4,04±1,94	3,80±1,00	3,06±0,37	4,76±0,68	1,82±0,89	1,98±0,59
NAA	5,56±0,3*	0,54 [1]	0,46±0,43 [2]	2,49±1,40 [5]	0,60±0,16 [18]	2,86 [1]	0,87±0,57 [3]	1,34±0,98 [3]

Taula 4.13.A: Valors obtinguts als extractes PCA de les biòpsies analitzades ( $\mu\text{mol/g}$  teixit fresc), expressats en mitja  $\pm$  SEM. (\* Kinoshita et al, 1994 expressats en mitja  $\pm$  sd. \$Aia Korpela i col, 1996. # Perry i col, 1981 @ Peeling i Sutherland, 1992). Els valors entre corxets, per al GABA, signifiquen el nombre de mostres en que s'ha quantificat aquesta ressonància i el nombre de mostres on s'ha detectat el GABA; per NAA significa el nombre de mostres on s'ha detectat aquest compost nd= no detectat; nq= no quantificat. &= quantificació de colina (suma dels valors trobats a C+PC+GPC). Abreviatures dels tipus tumorals a la taula 4.13B.

Patologia											
Metabolit	HP (n=4)	HB (n=3)	NE (n=5)	OD (n=6)	Oda (n=1)	OA (n=3)	OAA (n=1)	LY (n=1)	T.neu (n=2)		
gly	1,36±0,29	1,65±0,51	0,70±0,16	1,54±0,43	1,14	2,81±0,61	3,85	3,59	2,28±0,47		
m-Ino	10,43±3,04	2,71±0,18	2,17±0,51	2,48±0,87	1,04	3,15±1,09	2,63	0,97	4,93±1,10		
s-Ino	0,34±0,06	0,18±0,04	0,37±0,08	0,30±0,12	nd	0,20±0,05	0,33	0,07	0,89±0,59		
taurina	1,70±0,36	1,82±0,37	1,06±0,12	0,81±0,29	0,99	1,74±0,68	1,53	3,90	2,19±1,84		
Colina	0,19±0,05	0,37±0,05	0,65±0,23	0,74±0,54	0,17	0,57±0,27	0,40	0,16	2,71 [1]		
Fosfocolina	0,76±0,24	0,58±0,08	1,09±0,53	0,65±0,28	0,19	0,81±0,28	1,88	1,26	2,97±1,44		
Glicerofosfocolina	0,52±0,17	0,53±0,05	1,42±0,59	0,48±0,13	0,08	1,06±0,42	1,86	0,33	2,11 [1]		
Colina total &	1,48±0,46	1,49±0,08	3,17±1,31	1,87±0,83	0,44	2,44±0,63	4,13	1,75	5,38±0,96		
Creatina	2,71±0,75	2,85±1,32	2,56±1,51	2,93±0,80	0,78	1,96±0,50	2,25	0,33	5,63±3,07		
GABA	nd [1]	nq	0,58±0,41 [4-2]	1,94 [3-1]	nq	0,99 [3-2]	nq	nq	4,07±3,35		
Alanina	1,87±0,52	1,32±0,48	1,25±0,31	0,78±0,25	nq	3,80±1,89	nq	2,11	4,51±1,59		
Glutamat	4,27±0,88	3,02±0,17	1,64±0,88	1,10±0,22	1,97	3,39±0,61	3,02	3,80	4,14±2,70		
Glutamina	2,63±0,73	2,46±0,89	2,09±0,92	1,94±0,65	1,75	1,88±1,10	1,51	2,12	4,48±0,90		
NAA	nd	nd	2,99 [1]	1,02±0,38 [5]	nd	0,80±0,58 [2]	nd	nd	6,23 [1]		

Taula 4.13.B: Valors obtinguts als extractes PCA de les biòpsies analitzades ( $\mu\text{mol/g}$  teixit fresc), expressats en mitjana  $\pm$  SEM. A.pilo= astrocitoma pilocític; A2= astrocitoma grau II; A3= astrocitoma grau III; GB= glioblastoma; MM= meningioma meningotelial; MB= medul·loblastoma; ME= metastàsis; HP= hemangiopericitoma; HB= hemangioblastoma; NE= neurinoma; OD= oligodendrogloma; Oda= oligodendrogloma anaplàstic; OA= oligoastrocitoma; OAA= oligoastrocitoma anaplàstic; LY= limfoma; T.neu= tumor neuroectodèrmic disembioplàstic.

Metabòlit	ppm	Multiplicitat
Lactat	1,35	Doblet
Alanina	1,47	Doblet
GABA	1,89	Multiplet
Acetat	1,92	Singlet
N-acetil aspartat	2,02	Singlet
Glutamat	2,10	Multiplet
Glutamina	2,14	Multiplet
GABA	2,30	Triplet
Glutamat	2,35	Triplet
Succinat	2,42	Singlet
Glutamina	2,46	Triplet
N-acetil aspartat	2,50	Doblet de dobles
GABA	3,01	Triplet
Creatina	3,03	Singlet
Colina	3,20	Singlet
<i>Myo</i> -Inositol	3,28	Triplet
Taurina	3,27	Triplet
<i>Scyllo</i> -inositol	3,35	Singlet
Taurina	3,43	Triplet
Colina	3,52	Triplet
<i>Myo</i> -inositol	3,55	Doblet de dobles
Glicina	3,56	Singlet
<i>Myo</i> -inositol	3,63	Triplet
Glutamat	3,77	Triplet
Glutamina	3,78	Triplet
Alanina	3,79	Quadruplet
Creatina	3,93	Singlet
<i>Myo</i> -inositol	4,06	Triplet
Lactat	4,11	Quadruplet

Taula 4.14: Assignacions i multiplicitat dels principals metabòlits observables a espectres *in vitro* de tumors i altres patologies cerebrals humanes.

### **4.3 Correlació entre patrons espectrals *in vivo*, dissolucions model a camp clínic i dades d'extractes de biòpsies *in vitro***

#### **Myo-Inositol i Glicina**

##### **4.3.1.1 ESTUDIS *IN VIVO* I AMB DISSOLUCIONS MODEL**

Els estudis en relació al contingut i detectabilitat de myo-Inositol (m-Ino) i glicina (gly) han estat planificats amb l'objectiu de determinar amb un grau considerable d'exactitud la quantitat de m-Ino i gly que estan presents en l'espectre *in vivo* d'un determinat tumor, ja que aquest senyal es considerava important per discriminació i gradació de tumors glials (Castillo i col, 2000) i aquesta hipòtesi és actualment ratificada per molts autors (Majós i col, 2003; Howe i Opstad, 2003; Galanaud i col, 2003).

Treballs previs fets al nostre grup (Barba i col, 2001) han descrit que, degut a l'acoblament escalar entre protons veïns, s'observa una forta modulació de les ressonàncies del m-Ino sobretot a TE llargs, tal i com també havia observat Barton i col, 1999. Aquesta modulació modifica el nombre aparent de ressonàncies observades i les seves intensitats segons el TE emprat i, conseqüentment, la relació entre l'àrea observada empíricament i el nombre de protons que donen origen a aquesta ressonància (Michaelis i col, 1991). Per investigar si els espectres *in vivo* emmagatzemats a la base de dades INTEPRET també seguien el patró descrit per aquesta ressonància, s'ha realitzat la mesura d'aquestes dues ressonàncies als dos TE en tots els espectres de tumors glials (a2, a3, gb i od), mitjançant alçades tal i com s'explica a l'apartat 3.5.3 de mètodes, i realitzat la representació d'aquest quocient en forma de *boxplot* (figura 4.16). Aquesta mesura ens dóna una indicació de la disminució del pic de 3,55 ppm a TE llarg, i s'observa clarament la tendència d'una major disminució a TE llarg (quocient  $R_{mI,gly/Cr}$  més elevat) en pacients amb tumors glials de més baix grau, amb tendència a que el pic es mantingui constant en tumors de grau més alt, indicant una proporció més elevada de glicina (que no modula amb quan es modifica el TE).

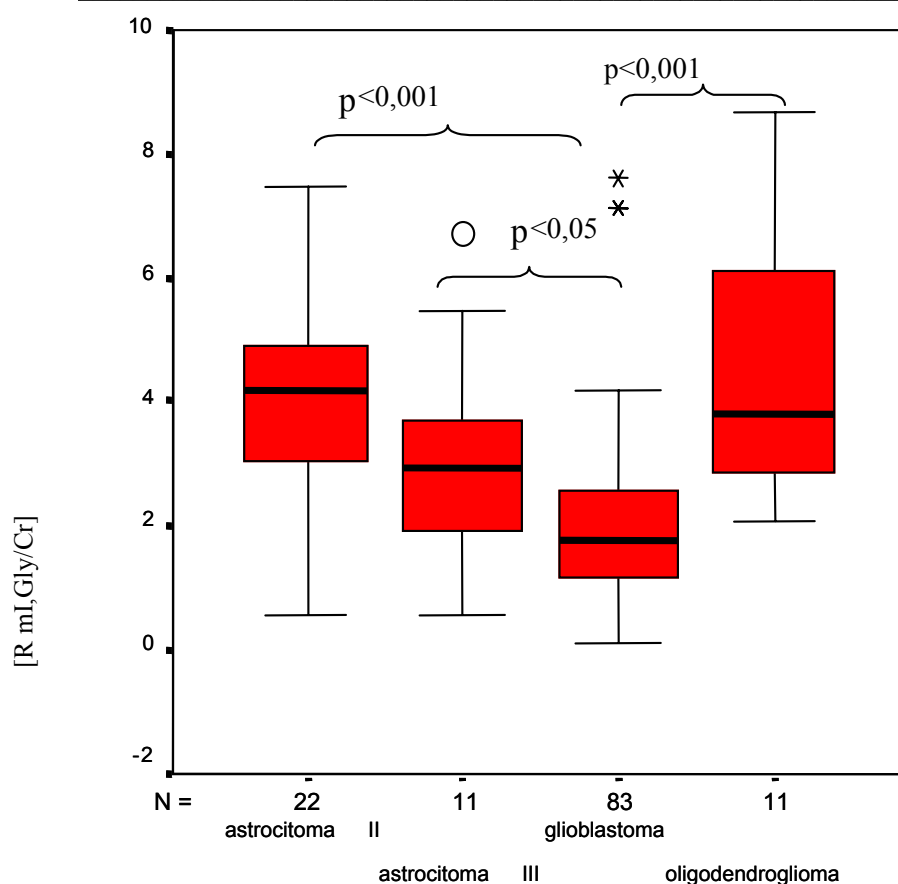


Figura 4.16: *Boxplot* del quocient dels pics 3,55/3,03 a TE curt i llarg (R mI,Gly/Cr) per quatre tipus de tumor glial de la base de dades del projecte INTERPRET. N a abscissa= nombre de casos. Per a detalls de la representació dels *boxplots*, veure figura 4.9.

La figura 4.17 representa espectres promig de tumors astrocítics *in vivo*, realitzats en el marc del projecte INTERPRET (<http://carbon.uab.es/INTERPRET>). Com es pot observar en aquests espectres promig, la disminució aparent del pic a 3,55 ppm és clara, segons augmenta la malignitat del tumor, sobretot a TE curt. A més, l'alçada relativa del pic a TE 136 ms també es modifica amb el grau tumoral (quan s'observa la relació entre aquest pic i el pic de creatina a 3,03 ppm).

En les condicions d'adquisició *in vivo* no hi ha prou resolució per distingir, en la ressonància a 3,55 ppm, m-Ino i gly per separat, però segons els resultats obtinguts amb el quocient RmI,gly/Cr la relació entre aquests dos compostos es pot calcular. Aquesta distinció podria ser útil sobretot al cas de la gradació no invasiva de tumors gials. Vam considerar, doncs, interessant mesurar experimentalment amb dissolucions model el quocient R mI,Gly/Cr que caldria esperar al variar les concentracions relatives de m-Ino i gly *in vivo*.

Una vegada fet això, podríem intentar comprovar si les dades obtingudes d'extractes PCA de biòpsies concordaven o no amb les dades obtingudes *in vivo*.

### **Experiments amb mostres model de concentracions variables de m-Ino i gly**

Es va planificar una corba de calibració mitjançant els càlculs teòrics, descrits a l'annex VI, per decidir els valors experimentals a utilitzar de concentracions de m-Ino i gly per a que els punts estiguessin ben distribuïts per la corba. La idea era comprovar si els punts observats experimentalment coincidien amb els calculats en teoria i per reconstruir la corba adequant-la a les característiques instrumentals de que disposàvem. Això permetia relacionar les concentracions relatives de cadascun d'aquests metabòlits amb la modulació i pèrdua de senyal observada a TE llarg.

Els càlculs teòrics per a la variació esperada del patró espectral amb la concentració de m-Ino, gly i Cr estan basats en valors de  $T_1$  i  $T_2$  obtinguts de la literatura i experimentals del grup, així com en les característiques de temps d'eco de la seqüència d'adquisició utilitzada al centre on s'han obtingut els espectres de les mostres model (annex VI). Per avaluar la disminució real de la ressonància per modulació, és necessari relacionar-la amb alguna altra ressonància generalment present en tumors i que no presenti modulació. S'ha triat la creatina, que és un singlet que no presenta modulació amb el TE.

La taula 4.15 recull el rang de valors de  $T_1$  i  $T_2$  observats a les diferents referències bibliogràfiques. Per la glicina no constaven dades a la literatura; s'ha procedit a relacionar els valors citats *in vivo* amb els valors obtinguts a l'extracte per a m-Ino i Cr, traient-ne una relació entre ells. Posteriorment, s'ha mesurat el valor de  $T_1$  i  $T_2$  de glicina a un extracte i s'ha aplicat la mateixa relació obtinguda amb m-Ino i Cr per obtenir una aproximació del  $T_2$  *in vivo*. Amb aquestes càlculs teòrics, i posterior realització de la corba experimental, s'ha arribat a la corba que s'ensenya a la figura 4.18, una corba ja adequada a aquests paràmetres d'adquisició, ja que la teoria no contempla factors instrumentals observats als espectròmetres. S'ha considerat que aquesta corba, tot i ser elaborada amb una seqüència concreta (PRESS 30 i 136 ms) era més correcta i adaptada a la realitat que una corba calculada per aproximacions teòriques.

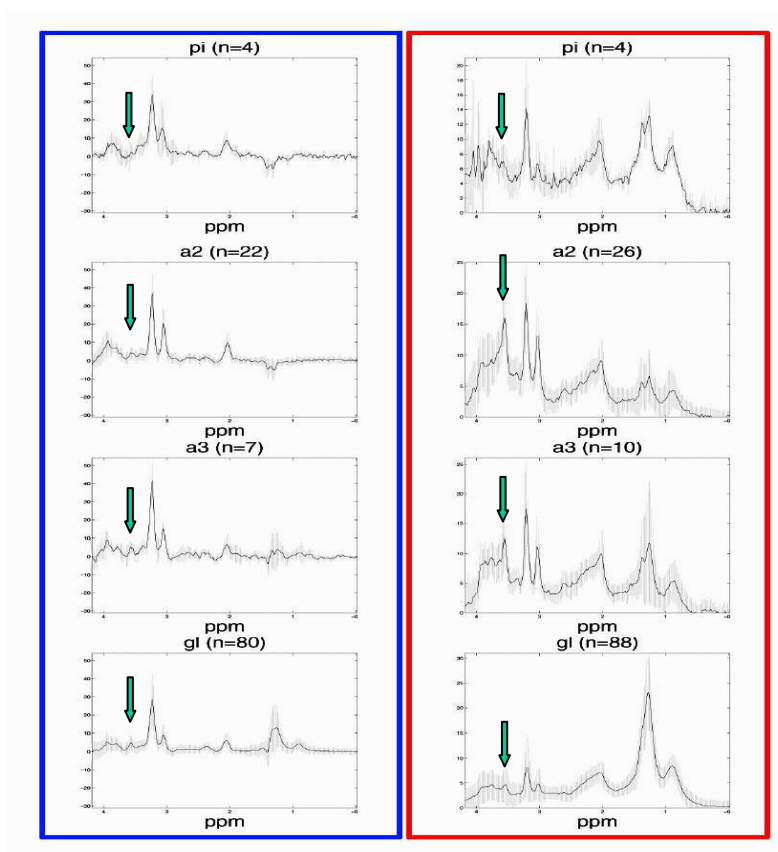


Figura 4.17: Espectres promig  $\pm$  SD a TE llarg (135 ms, esquerra) i TE curt (20-32 ms, dreta) de tumors astrocítics de diversa malignitat de la base de dades INTERPRET. La fletxa senyala el pic a 3,55 ppm. (pi = astrocitoma pilocític, a2= astrocitoma de grau II; a3= astrocitoma de grau III; i gl = glioblastoma).

Els valors obtinguts experimentalment amb les mostres model i els valors calculats (annex VI) tenint en compte valors de  $T_1$  i  $T_2$  es mostren a la taula 4.16.

La dissolució model amb la concentració més baixa de m-Ino ha estat fet amb una adquisició més llarga degut a la modulació i atenuació del senyal observada a TE llarg.

L'ajust de la corba als punts experimentals s'ha considerat un bon ajust amb coeficients d'error inferiors als 20%. Els punts experimentals (figura 4.18) es corresponen bastant bé als punts teòrics al principi, presentant una tendència a distanciar-se dels punts calculats cap al final de la corba (veure taula 4.17 per als valors). Això es podria deure a una incorrecció de càlcul del factor 'visibilitat' del m-Ino a diferents temps d'eco, que s'havia estimat a partir d'espectres de mostres model adquirits a un altre centre i amb altre seqüència. Els espectres per modelar la corba tenien molt bona relació senyal-soroll com es veu a la figura 4.19.

	In vivo*		Extractes PCA <sup>#</sup>	
	T <sub>2</sub> (ms)	T <sub>1</sub> (s)	T <sub>2</sub> (ms)	T <sub>1</sub> (s)
M-Ino	130-162	1,14-1,28	1147	2,44
Cr	217-220	1,42-1,63	2420	2,09
Gly	nq	nq	2141	2,98

Taula 4.15: Valors de T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub> de la literatura per m-Ino, Cr i gly *in vivo*, i valors experimentals del grup per a T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub> en extractes PCA. Nq=no quantificat \*Referències : Kreis, 1997, Frahm i col, 1989, Brief i col, 2003 (1,5 T). #: Dades experimentals del GABRMN (9,4 T).

El principal objectiu de comptar amb una corba adquirida en condicions comparables als espectres *in vivo* és el d'ajustar els punts d'aquesta corba a una funció i que això permeti calcular les concentracions relatives de m-Ino i gly que estan contribuint al pic de 3,55 ppm a un cas nou *in vivo* (a més de comparar, com s'ha dit abans, amb les dades d'extractes de biòpsies *in vitro*). S'han ajustat els punts a una funció sigmoïdal (equació 4.5) que descriu el valor del quocient 3,55/3,03 als dos TE en funció del quocient [m-Ino]/[Gly]. Els valors obtinguts experimentalment i els calculats amb la funció es mostren a la taula 4.17:

[m-Ino]/[Gly]	Quocient 3,55/3,03 teòric	Quocient 3,55/3,03 experimental
0	1,07	1,06
0,15	1,31	1,32
0,25	1,45	1,63
0,5	1,76	1,68
1	2,24	1,93
2	2,88	2,88
5	3,77	3,42
7	4,05	4,07
10	4,29	4,21
50	4,89	4,95

Taula 4.16: Valors teòrics (càlcul, annex VI) i experimentals (dissolució model) obtinguts amb el quocient R mI,Gly/Cr.

$$y = \frac{a}{1 + \exp\left(\frac{-(x - x_0)}{b}\right)} \quad \text{eq. 4.5}$$



[m-Ino]/[Gly]	Quocient 3,55/3,03 als dos TE	Quocient obtingut a partir del càlcul amb la equació
0	1,06	1,45
0,15	1,32	1,50
0,25	1,63	1,53
0,5	1,68	1,63
1	1,93	1,82
2	2,88	2,22
5	3,42	3,44
7	4,07	4,08
10	4,21	4,64
50	4,95	5,05

Taula 4.17: Valors obtinguts experimentalment per al quocient 3,55/3,03 quocient obtingut a partir del càlcul amb la funció sigmoïdal ajustada.

S'ha intentat, a partir dels quocients ja calculats RmI,gly/Cr, i amb l'ajust de la funció sigmoïdal, obtenir els quocients [m-Ino]/[Gly] dels diferents tumors astrocítics emmagatzemats a la base de dades. Els resultats calculats són els que es mostren a la taula 4.18.

Com es pot comprovar, el quocient RmI,gly/Cr pot ser força útil a la hora de la gradació dels tumors astrocítics, i les diferències entre aquests tipus tumorals són estadísticament significatives en molts dels casos. Tate i col (2003), també han observat aquesta disminució. Per aquesta raó, es va decidir intentar utilitzar el quocient RmI,gly/Cr espectrals com un classificador més per la classificació automàtica de tumors, punt comentat a l'apartat 4.3.1.4.

Tipus tumoral	[m-Ino]/[Gly] <sup>10</sup>
A2 (n=22)	10,55±1,85*
A3 (n=11)	6,88±2,68
GB (n=83)	2,35±0,51**
OD (n=11)	13,09±3,26&

Taula 4.18: Valors calculats del quocient [m-Ino]/[Gly] (mitja ± SEM) a partir de la funció sigmoïdal ajustada (eq. 4.5).

#### 4.3.1.2 ESTUDIS *IN VITRO*

##### Inositol

Els valors obtinguts per al m-Ino i s-Ino als diferents tipus tumorals estan representats a la figura 4.20. Comparacions del valor normal amb els valors de m-Ino obtinguts per tumors no han assolit diferències estadísticament significatives, així com les comparacions basades en s-Ino. El valor de s-Ino s'ha mostrat bastant elevat als tumors neuroectodèrmics, però tot i així, degut a la gran dispersió, només ha presentat tendència a la significació en les comparacions bilaterals d'aquest tumor *versus* astrocitoma grau III ( $p=0,052$ ) i glioblastoma ( $p=0,07$ ).

<sup>10</sup> Quan el valor del quocient sobrepassava el màxim alcançat per la equació, s'atribuïa el valor més petit de [m-Ino/gly] on l'equació alcançava el màxim de quocient i es quedava constant (en aquest cas, 24,3). \*  $p<0,001$  comparat a GB; \*\*  $p<0,001$  comparat a A2 i OD; &  $p<0,001$  comparat a GB.

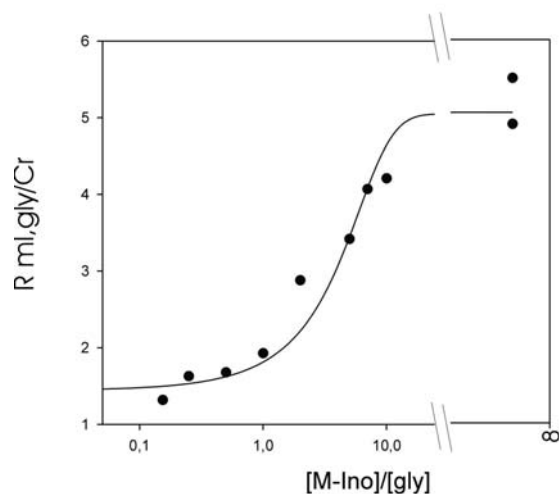


Figura 4.18: Valor del quocient 3,55/3,03 als dos TE per les dissolucions model de concentració variable de m-Ino i gly<sup>11</sup>. L'eix de les abscisses es presenta en escala logarítmica per apreciar de millor manera les variacions entre punts.

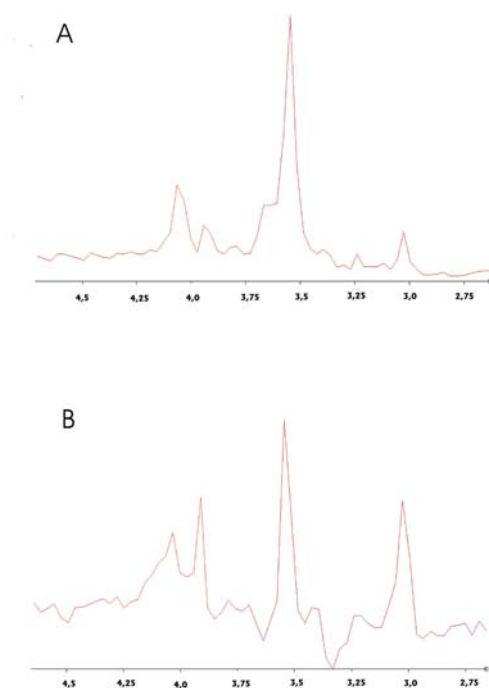


Figura 4.19: Exemples d'espectres de les dissolucions model per a la corba de m-Inositol i glicina ( $[m\text{-Ino}]/[gly]=10$ ). A) temps d'eco curt (30ms) i B) temps d'eco llarg (136ms). La relació senyal/soroll al TE curt era de 134,69 per m-Ino, gly i 30,3 per creatina. A TE llarg, era de 61,17 per m-Ino, gly i 39,41 per creatina.

<sup>11</sup> A efectes de representació gràfica i d'ajust dels punts a una funció, la dissolució model de valor  $[m\text{-Ino}]/[Gly]=\infty$  ha estat substituït pel valor 500.000 a l'eix de les abscisses, ja que una divisió per zero és impossible i l'equació obtinguda no variava encara que el valor a a fos molt superior.

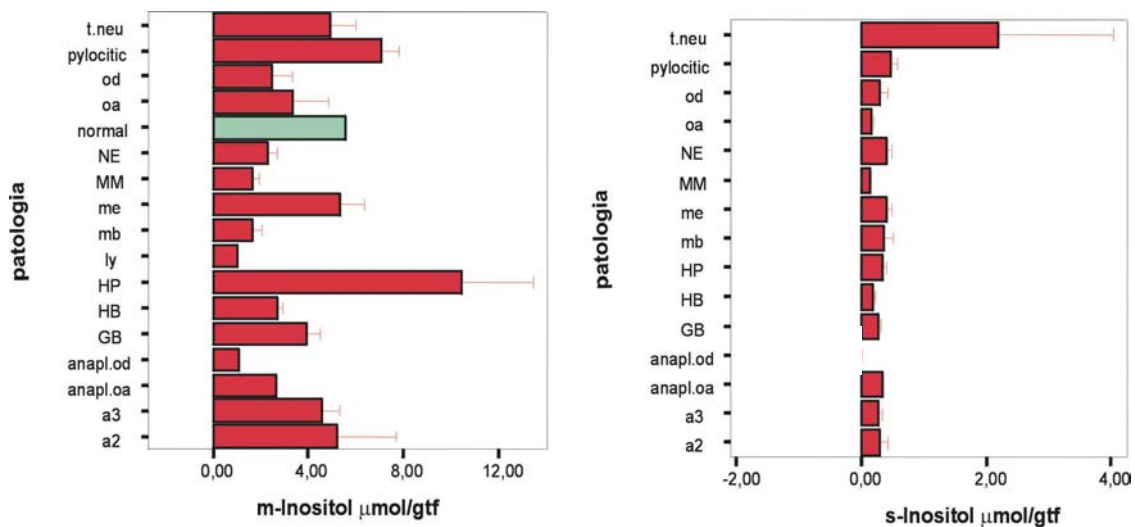


Figura 4.20: Promig  $\pm$  SEM dels valors de m-Ino i s-Ino per als diferents tipus tumorals<sup>12</sup>. Abreviatures: pylocitic= astrocitoma pilocític; od= oligodendroglioma; oa= oligoastrocitoma; NE= neurinoma; MM= meningioma; me= metàstasis; mb= medul·loblastoma; GB= glioblastoma; anapl.od= oligodendroglioma anaplàstic; anapl.oa= oligoastrocitoma anaplàstic; a3= astrocitoma de grau III i a2= astrocitoma de grau II. Tots els valors 'normals', quan disponibles, surten representats en verd i són de les mateixes referències esmenades a la taula 4.13

El inositol és considerat un marcador astrocític (Danielsen i Ross, 1999; Castillo i col, 2000.). La funció del m-Ino no és clara, però es creu que és un requeriment especial pel creixement cel·lular (Ross, 1991) i un osmolit, a més d'estar relacionat amb el cicle de síntesi i degradació dels missatgers secundaris derivats de fosfatidil inositol (Danielsen i Ross, 1999).

Entre els isòmers d'inositol, bàsicament s'observen m-Ino i s-Ino, amb clara predominància de m-Ino que es veu *in vivo* a 3,55-3,57 ppm superposat al senyal de glicina. Als espectres *in vitro* realitzats a alt camp es distingeix perfectament de la glicina, presentant senyals a 3,28, 3,53-3,55, 3,63 i 4,06 ppm (taula 4.14). El s-Ino es presenta com a singlet a 3,35ppm. Michaelis i col (1993) han estudiat el senyal de m-Ino observat *in vivo*. Segons aquests autors, el quocient esperat per [m-Ino]/[s-Ino] en cervell normal *in vivo* és de 12-13, valor inferior a l'observat *in vitro* (18-20). El quocient m-Ino/S-Ino observada als tumors astrocítics estudiats en aquest treball es recull a la taula 4.19.

<sup>12</sup> No s'han trobat valors de quantificació de s-ino als extractes PCA de cervell normal, així que el valor 'normal' no surt representat.

	Quocient m-Ino/S-Ino
Normal	18-20
Astrocitoma grau II	20,86±4,70
Astrocitoma grau III	17,78±2,85
Glioblastoma	24,68±3,36

Taula 4.19: Quocients m-Ino/S-Ino (mitja +/- SEM) obtingudes amb els valors calculats a l'extracte PCA dels tumors astrocítics. No hi ha diferències estadísticament significatives entre els tipus tumorals. El valor normal és el valor *in vivo* citat per Michaelis i col, 1993

Les comparacions bilaterals entre els diferents tumors astrocítics per aquest quocient no han resultat, però, estadísticament significatives.

### **Glicina**

Els valors mesurats per la glicina en extractes de les biòpsies de tumors estan il·lustrats a la figura 4.21 i taula 4.13. La comparació de les concentracions de glicina entre cervell normal i altres tipus de tumors no ha resultat estadísticament significativa en cap cas, possiblement perquè la dispersió de valors és bastant gran. La comparació bilateral entre els diferents graus de tumor astrocític, donada la importància que li atribueixen en la discriminació d'aquests tumors, ha resultat estadísticament significativa només per astrocitoma grau III *versus* glioblastoma ( $p=0,019$ ). Una comparació entre tumors molt proliferatius i poc proliferatius, com s'ha fet per als metabòlits de colina (veure secció 4.3.4.4 i taula 4.24), tampoc ha resultat estadísticament significativa.

La glicina és un aminoàcid que té funcions com a neurotransmissor inhibitori al sistema nerviós (Alberts i col, 1989). A més de la funció de neurotransmissor, també actua com a antioxidant i pot actuar com precursora de creatina (Govindaraju i col, 2000). La presència d'un sistema de recaptació de glicina als astròcits (però no en neurones) indica que aquestes cèl·lules són les responsables per treure del medi l'excés de glicina, i que la substitució dels astròcits normals per cèl·lules tumorals podria contribuir a les alteracions del sistema de degradació (Carpinelli i col, 1996). Hi ha diverses patologies que estan relacionades amb una alteració de la glicina com astrocitoma d'alt grau, leucoencefalopaties, gliosi, hamartoma, entre altres (Sener, 2003). La glicina s'ha suggerit també com a discriminatòria entre GB i metàstasis (Kinoshita i col, 1994).

Carpinelli i col (1996) proposen l'ús del quocient  $[gly]/(cr+Pcr)$  com a discriminant entre glioblastomes i astrocitoma de grau II + grau III. Els valors trobats per Carpinelli i col. per aquest quocient han estat de  $1,8 \pm 1,0$  per GB (n=15 pacients) i  $0,49 \pm 0,36$  per A2+A3 (n=12 pacients). Els valors trobats en aquest treball observen una tendència similar, tot i que les diferències no són tan remarcades ni assoleixen la significació estadística. Els valors trobats per al quocient  $[gly]/(cr+Pcr)$  van ser  $1,31 \pm 1,26$  per GB (n=59 pacients) i  $1,00 \pm 0,95$  per A2+A3 (n=15 pacients). Possiblement hi hagi, però, una bimodalitat en la concentració de glicina pel que fa als glioblastomes.

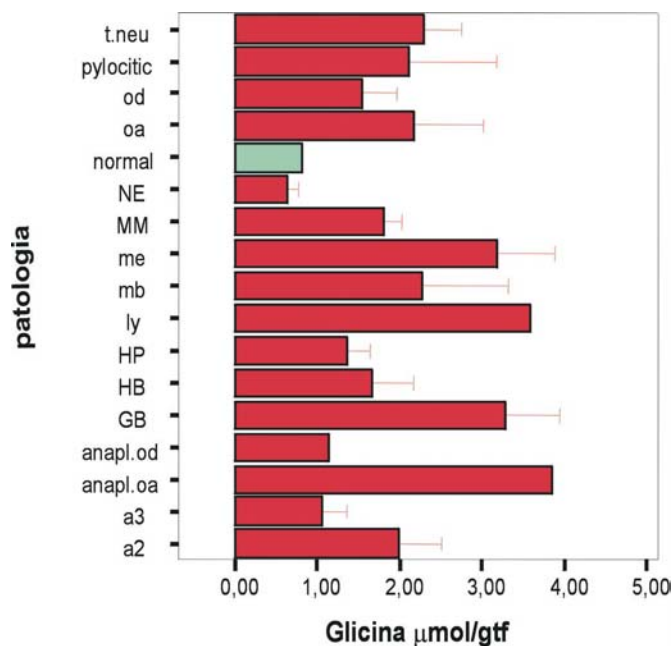


Figura 4.21: Promig  $\pm$  SEM dels valors de glicina per als diferents tipus tumorals. Significat dels acrònims com a la figura 4.20.

Griffiths i col (2002) formulen una altra possible hipòtesi per a explicar l'augment de glicina als tumors malignes i amb gran capacitat de divisió: la glicina és un precursor per la síntesi de purines *de novo*, necessàries quan hi ha una elevació en la producció de DNA i també per la formació d'ATP a la cèl·lula. Els tumors amb menys potencial agressiu no tenen elevacions tan remarcades de gly, però poden formar-la a partir dels metabòlits de colina, causant un descens d'aquests. Finalment, estudis sobre la mort necròtica o apoptòtica en hepatòcits (Kim i col, 2003) suggereixen que concentracions elevades de glicina podrien tenir un efecte protector sobre la mort cel·lular necròtica.

### 4.3.1.3 CORRELACIONS *IN VIVO-IN VITRO* I PREGUNTES PLANTEJADES AMB L'ESTUDI D'EXTRACTES PCA

#### 4.3.1.3.1 Gradació de tumors astrocítics

##### El m-Ino és important en la gradació de tumors astrocítics?

Els valors de m-Ino *per se* no són estadísticament significatius en la comparació bilateral entre tumors astrocítics de diferents graus, i tampoc ho són després de normalitzats per proteïna. *In vivo*, la utilitat de la ressonància conjunta de m-Ino i gly ja havia estat observada per molts autors, i ha quedat comprovada amb els casos *in vivo* de la base de dades INTERPRET com ensenya la figura 4.16. Una representació del prototip científic amb els casos de tumors astrocítics usant com a referència els senyals a 3,57 i 3,03 ppm s'ensenya a la figura 4.31. Es nota una distribució dels tumors al llarg de l'eix X de la representació (3,57 ppm), amb una disminució del grau al disminuir l'alçada relativa, sent menys clar el posicionament dels astrocitomes de grau III que no formen un grup ben definit.

Ja s'ha comentat abans que, *in vivo*, hi ha superposició dels pics de m-Ino i gly a 3,55 ppm. Per simular *in vitro* els estudis realitzats amb els espectres *in vivo* i per calcular un valor equivalent al quocient  $R_{mI, gly/Cr}$  mesurat *in vivo*, s'han realitzat alguns càlculs, (amb les concentracions calculades dels compostos i tenint present el factor de visibilitat estimat pel m-Ino), els resultats dels quals es mostren a la figura 4.23. Els estudis *in vitro* presenten una tendència semblant pel que fa a astrocitomes de grau III i glioblastomes, no així amb els astrocitomes de grau II que presenten un quocient inferior als de grau III.

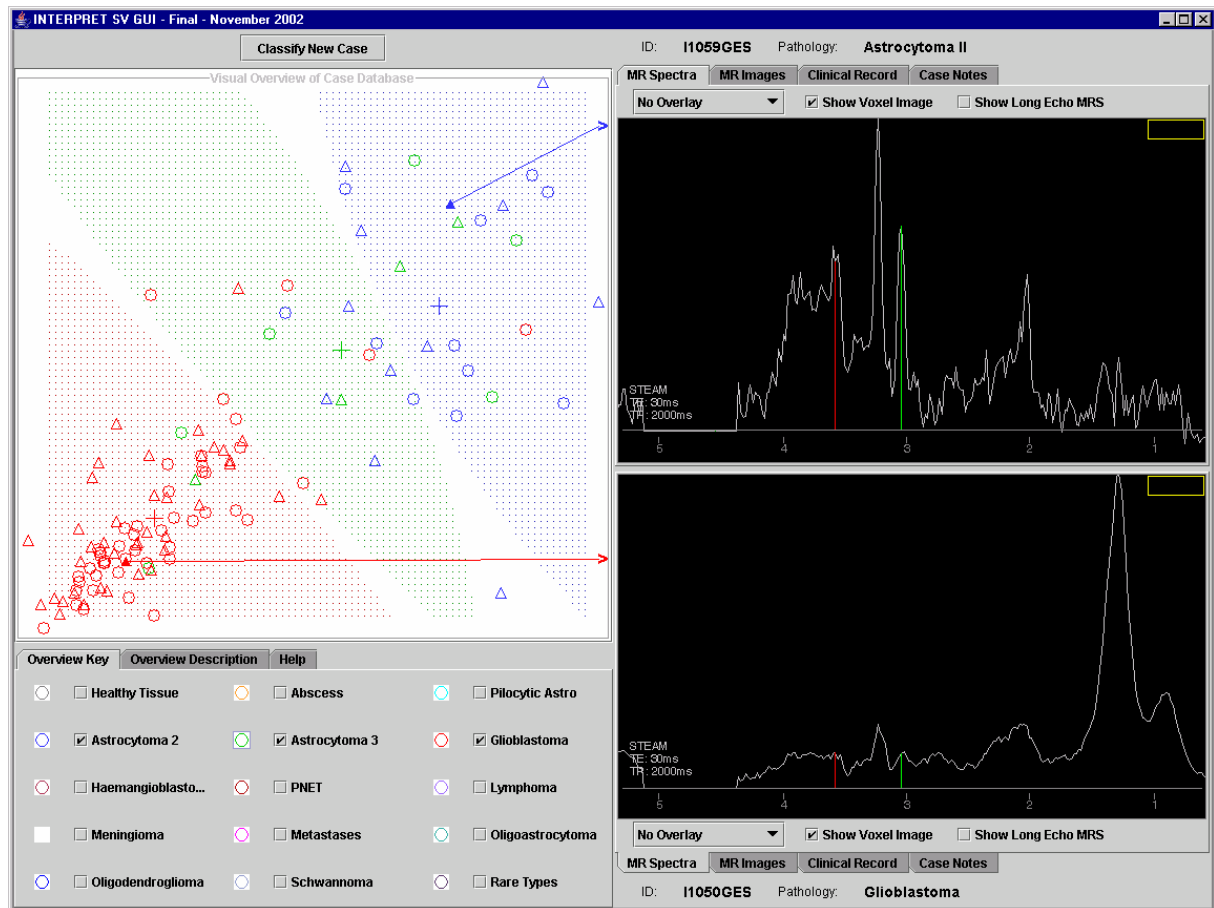


Figura 4.22: Pantalla del prototip científic INTERPRET. Es representen els tumors astrocítics. Glioblastomes: punts vermells; astrocitomes grau III: punts verds; astrocitomes grau II: punts blaus. Les abscisses representen l'alçada de la ressonància a 3,57 ppm (m-Ino, gly) i les ordenades, l'alçada de la ressonància a 3,03 (creatina)

A part d'utilitzar les dades *in vitro* per intentar entendre els canvis al patró *in vivo*, també hem volgut comparar aïlladament els valors obtinguts en  $\mu\text{mol/gtf}$  per m-Ino i gly amb valors de la literatura (figura 4.24). Pel que fa al m-Ino, Peeling i Sutherland (1992) observen, com en aquest treball, un descens de la concentració de m-Ino amb l'augment del grau tumoral; Kinoshita i col (1994) observen una tendència contrària, el que es contraposa al fet reportat per molts autors a l'anàlisi *in vitro* (p.ex. Roda i col, 2000). En relació a la glicina, hi ha coincidència entre els resultats d'aquest treball i de la literatura, observant-se un augment de concentració de la glicina amb el grau tumoral (figura 4.24). La diferent  $n$  de tumors astrocítics (A2, A3 i GB) usada en els treballs citats també pot influenciar en bona mesura la representació que aquestes mostres poden significar davant de la població total (aquesta Tesi  $n=74$ ; Peeling i Sutherland, 1992  $n=19$ ; Kinoshita i col, 1994  $n=22$ ). També caldria



considerar la possibilitat d'una presència elevada de glioblastomes de tipus secundari entre els pacients estudiats per Kinoshita i col (1994) (veure secció 4.3.1.3.2).

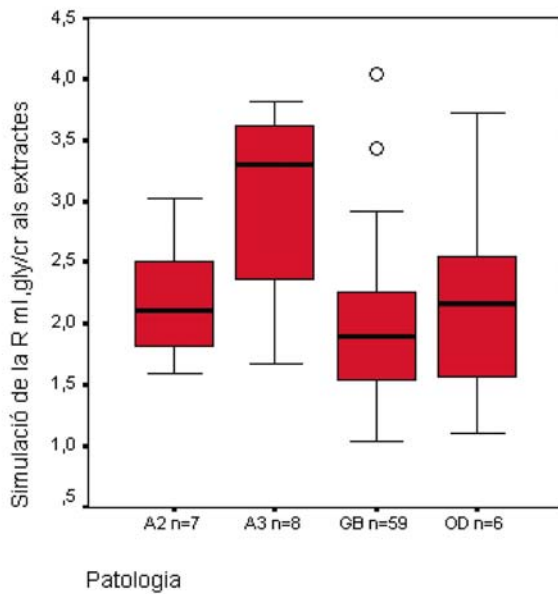


Figura 4.23: *Boxplot* de valors *in vitro* que simulen el quocient 3,55/3,03 als dos TE que s’esperaria pels tumors astrocítics<sup>13</sup>. Detalls de la representació dels *boxplots* a la figura 4.9

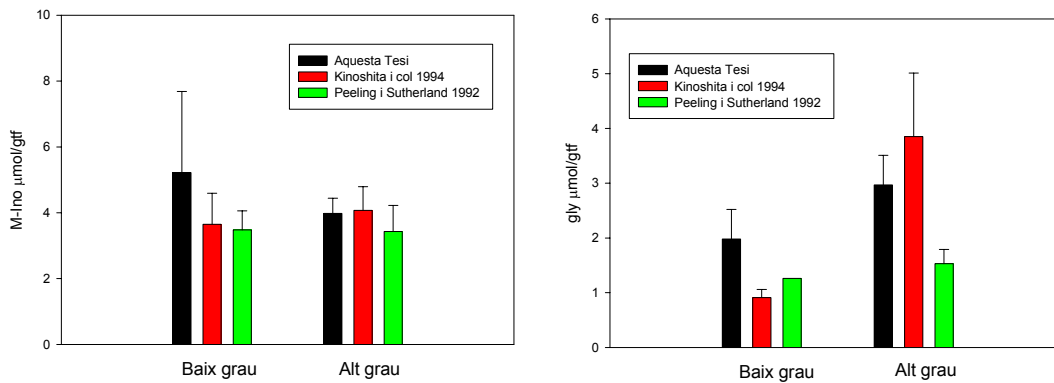


Figura 4.24: Comparació dels valors obtinguts per a m-Ino (esquerra) i gly (dreta) amb valors de la literatura (mitja +/- SEM, excepte en casos on hi hagi només un valor). Baix grau = astrocitoma grau II; Alt grau = astrocitoma grau III + glioblastoma. Els astrocitomes d’alt grau han estat agrupats a efectes de comparació, ja que els citats autors els estudien agrupats

Quan es comparen les figures 4.16 i 4.23 queda clar que els astrocitomes II tenen, aparentment, més m-Ino (o menys glicina) *in vivo* que *in vitro*. Cal considerar diverses possibles explicacions per a aquesta discrepància.

<sup>13</sup> Per una correcta simulació de la ratio 3,55/3,03 s’han considerat els següents càlculs: TE curt=(gly+mIno)/cr. TE llarg= [gly+(m-Ino/5)]/cr. R.mI.gly/Cr= TE curt/TE llarg

- Les biòpsies analitzades *in vitro* no són característiques del patró metabòlic dels tipus de tumors considerats *in vivo*.
- La curta isquèmia prèvia a l'extracció PCA de les biòpsies altera les concentracions relatives de m-Ino i/o gly.
- La visibilitat de m-Ino, gly o Cr (la referència de quantificació pels quocients) no és la mateixa *in vitro* que *in vivo* (p.ex. per raons de T<sub>2</sub>)
- Per donar resposta a quines d'aquestes possibles raons són correctes, caldrien possiblement experiments addicionals.

Així, per exemple, dades prèvies del nostre grup (no publicades, Valverde D, 2004) amb extractes PCA de cèl·lules C6 de glioma de rata donen una perspectiva addicional a aquests resultats, en la mesura que podrien modelar diferents estadis proliferatius dels tumors astrocítics. Així, tenim proliferació activa corresponent a la fase exponencial de la corba de creixement de les cèl·lules, i que es podria considerar equivalent a un tumor altament proliferatiu com el glioblastoma. La fase confluent de la corba de proliferació cel·lular la podríem considerar semblant a un astrocitoma de grau III; mentre la fase post-confluent, d'aturada de la proliferació podria mimetitzar l'astrocitoma de grau II, poc proliferatiu. Extractes PCA de cèl·lules en diferent fase de creixement han donat resultats que, amb les suposicions anteriors, mimetitzarien els resultats calculats per tumors humans *in vivo* ja que el quocient  $R_{mI, gly/Cr}$  (veure fig. 4.25) dona més elevat a les cèl·lules C6 postconfluents (3,36), mentre que a confluència té un valor de 2,31 i la fase *log* té el valor més baix (2,24), semblant al cas dels glioblastomes *in vivo*. El fet que les figures 4.23 i 4.25 no siguin comparables pel cas dels astrocitomes de baix grau suggereix que els canvis en la taxa de proliferació a les C6 no són un bon model pel cas d'aquests tumors de baix grau, però potser sí pel cas de glioblastomes secundaris.

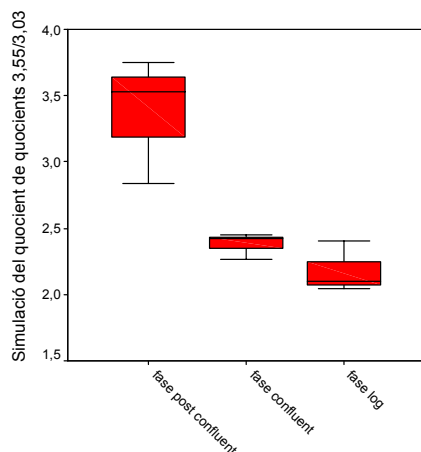


Figura 4.25: *Boxplot* de valors que simulen el quocient  $R_{mI, gly/Cr}$  que s'obtidria *in vivo* en les cèl·lules C6 a partir de valors *in vitro* ( $n=3$  per a cada fase de la corba de proliferació)<sup>14</sup>. La correspondència entre la fase de creixement i el grau astrocític és: fase post confluent, astrocitoma grau II; fase confluent, astrocitoma grau III; fase *log*, glioblastoma. Detalls de la representació dels boxplots a la figura 4.9

#### 4.3.1.3.2 Glioblastomes primaris i secundaris

##### Hi ha un comportament bimodal pel que fa a concentració de m-I<sub>no</sub> i gly a glioblastomes ?

Els glioblastomes són un tipus de tumor altament agressiu, amb un pronòstic en general bastant dolent, i amb una gran incidència (pràcticament la meitat dels gliomes són glioblastomes). Actualment s'estan cercant factors pronòstics que puguin donar alguna indicació respecte al temps de supervivència, ja siguin factors genètics (Newcomb i col, 1998), espectroscòpics (Li i col, 2004) o altres. L'espectre més característic d'un glioblastoma és el típicament necròtic, amb predominància dels senyals de lípids i molt poc senyal provinent dels altres metabòlits. S'ha observat, però, que hi havia un petit percentatge de glioblastomes que no corresponien a aquest patró, tenint pics més prominents de tots els metabòlits i també la ressonància a 3,55 ppm més elevada. Aquest espectres són els mateixos que ocupen el quadrant dret inferior de la figura 4.37 secció 4.3.1.3.6.

A partir d'aquesta observació, s'han començat a buscar subgrups de glioblastomes i investigar el possible significat d'aquests subgrups. Utilitzant novament el prototip científic INTERPRET s'ha investigat, amb l'ús de l'alçada de la ressonància a 3,57 ppm, la distribució que tindrien els glioblastomes en relació al senyal de 3,03 ppm. El que es veu és un gran

nombre de casos agrupats per a valors més baixos de l'alçada a 3,57 ppm i alguns casos que es desmarquen del grup (figura 4.26).

Hem estudiat els valors *in vivo* i *in vitro* de diferents maneres per intentar identificar i quantificar aquests subgrups. La figura 4.27 B ensenya la distribució de freqüències per als valors calculats (a partir de la equació sigmoïdal) del quocient m-Ino/gly (veure secció 4.3.1.1) als glioblastomes *in vivo* i també els valors tabulats a partir de les concentracions trobades als espectres *in vitro* (figura 4.27 A).

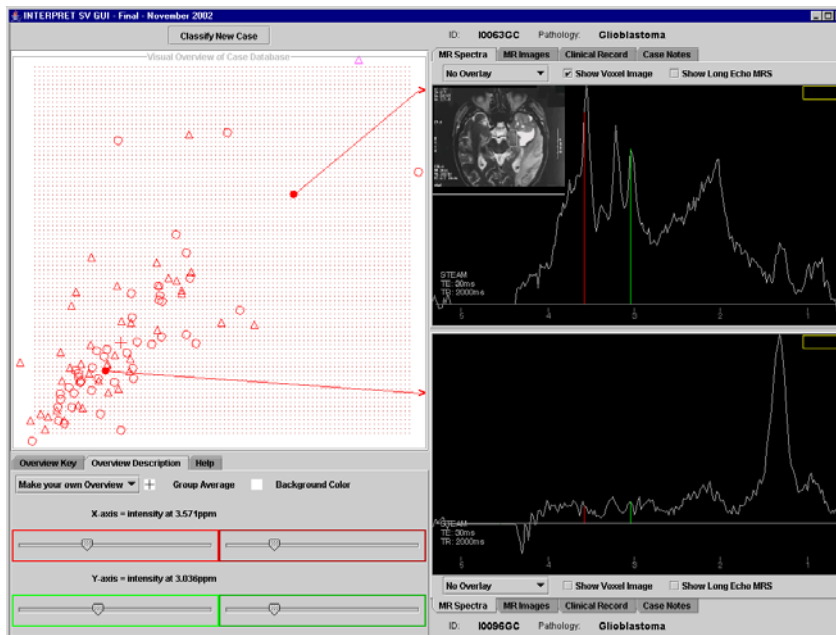


Figura 4.26: Pantalla del prototip científic INTERPRET representant només els glioblastomes. Abscissa: alçada a 3,57 ppm. Ordenada: alçada a 3,03 ppm. A dalt i a baix, es representen diferents espectres que poden presentar els glioblastomes

La distribució de les freqüències no segueix la campana de Gauss de la distribució normal; hi ha molts valors concentrats propers a zero. Aquests valors podrien ser resultat de la mesura en espectres amb una baixa relació senyal/soroll i que no permetés l'estimació correcta de les alçades. Això resultaria en un quocient  $R_{mI, gly}/Cr$  artèfactualment proper a 1 o valors més petits, i per tant un quocient  $[m\text{-Ino}]/[gly]$  proper a zero. És interessant remarcar que, encara que es tractin de casos diferents *in vivo* i *in vitro*, hi ha una coincidència d'un gran percentatge de valors d'aquest quocient entre 0 i 4, el que significa que hi ha una considerable correspondència entre els valors observats *in vivo* i *in vitro*. Hi ha valors que estan clarament

<sup>14</sup> Càlcul simulat de la mateixa manera que amb les mostres *in vitro*

fora d'aquest rang però no s'arriba a la bimodalitat ja que no hi ha dues modes clarament visualitzades. El que s'hauria de considerar és que si la freqüència d'aquest subgrup de glioblastomes amb més m-Ino/Gly és baixa, aleshores podríem estar davant del començament d'una bimodalitat.

Quant als valors de metabòlits mesurats *in vitro* (figura 4.27 A), s'ha observat també la distribució de freqüències pels valors de [m-Ino]/[gly]. Aquí també hi ha nombrosos casos que s'agrupen al voltant del valor 2,0, el que concordaria en bona mesura amb els casos observats *in vivo*. Dissortadament no es pot associar el subgrup observat *in vitro* amb el subgrup observat *in vivo*, perquè la majoria dels casos no coincideixen. S'ha establert un llindar hipotètic per valors més elevats del quocient de concentracions [m-Ino]/[gly]. Com es pot veure per la figura, ha estat temptativament posat al valor 4. El percentatge de casos que sobrepassen aquest valor és d'un 12% als casos *in vivo* i d'un 5% als casos *in vitro*.

Si observem la figura 4.37, es pot veure que el quadrant inferior dret està plenament ocupat per glioblastomes que tenen el quocient 3,55/3,03 més elevat. Aquest subgrup es podria correspondre amb el subgrup de quocient [m-Ino]/[gly] elevat. En aquesta figura, el percentatge de glioblastomes que se separen de la resta és de 22%.

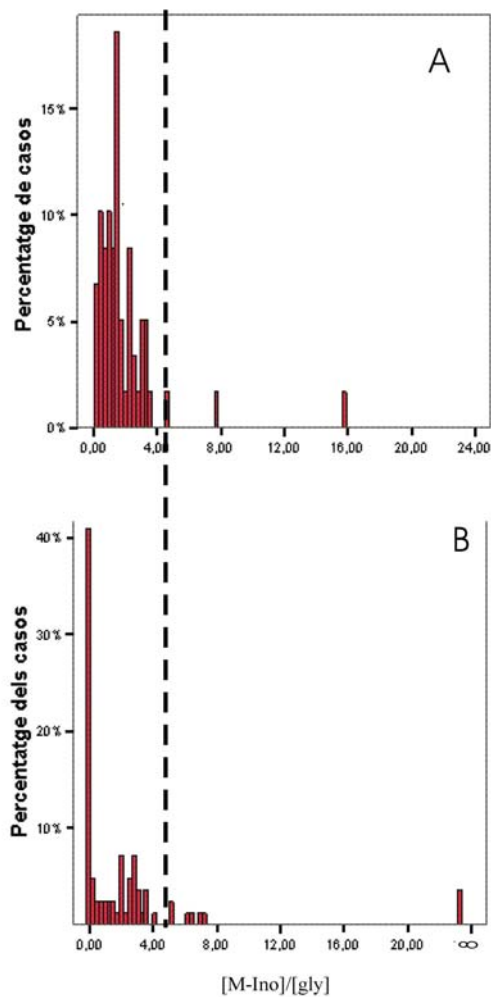


Figura 4.27: Histograma de la distribució de freqüències per als valors del  $[m\text{-Ino}]/[gly]$ , A) per als valors calculats *in vitro* i B) del quocient  $[m\text{-Ino}]/[gly]$  calculat a partir de l'equació sigmoïdal, del quocient  $R_{m, gly}/Cr$  als glioblastomes *in vivo*. El llindar hipotètic se situa al voltant del valor 4. El valor infinit és l'atribuït als casos que tenen un quocient que no s'explica per la equació, ja que aquesta arriba a un valor màxim de 5,02 quan  $[m\text{-Ino}]/[gly]$  tendeix a  $\infty$ .

Les distribucions, segons el test de normalitat K-S, no són normals. Els valors obtinguts van ser menors de 0,05 tant per als valors *in vivo* com per als valors *in vitro*. Però com ja s'ha dit, no és encara suficient per delinear dues modes.

S'han estudiat, també, les distribucions dels valors individuals de les concentracions de m-Ino i gly als extractes per comprovar-ne la normalitat. Novament s'han obtingut distribucions no-normals amb valors més petits de 0,05 per als dos metabolits. Els histogrames s'ensenyen a la figura 4.28.

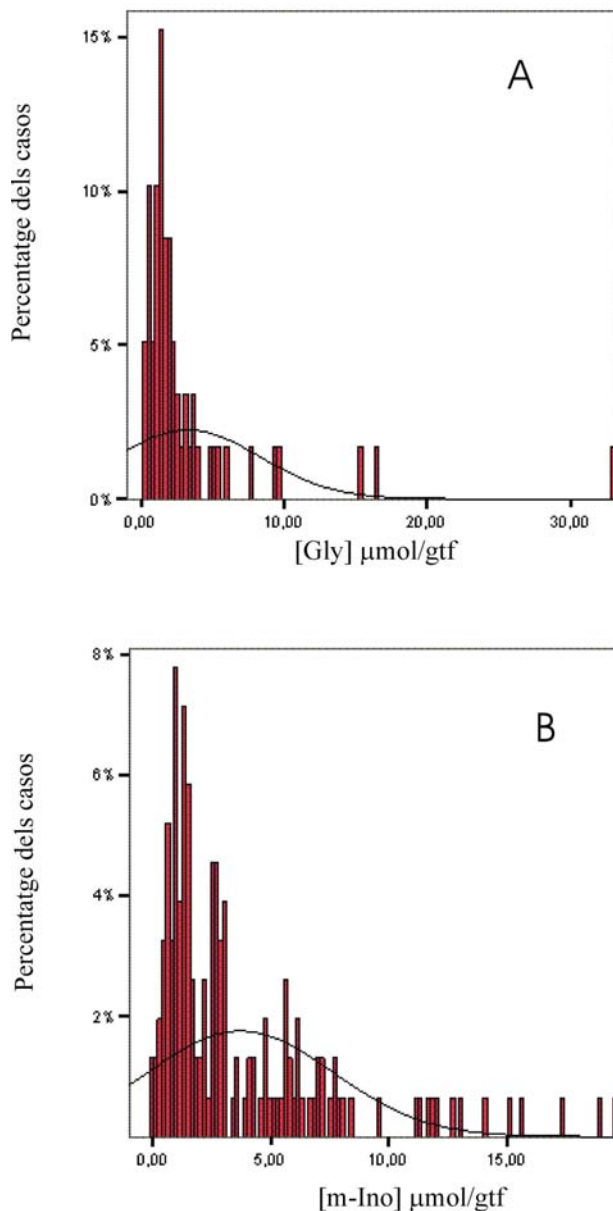


Figura 4.28: Histogrames de distribució dels valors de concentració de glicina (A) i m-Ino (B) als extractes de biòpsies.

La rellevància d'identificar aquest subgrup és intentar correlacionar-lo amb un subtipus de glioblastoma: com ja s'ha esmentat a la introducció, existeixen dos tipus de glioblastomes: els que evolucionen a partir d'un astrocitoma de grau més baix (glioblastomes secundaris) i els que es presenten sense història prèvia de tumor astrocític (glioblastomes primaris). Aquestes entitats clíniques estan ben definides, sobretot pel que fa a la genètica dels grups (Kleihues i Ohgaki, 1999). Actualment s'està estudiant per HR-MAS la composició de biòpsies dels diferents subgrups (Martínez-Bisbal, 2003, figura 4.29). La heterogeneïtat que

aquestes poden presentar pot variar però segons la porció tumoral que s'analitza (Cheng i col, 2000).

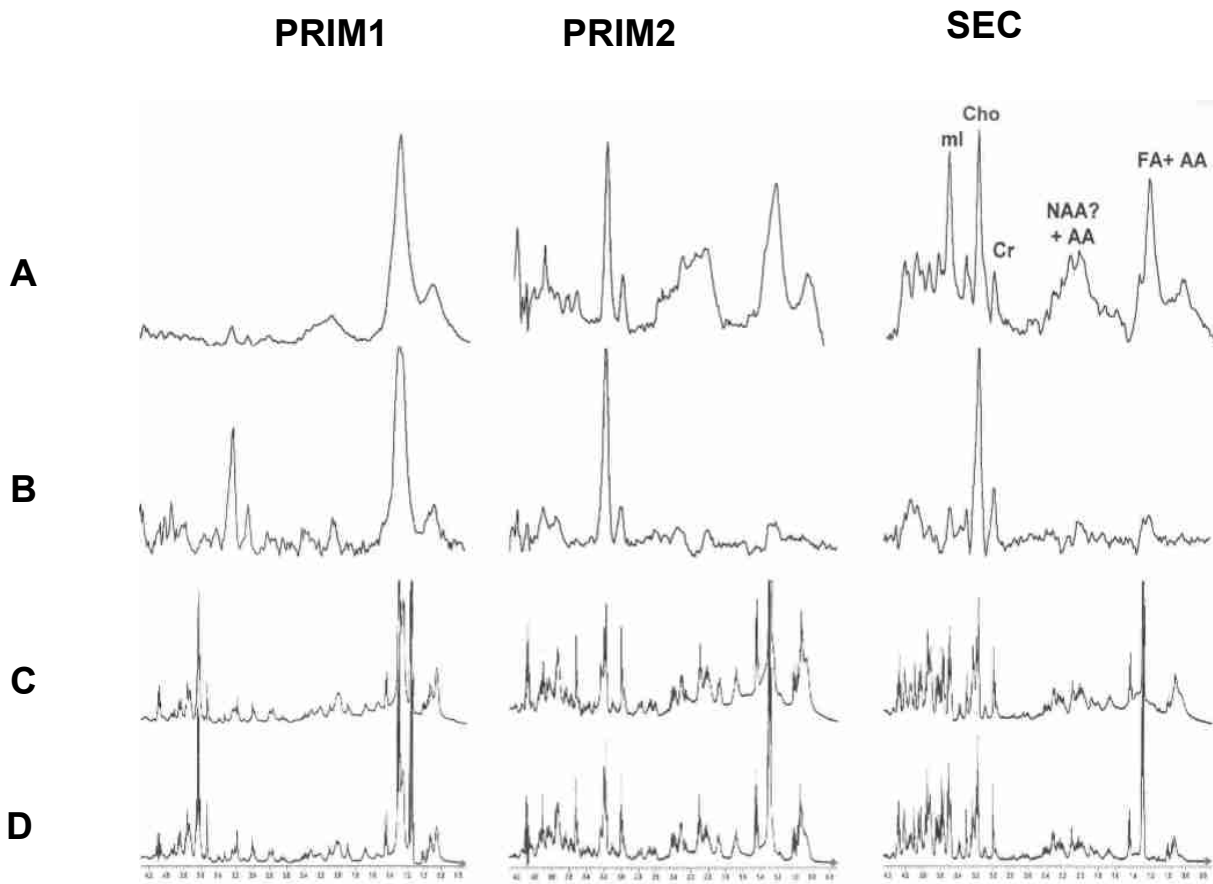


Figura 4.29: ERM *in vivo* A) TE curt (31 ms); B) TE llarg (136 ms); C) *Ex vivo* HR-MAS, pols i adquisició; D) *Ex vivo* HR-MAS CPMG (filtre  $T_2$ ), de dos glioblastomes primaris (PRIM1, PRIM2) i un secundari (SEC). Reproduït de Martínez—Bisbal, 2003. mI= m-Inositol; Cho= colina; Cr= creatina; NAA= N-acetil aspartat; AA= aminoàcids; FA= àcids grassos.

Per tant, entra dins del possible que la sub població de GB amb quocient  $[m\text{-Ino}]/[\text{gly}]$  elevat correspongui a la tipologia de GB secundari segons proposat per Martínez-Bisbal (2003).



#### 4.3.1.3.3 Discriminació entre astrocitomes de grau II i oligodendrogliomes

##### És possible diferenciar entre astrocitomes de grau II i oligodendrogliomes quantificant el m-Ino?

Els *boxplots* obtinguts amb els valors de m-Ino als extractes per oligodendrogliomes i astrocitomes de grau II es mostren a la figura 4.30. Comparacions bilaterals entre aquestes dues patologies per als valors de m-Ino no han presentat diferències estadísticament significatives.

Tant els oligodendrogliomes com els astrocitomes de grau II són tumors d'origen neuroectodèrmic de grau baix; el diagnòstic diferencial entre les dues entitats clíniques pot ser difícil, sobretot si l'oligodendroglioma no presenta calcificacions, cosa que s'observa en pocs casos (Kleihues i Cavenee, 1997c). Segons es pot comprovar amb els valors obtinguts *in vitro* (figura 4.30) i amb el quocient  $R_{mI, gly/Cr}$  (figura 4.16), no s'observa una diferència significativa entre a2 i od pel que fa als valors del quocient, el que indica una mesura indirecta de la concentració relativa de m-Ino. La figura 4.31 mostra una pantalla del prototip científic INTERPRET amb aquests dos tipus tumorals i la separació observada quan s'intenta fer una discriminació basada en la ressonància de m-Ino i Gly. Comparant els valors obtinguts *in vitro* de m-Ino amb altres estudis, s'observa que no sempre hi ha la mateixa tendència; en aquesta tesi s'han trobat els valors promig de 5,22  $\mu\text{mol/gtf}$  per astrocitomes de grau II i 2,48  $\mu\text{mol/gtf}$  per oligodendrogliomes. Contràriament, Peeling i Sutherland (1992) van descriure la tendència inversa, amb valors de 3,48 i 4,92  $\mu\text{mol/gtf}$  per astrocitomes II i oligodendrogliomes, respectivament. És important remarcar que la 'n' per oligodendrogliomes l'estudi de Peeling i Sutherland era de 1, mentre al nostre cas el nombre de mostres per oligodendrogliomes va ser de 6.

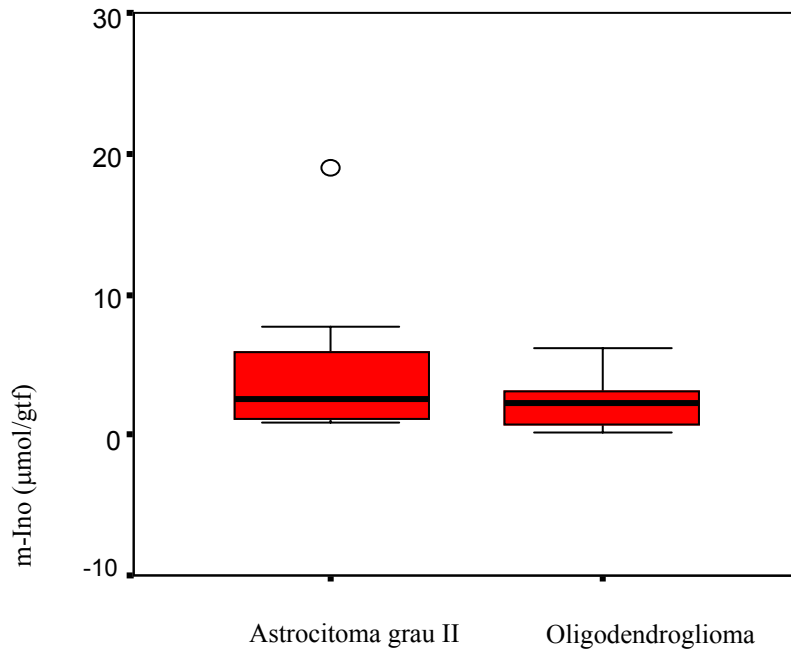


Figura 4.30: *Boxplot* dels valors obtinguts per m-Ino  $\mu\text{mol/gtf}$  per per astrocitomes de grau II ( $n=7$ ) i oligodendrogliomes ( $n=6$ ). Detalls sobre la representació dels *boxplots* a la figura 4.9.

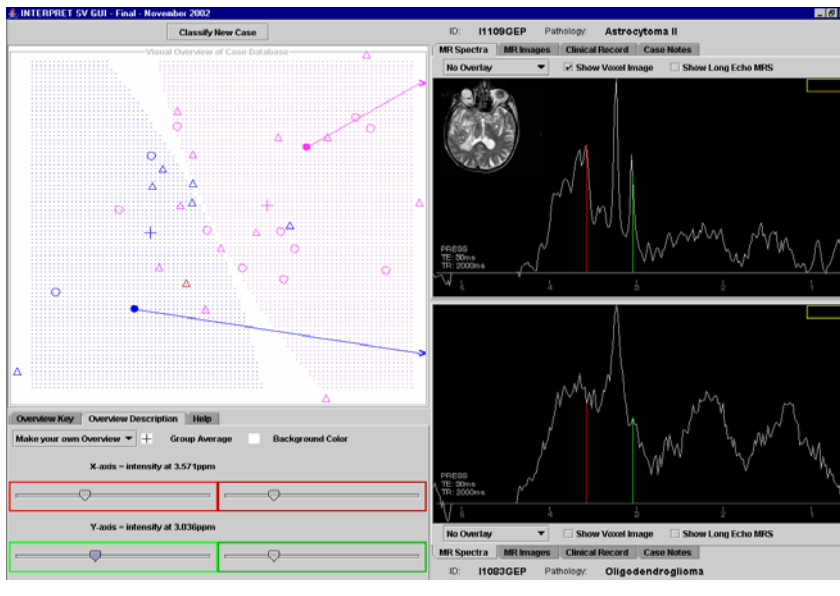


Figura 4.31: Pantalla del prototip científic d'INTERPRET de la representació entre astrocitomes de grau II (punts rosa) i oligodendrogliomes (punts blaus). Eix X: 3,57 ppm. Eix Y: 3,03 ppm. A dalt es presenta un espectre d'astrocitoma grau II i a baix un espectre d'oligodendroglioma.

Tot i la manca de significació estadística a les dades d'extractes *in vitro* per diferències a la concentració de m-Ino, la ressonància a 3,55 ppm sembla tenir força importància a la hora de discriminar entre tumors astrocítics de baix grau i oligodendrogliomes, com mostra la pantalla del prototip de la figura 4.31, suggerint la participació d'altres compostos als espectres *in vivo* a part del m-Ino, o bé que els extractes estudiats encara no són suficientment representatius dels tipus tumorals estudiats.

#### 4.3.1.3.4 Hemangiopericitomes versus Meningiomes

Treballs previs del grup (Barba i col, 2001), havien indicat la importància del m-Ino a la discriminació entre hemangiopericitomes i meningiomes. Aquesta distinció és desitjable, ja que tots dos tumors presenten tendències diferents en el seu comportament clínic. L'hemangiopericitoma, al ser altament vascularitzat, presenta una tendència a la hemorràgia durant la cirurgia, sent aconsellable la embolització preoperatòria, i també una irradiació postoperatòria per la seva tendència a recidivar, procediment que no és necessari en els casos de meningiomes, que en general acostumen a ser benignes.

El valor alcançat *in vitro* per al promig dels valors de m-Ino als hemangiopericitomes realment és bastant superior, i estadísticament significatiu quan comparat bilateralment a glioblastoma i meningioma ( $p < 0,05$ ) i presentant tendència a la significació en la discriminació entre hemangiopericitomes i oligodendrogliomes o medul·loblastomes ( $0,05 < p < 0,1$ ). La discriminació bilateral que normalment es dona degut a l'exploració prèvia per IRM, però, és entre meningioma i hemangiopericitoma, tots dos tumors extraaxials. A la figura 4.32 s'aprecia una pantalla del prototip INTERPRET on es pot veure un exemple d'aquesta discriminació basada en la ressonància de m-Ino. A la zona dreta, a dalt, un espectre de TE curt d'un cas d'hemangiopericitoma emmagatzemat a la base de dades, i a baix un cas de meningioma. La diferència en el senyal de 3,55 ppm és apreciable. Un pic elevat a 3,55 ppm a TE curt es podria deure tant a m-Ino com a glicina, però la verificació dels espectres als dos TE d'aquest mateix pacient (figura 4.33) deixa clar que, amb la notable disminució del senyal a TE llarg, es tracta principalment de m-Ino (fletxa).

Els símptomes clínics i la IRM moltes vegades no són suficients, però, per distingir entre hemangiopericitomes i meningiomes, d'aquí la possible utilitat de la ERM. Barba i col (2001) presenten en aquell treball una comparació *in vivo*, entre meningiomes i hemangiopericitomes basada en el quocient d'alçades m-Ino/TMA (trimetilamines) a TE curt,

establint un possible punt de tall (0,9) on tots els meningiomes estudiats es presentaven amb valors inferiors, mentre tots els hemangiopericitomes estudiats es presentaven amb valors superiors, no havent-hi superposició. Per reproduir aquesta representació amb els valors *in vitro*, hem utilitzat el càlcul  $(M \text{ Ino} + \text{gly}) / (c + \text{pc} + \text{gpc})$ , ja que *in vivo* les resonàncies de les quals s'ha mesurat l'alçada corresponen a més d'un compost. El gràfic obtingut s'ensenya a la figura 4.34.

La distinció entre els dos tipus, amb aquesta representació, mostra una tendència dels hemangiopericitomes a valors superiors, tot i que s'observa superposició entre els valors pels dos tipus. Això podria ser degut a que la simplificació utilitzada per simular *in vitro* la separació observada *in vivo* no sigui totalment vàlida. Efectivament, la representació *in vivo* fa servir les alçades i la representació *in vitro* usa l'aproximació de les concentracions. Les alçades no estan corregides pel nombre de protons, mentre les concentracions sí, per això l'extrapolació no és del tot coincident. A més, *in vivo* podria haver-hi contribució al patró espectral de biomolècules no extraïbles per PCA amb contingut de grup trimetilamina (p.ex. fosfatidilcolina, a més d'altres molècules no quantificades al rang espectral d'interès als extractes PCA).

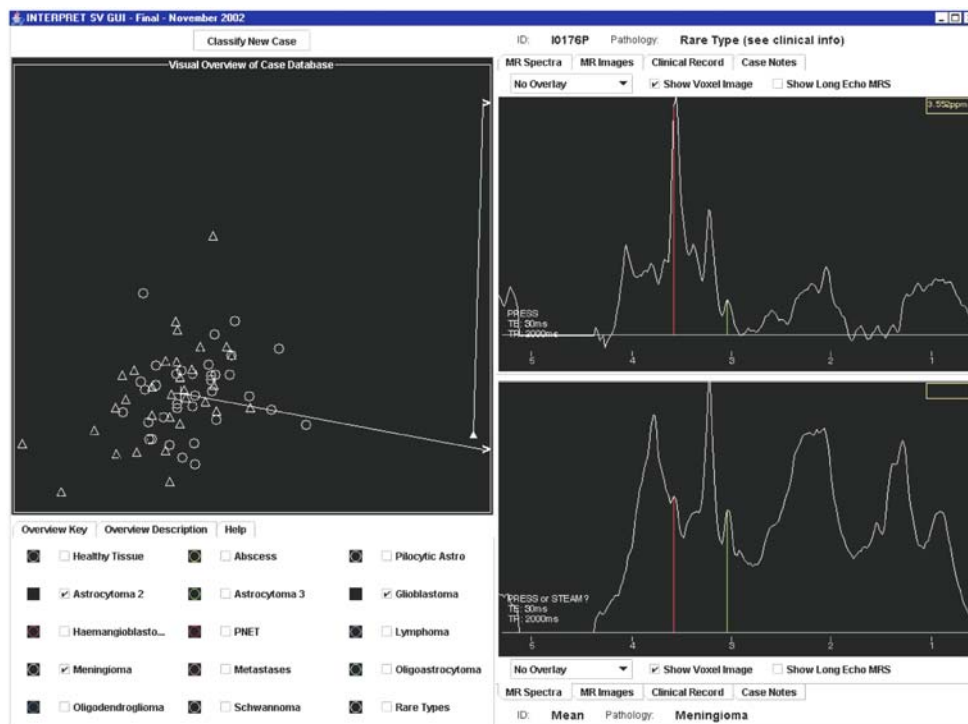


Figura 4.32: Pantalla del prototip científic INTERPRET, representant la discriminació que s'aconsegueix entre meningiomes vs un hemangiopericitoma, utilitzant la resonància a 3,55 ppm a l'eix de les abscisses i a 3,03 ppm a l'eix de les ordenades. A les pantalles negres de la dreta, la representació d'un hemangiopericitoma (a dalt) i un meningioma (a baix).

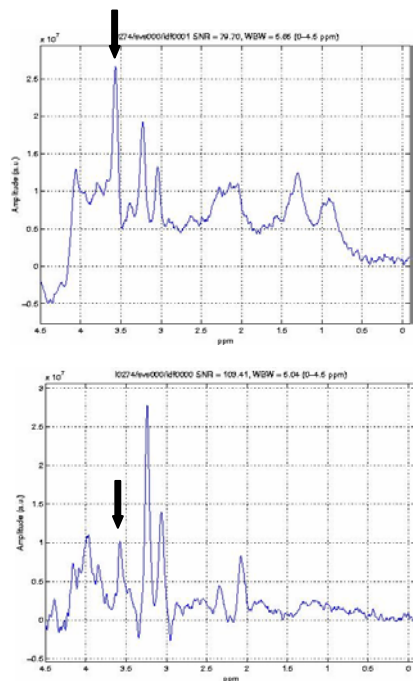


Figura 4.33: Espectres als dos TE del mateix cas d'hemangiopericitoma (I0274) que s'ensenya a la figura 4.32.

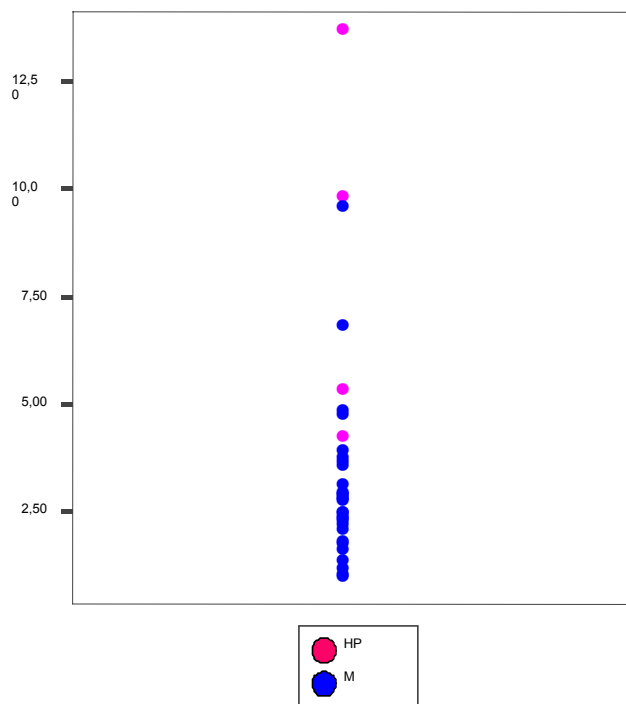


Figura 4.34: Representació dels valors de hemangiopericitomes i meningiomes *in vitro* (m-Ino+gly)/(c+pc+gpc). HP, hemangiopericitomes; M, meningiomes

#### **4.3.1.3.5 Discriminació entre neurinomes i meningiomes**

##### **Permet el m-Inositol discriminar entre neurinomes i meningiomes ?**

Realitzant una representació d'aquests dos tipus tumorals al prototip científic INTERPRET (figura 4.35), hi ha una indicació de que aquesta ressonància podria ser important en la discriminació dels dos tipus tumorals, tot i que els neurinomes estan poc representats al prototip. Els meningiomes són un tipus tumoral molt freqüent, mentre els neurinomes ho són menys (veure taula 1.4), d'aquí la diferència entre el nombre de representants.

A l'anàlisi *in vitro* (taula 4.13) es repeteix la situació de nombre de casos molt diferent entre una classe i altra; la diferència entre els valors trobats no presenta diferències estadísticament significatives, però sí indiquen una tendència similar al trobat *in vivo*. Per als meningiomes s'ha trobat un valor per al myo-inositol de  $1,63 \pm 0,31 \mu\text{mol/gtf}$  i per als neurinomes, de  $2,17 \pm 0,51 \mu\text{mol/gtf}$  (promig  $\pm$  SEM).

La comparació bilateral dels valors de m-Ino en aquestes patologies indica una tendència a la significació estadística ( $p=0,089$ ), que es perd quan s'intenten utilitzar els valors normalitzats per a proteïna ( $p=0,273$ ). Peeling i Sutherland (1992) van descriure valors comparables, tot i que el nombre de mostres analitzats en aquesta tesi és bastant superior ( $n=34$  entre meningiomes (29) i neurinomes (5) en front de  $n=7$  (6 meningiomes i 1 neurinoma) per a Peeling i Sutherland, 1992). Kinoshita i col (1994) van trobar la mateixa tendència (al seu treball, meningiomes  $n=13$  i neurinomes  $n=6$ ) però el valor indicat per a neurinomes és bastant superior (figura 4.36). El valor dels meningiomes és bastant més semblant entre els diferents estudis publicats.

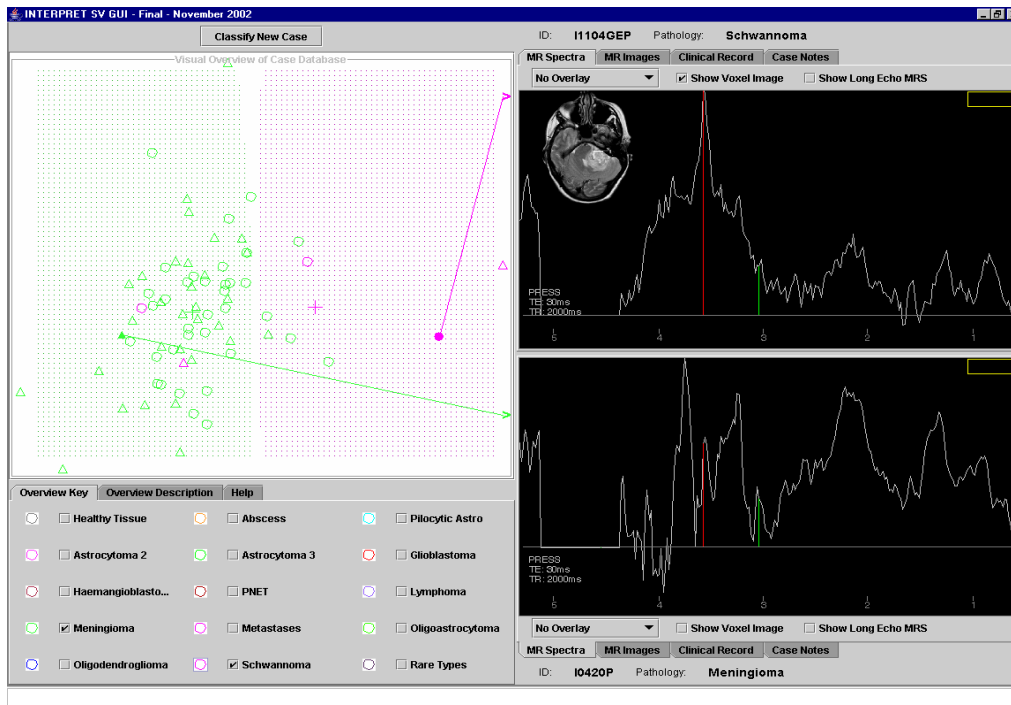


Figura 4.35: Representació al prototip científic INTERPRET de meningiomes i neurinomes. Eix X: alçada a 3,57 ppm (m-Ino, Gly). Eix Y: alçada a 3,03 ppm (creatina). Els punts verds representen els meningiomes. A dalt es representa un espectre de neurinoma i a baix, un espectre de meningioma.

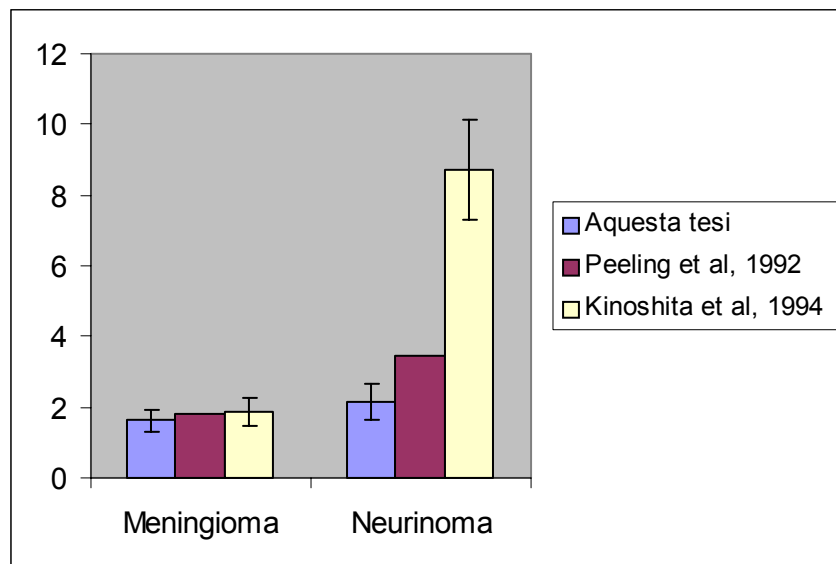


Figura 4.36: Valors trobats per m-Ino ( $\mu\text{mol/gtf}$ , mitja  $\pm$  SEM excepte per valors que no tenien més d'un representant) a neurinomes i meningiomes.

#### 4.3.1.3.6 Glioblastoma versus metàstasis

Aquest apartat tenia per finalitat detectar un punt de tall on es poguessin separar els tumors agressius necròtics (glioblastomes, metàstasis) amb poc patró necròtic i que possibilités la discriminació entre uns i altres.

Entre els espectres *in vivo* de glioblastomes, hi ha un cert percentatge que no tenen lípids mòbils visibles al seu patró espectral *in vivo* i que presenten senyals considerables dels altres metabòlits cel·lulars, especialment m-Ino/gly. Aquests lípids mòbils estan en general correlacionats amb el grau d'agressivitat tumoral i poden ser un factor de predicció en els tumors astrocítics (Negendank i col, 1996).

Per intentar visualitzar aquests casos, s'ha fet una representació de valors de quocients espectrals *in vivo*. Per l'eix X: quocient 3,55/3,03 ppm i per l'eix Y: quocient 1,29/3,03 ppm. El resultat d'aquesta representació és una distribució de tumors en 4 quadrants segons observem a la figura 4.37. En aquesta figura, els glioblastomes es representen en vermell i les metàstasis en blau. Els dos quadrants superiors són ocupats indistintament pels dos tipus tumorals, ja que presenten valors elevats del quocient lípids/creatina i són necròtics. El quadrant inferior esquerre està ocupat per glioblastomes i metàstasis amb pocs lípids, però no està clara la separació respecte a la ressonància a 3,55 ppm. El quadrant dret inferior està ocupat únicament per glioblastomes amb:

- pocs lípids
- quantitat elevada de m-Ino i/o gly

Aquesta representació ens permet dir, amb un grau considerable de confiança a confirmar en futurs estudis, que si un tumor agressiu no és necròtic i es localitza al quadrant inferior dret, es tracta d'un glioblastoma.



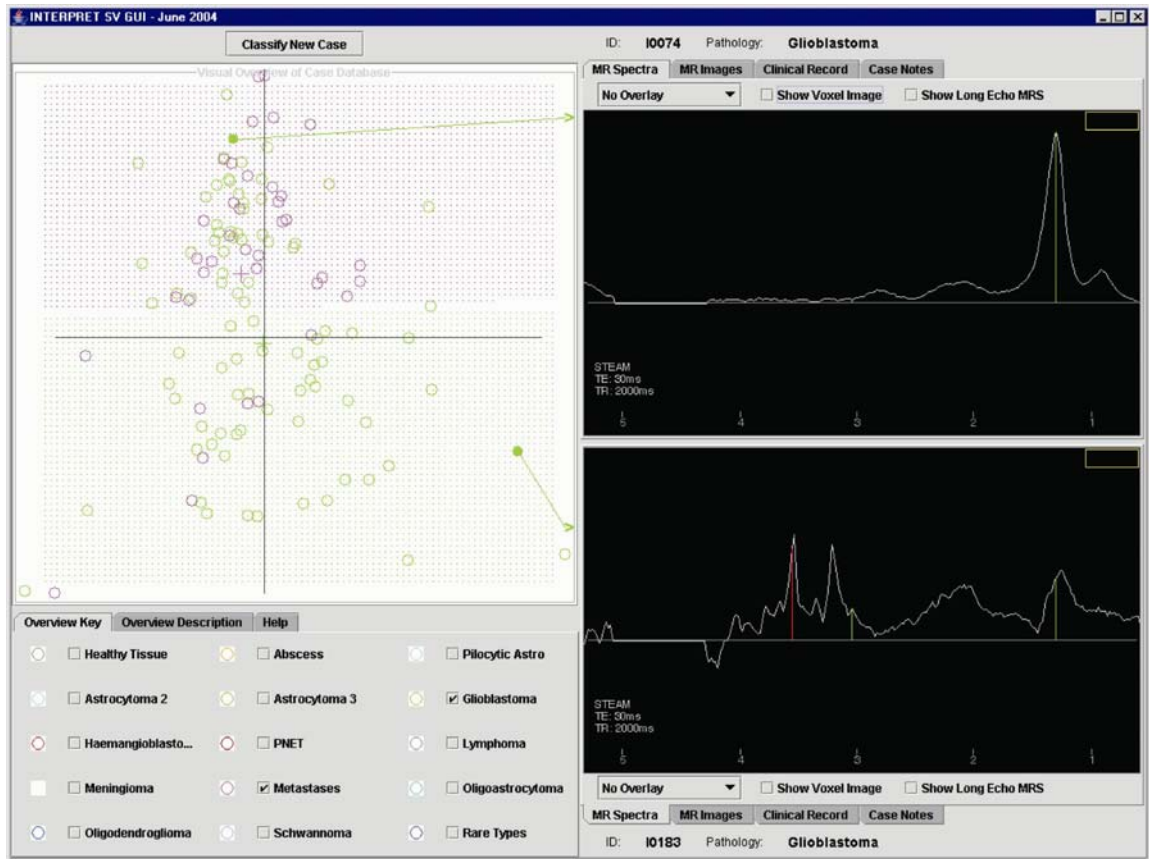


Figura 4.37: Pantalla del prototip científic ( $Y= 1,29/3,03$  ppm;  $X=3,55/3,03$  ppm a TE 20-32 ms) on s'ensenyen la discriminació empírica d'un petit subgrup de glioblastomes no necròtics (quadrant inferior dret, punts verds) de les metàstasis (punts rosa).

Els quadrants s'han establert de moment empíricament, ja que farien falta més casos de glioblastomes sense lípids per acabar de validar el mètode. Els casos delimitats pel quadrant representen un 22% del total. Per als tumors amb una quantitat elevada de lípids, molt recentment, Opstad i col (2004) han proposat una discriminació de GB i ME en base al quocient d'àrees de les ressonàncies centrades a  $1,29/0,9$  ppm, indicant un valor superior per a les metàstasis. Els càlculs realitzats amb espectres emmagatzemats a la base de dades INTERPRET per al quocient d'alçades d'aquestes mateixes ressonàncies han indicat la mateixa tendència ( $2,84 \pm 0,14$  per als glioblastomes i  $3,33 \pm 0,22$  per a les metàstasis, amb  $p=0,05$ ), el que concorda amb el gran percentatge de metàstasis que ocupen els quadrants superiors (valors més elevats de  $1,29/3,03$  ppm), encara que el desenvolupament d'un possible classificador necessitarà una anàlisi més detallada del tema.

No és possible fer el mateix tipus d'aproximació *in vitro* ja que per extracció PCA es perd la part relativa als lípids. S'han intentat aproximar càlculs *in vitro* a partir de la suma de

(m-Ino + gly)/cr. S'ha trobat un valor de  $2,91 \pm 0,36$  (promig  $\pm$  SEM) pels glioblastomes i  $4,67 \pm 0,56$  per a les metàstasis amb una significació estadística de la diferència amb  $p < 0,05$ . Tot i així, encara que sigui una informació útil per a una discriminació *in vitro*, la discriminació *in vivo* depèn molt de si l'espectre presenta o no patró necròtic, el que limita la quantitat de casos que poden ser discriminats amb aquest tipus de representació.

#### **4.3.1.4 RECONeixEMENT DE PATRONS *IN VIVO*: INTRODUCCIÓ DE LA VARIABLE M-INOSITOL/GLICINA**

##### **4.3.1.4.1 Inclusió del quocient RmI,gly/Cr a la classificació de tumors**

Un cop s'ha comprovat la capacitat discriminativa del quocient RmI,gly/Cr en la classificació dels tumors astrocítics (punt 4.3.1.1), s'ha procedit a intentar incloure aquest paràmetre en els classificadors desenvolupats a partir de les dades *in vivo*. El prototip científic desenvolupat al projecte INTERPRET es basa en *Linear Discriminant Analysis* (LDA), calculat mitjançant l'entrenament del sistema amb casos de patologia coneguda (classificador supervisat). Per fer aquesta inclusió, s'ha hagut de reduir el conjunt d'entrenament o *training set*, de les mostres per entrenar el sistema, conservant només els casos que tinguessin els espectres de temps d'eco curt i llarg, i que a més tots dos tinguessin una qualitat espectral acceptable segons criteris predefinits<sup>15</sup>. Tots els passos s'han fet reproduint les metodologies i resultats obtinguts per A.R. Tate (Tate i col, 2003). El punt de partida era ja una bona classificació per aquest grup d'espectres, obtenint-se un 90,8% de classificació correcta dels casos, i igualment un 90,8% quan el sistema classificava els casos per validació creuada (*leave one out*, LOO)<sup>16</sup>. El gràfic de separació obtingut es mostra a la figura 4.38:

<sup>15</sup> ([http://azizu.uab.es/INTERPRET/private/DocDir/FILTERING\\_PARAMETERS.pdf](http://azizu.uab.es/INTERPRET/private/DocDir/FILTERING_PARAMETERS.pdf))

<sup>16</sup> El sistema de classificació 'leave one out' es basa en usar tots els espectres menys un com a conjunt d'entrenament, i classificar l'espectre que s'ha quedat fora; l'esquema de classificació és repetit amb cada espectre del grup.

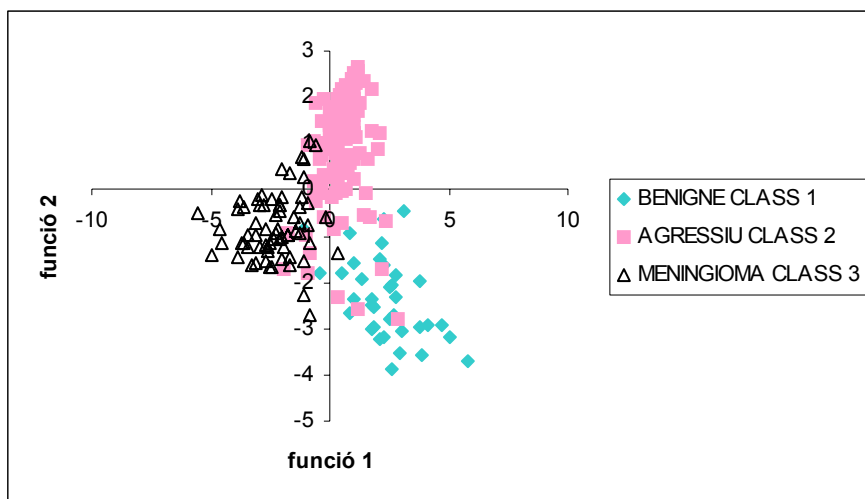


Figura 4.38: Representació de les dues funcions calculades pel programa SPSS per la classificació dels espectres de TE curt per LDA. Benignes: astrocitomes de grau II, oligodendrogliomes i oligoastrocitomes n=38; agressiu: glioblastomes i metàstasis n=135; meningiomes n=67.

Les modificacions fetes al *training set* estan resumides a la taula 4.20.

Tipus	Total	Exclusos	Total emprat en aquesta secció
Benignes	38	10	28
Agressius	135	25	110
Meningiomes	67	27	40

Taula 4.20: Total inicial d'espectres al grup d'entrenament del sistema de classificació, i total posterior a la reducció del grup després de reduir-lo als espectres amb 2 TE i qualitat espectral acceptable.

#### 4.3.1.4.2 Selecció de variables amb els casos d'entrenament del sistema

Les variables amb millor correlació de Pearson per comparació bilateral entre els tres tipus tumorals han estat les següents (taula 4.21):

Comparació	Variable (SPSS)	Correspondència en ppm	Coefficient correlació
Benigne <i>versus</i> agressiu	V186	3,59	0,777
	V215	3,03	0,725
	V305	1,31	0,697
	V205	3,23	0,669
	V193	3,46	0,617
	V237	2,61	0,423
Meningioma <i>versus</i> agressiu	V254	2,29	0,792
	V177	3,76	0,704
	V306	1,29	0,677
	V243	2,50	0,689
	V196	3,32	0,484
	V272	1,94	0,484
Meningioma <i>versus</i> benigne	V215	3,03	0,791
	V186	3,59	0,736
	V252	2,32	0,796
	V262	2,13	0,622
	V242	2,52	0,556
	V277	1,84	0,492

Taula 4.21: Variables amb millor correlació obtingudes en les comparacions entre els diferents tipus tumorals. Es presenten les variables assignades pel programa, correspondència en ppm i coeficient de correlació (valor absolut).

#### **4.3.1.4.3 Anàlisi Discriminant Lineal (*Linear Discriminant Analysis*, LDA)**

##### **Anàlisi de tots els casos amb espectres als dos temps d'eco**

Les variables, exceptuant-se les repetides, s'han introduït al programa SPSS per una classificació discriminant, com ja ha estat comentat a l'apartat 3.11.1.4 de mètodes. Considerant els paràmetres aplicats, el sistema ha triat les següents variables (taula 4.22):

Variable	Funció		ppm/possible correspondència
	1	2	
V177	-,204	-,035	3,76 (gln, glu, ala)
V186	,168	-,153	3,59 (m-Ino, gly)
V215	,301	,005	3,03 (Cr)
V252	-,498	-,024	2,32 (glu, GABA)
V306	,017	,089	1,30 (lac, lip)

Taula 4.22: Variables triades pel SPSS amb la classificació realitzada només amb els espectres que tenen dos TE. La LDA es fa amb les variables d'espectres de TE curt.

Els resultats obtinguts en aquesta classificació han estat els que es descriuen a continuació. La classificació s'ha realitzat exactament de la mateixa manera que la descrita a Tate i col (2003). El percentatge d'encert va ser de 93,5% de classificació correcta i 93% d'encert amb els casos per LOO (figura 4.39). El petit augment en el percentatge d'encert es pot deure a la retirada d'alguns casos del *training set*, ja que la metodologia seguida ha estat exactament igual.

Aquest test previ era important per determinar un punt de partida, a partir del qual s'investigaria si la introducció del quocient  $R_{mI, gly/Cr}$  com a variable forçada millorava, empitjorava o no modificava el sistema de classificació. Comparar directament els resultats obtinguts amb la variable i els resultats anteriors (*training set* complet) no seria correcte, perquè per la introducció del quocient 3,55/3,03 es va haver de reduir el *training set* disponible.

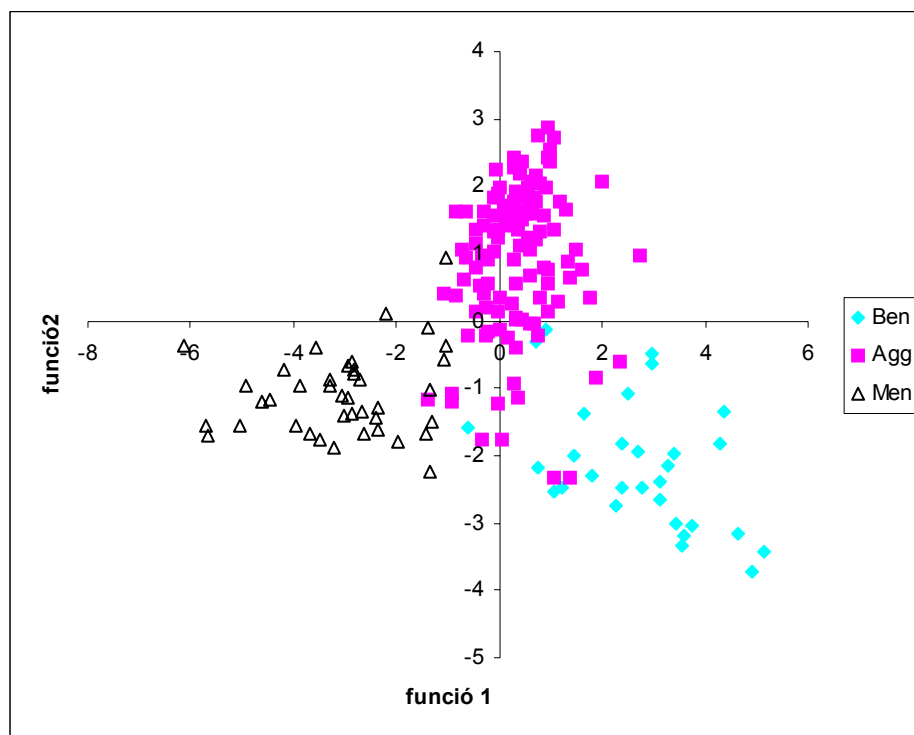


Figura 4.39: Representació de les dues funcions calculades pel programa SPSS per la classificació dels espectres *in vivo* per LDA (només els espectres amb dos TE). La LDA, però, se segueix fent amb espectres de TE curt. (Ben= benignes, Agg= agressius, Men= meningiomes).

La correlació de Pearson calculada per la variable del quocient 3,55/3,03 va ser (en valor absolut) de 0,437 entre benignes i agressius ( $p < 0,01$ ); 0,501 entre benignes i meningiomes ( $p < 0,01$ ) i 0,004 entre meningiomes i agressius (no significativa).

Repetint la metodologia d'intentar una classificació discriminant on el programa pugui triar lliurement les variables per inclusió per passos, aquesta variable no és triada pel sistema (taula 4.23).

Variable	Funció	
	1	2
V177	-,198	,030
V186	,175	,168
V215	,314	-,005
V252	-,484	,046
V306	,028	-,082

Taula 4.23: Variables triades lliurement pel sistema en una classificació discriminant, amb introducció de les variables amb més correlació i el quocient RmI,gly/Cr.

Considerant que el sistema no ha triat lliurement la variable però hi havia interès en veure com aquesta afectava la classificació discriminant, s'han introduït forçosament les variables triades pel sistema en l'anàlisi anterior més el quocient 3,55/3,03. El percentatge d'encert s'ha modificat a 93,5% dels casos classificats correctament i 91,9% dels casos classificats correctament per LOO (figura 4.40).

De manera global, el percentatge d'encert no s'ha modificat de manera significativa, ja que partíem d'un percentatge bastant alt. Això en part també es podria deure a que el pic a 3,55 (m-Ino, gly), tot i ser un factor possiblement important en la caracterització i gradació de tumors astrocítics no ho és en la classificació de meningiomes, podent no alterar o fins i tot empitjorar la classificació general de tots els tumors. El percentatge de meningiomes assignats (en LOO) a una classe incorrecta va ser de 10% sense fer servir el quocient  $RmI, gly/Cr$ , i 12,5% quan es fa servir aquest quocient per a la discriminació, el que reforça la idea de que l'ús d'una variable inadequada pot millorar una part de la classificació i empitjorar l'altra.

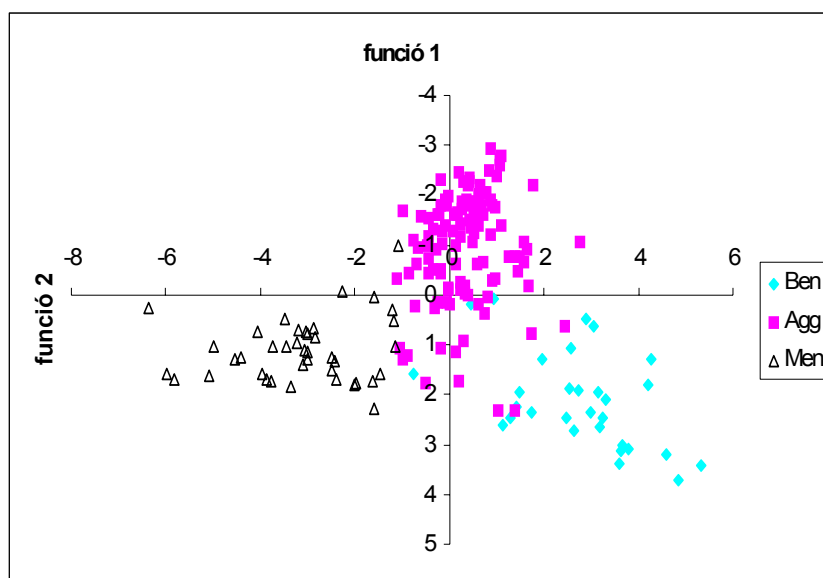


Figura 4.40: Representació de les dues funcions calculades pel programa SPSS per la classificació dels espectres *in vivo* per LDA (només els espectres amb dos TE; inclusió forçada de les variables triades i també del quocient  $RmI, gly/Cr$ ). LDA realitzada amb les variables d'espectres a TE curt.

### Espectres de tumors astrocítics d'alt i baix grau

Hi va haver interès en investigar quin seria el percentatge d'encert realitzant-se la classificació utilitzant només els tumors astrocítics (glioblastomes+ astrocitomes de grau III vs astrocitomes de grau II). Amb les variables triades lliurement pel sistema, s'assoleix un

percentatge d'encert de 96,4% i dels casos classificats correctament i 95% dels casos agrupats correctament per validació creuada. Quan es força la inclusió de les variables i a més el quocient  $RmI_{gly}/Cr$ , els percentatges d'encert no es modifiquen. La representació gràfica de la distribució dels casos es mostra a la figura 4.41.

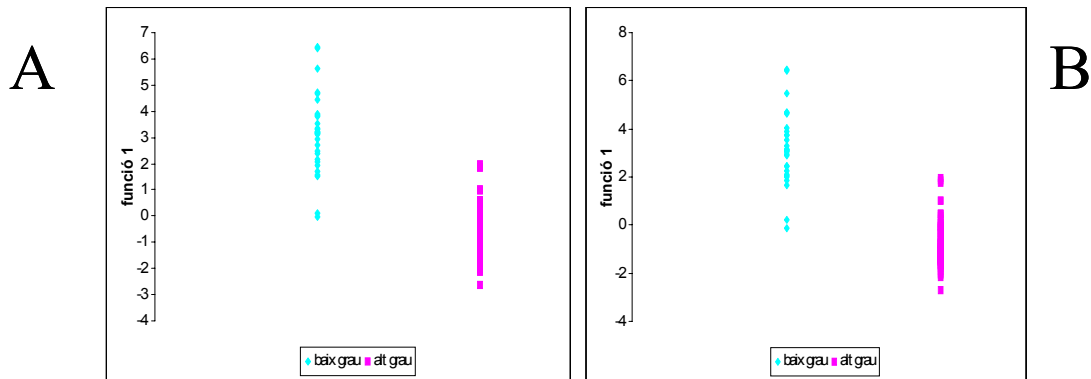


Figura 4.41: Representació gràfica de l'anàlisi discriminant lineal efectuada només amb els tumors astrocítics. A) mètode d'inclusió per passos i lliure tria de variables; B) variables forçades juntament amb el quocient  $RmI_{gly}/Cr$ .

És possible, per tant, que per observar un efecte beneficiós de l'ús del quocient  $RmI_{gly}/Cr$  calgui esperar a fer 'preguntes' més específiques al sistema de classificació (p.ex. discriminacions entre glioblastomes primaris vs. secundaris o entre glioblastomes secundaris i astrocitomes pilocítics) en que les proporcions relatives de m-Ino i gly proporcionen informació discriminatòria potencialment imprescindible.

#### 4.3.1.5 RECONeixEMENT DE PATRONS *IN VITRO*: ALTRES DISCRIMINACIONS

##### BILATERALS PLANTEJADES

#### 4.3.1.5.1 Meningiomes vs neurinomes

Les variables més altament correlacionades amb el test de correlació de Pearson, i que han presentat significació estadística, van ser m-Ino ( $r=0,642$ ), s-Ino ( $r=0,611$ ), creatina ( $r=0,390$ ), GPC ( $r=0,622$ ) i NAA ( $r=0,407$ ) (totes amb  $p<0,05$ ). En un intent d'anàlisi discriminant lineal entre aquests dos tipus tumorals, les variables triades lliurement pel programa SPSS van ser m-Ino, creatina, fosfocolina, colina i NAA, coincidint en part amb les variables més correlacionades. El programa no va triar l'alanina que com ja s'ha vist és molt important en la discriminació entre meningiomes i altres tipus de tumors, però va triar el m-Ino, que sembla ser important en aquesta discriminació particular. La representació de les





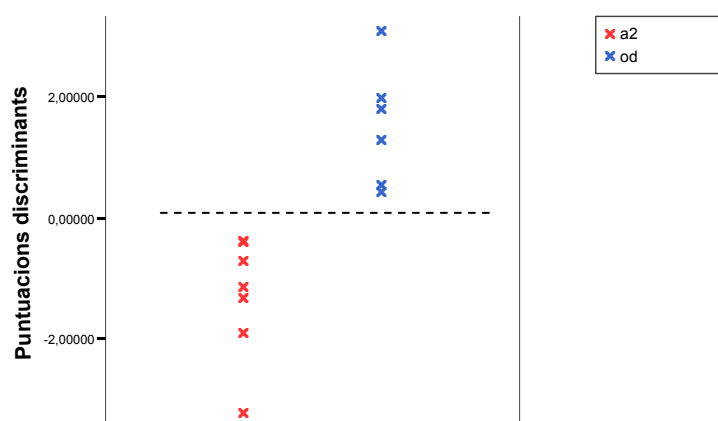


Figura 4.43: Representació obtinguda en l'anàlisi discriminant lineal entre astrocitomes de grau II (a2) i oligodendrogliomes (od) *in vitro*. La línia discontinua representa el possible llindar de discriminació.

#### 4.3.1.5.3 Astrocitomes grau II vs Astrocitomes grau III vs glioblastomes

Les correlacions de Pearson obtingudes a l'anàlisi dels tumors astrocítics han estat significatives només al cas de m-Ino i GPC (A2 vs GB), però han presentat coeficients de correlació baixos (-0,258 i -0,278 respectivament). Els valors més elevats de correlació ( $r > 0,4$ ) han estat per gly, ala i PC (A2 vs A3), cap d'ells sense significació estadística; tots els demés valors observats van ser molt inferiors. Amb els tumors astrocítics, el programa SPSS no ha considerat cap variable apta per a l'anàlisi, així que la discriminació s'ha fet amb totes les variables incloses forçosament (tots els metabolits quantificats a excepció de GABA, que no està quantificat en alguns casos). El percentatge d'encert d'aquest intent de discriminació és de 89,2% per als casos originals agrupats, i 75,7% per als casos testats per LOO, i cal considerar l'efecte d'un nombre excessiu de variables en relació al grup de casos més petit. Un intent de classificació utilitzant només la variable GPC ha donat un índex d'encert més baix (79,7% i 78,4% dels casos). La pantalla de representació mostra que, possiblement, a part dels astrocitomes de grau II que se superposen als glioblastomes, els altres tipus tumorals ocupen espais bastant definits i se separen bé. La inclusió de la variable [m-Ino]/[gly] modifica lleugerament el percentatge d'encert (87,8 i 81,1% (LOO) dels casos) i s'ensenya a la figura 4.44 juntament amb la representació de l'anàlisi discriminant lineal sense aquesta variable. Aquesta variable va presentar coeficients de correlació més elevats ( $> 0,5$ ) en les comparacions bilaterals de A3 vs GB i també vs A2.

L'augment del nombre de mostres possiblement donarà pas a una millor classificació, encara que cal tenir també en compte la dificultat de la gradació de tumors astrocítics per anatomia patològica (el “gold standard”) d'una manera reproducible.

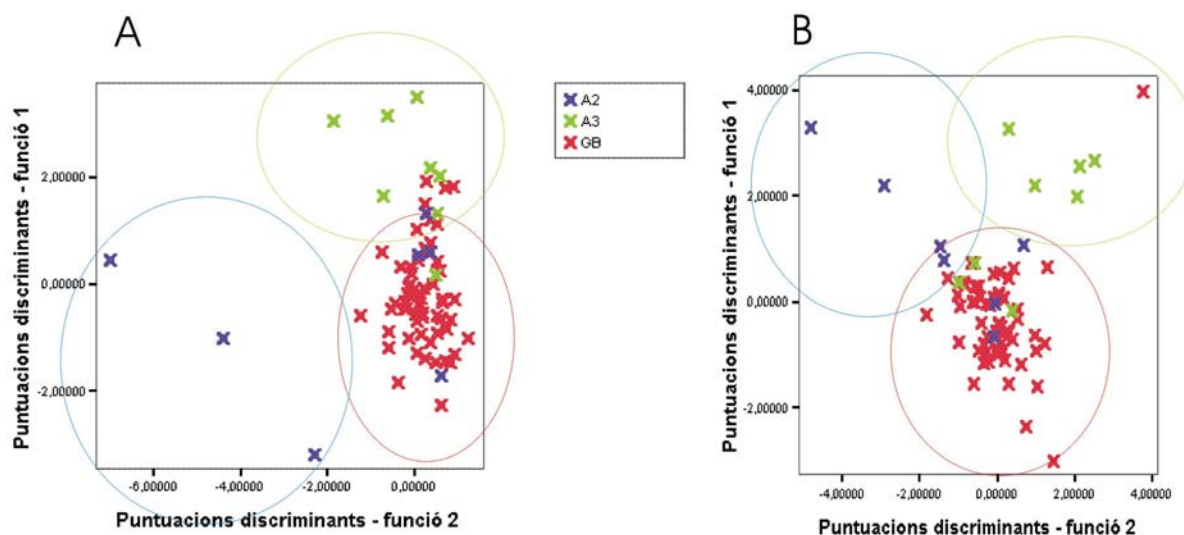


Figura 4.44: Representació espacial de les puntuacions obtingudes en l'anàlisi discriminant de tumors astrocítics *in vitro*. A) tots els metabolits mesurats i B) tots els metabolits més el quocient [m-Ino]/[gly]. Els òvals indiquen aproximadament la regió ocupada per cada tipus tumoral (a2= astrocitoma de grau II, a3= astrocitoma de grau III, gb= glioblastoma).

### 4.3.2 Taurina

#### 4.3.2.1 ESTUDIS *IN VIVO* I AMB DISSOLUCIONS MODEL

Els estudis amb les mostres model tenien per objectiu observar la modulació deguda a l'acoblament homonuclear presentada per alguns metabòlits i caracteritzar-la, sense la interferència ni solapament d'altres ressonàncies com s'observa freqüentment *in vivo*, i traslladar aquest coneixement a la interpretació dels espectres de pacients. La taurina no és fàcilment detectada als espectres *in vivo* degut a la important superposició amb la colina, aquesta sí, un pic prominent i elevat en la majoria dels espectres de tumors. Als espectres *in vitro* és fàcilment quantificada ja que no s'observen altres superposicions.

Als estudis de dissolució model realitzats amb taurina, a TE llarg, s'observa una modulació incompleta que produeix un patró característic i que fàcilment es confon amb

errors de fase o artefactes. Als espectres *in vivo* els patrons no són exactament els mateixos de la solució model degut a la superposició de la ressonància de taurina amb altres, per exemple, colina a 3,21 ppm (figura 4.45).

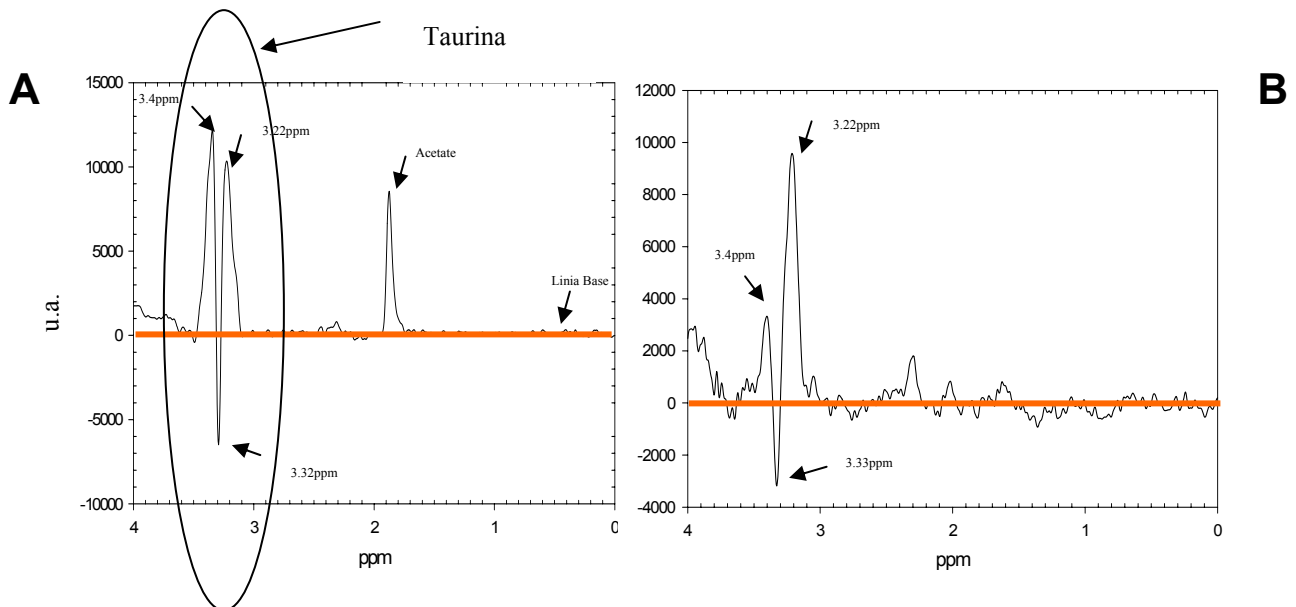


Figura 4.45: Espectre PRESS, 136 ms (1,5T) de A) solució model de taurina (100mM) barrejada amb acetat (20mM) i B) pacient I0377 de la iDB, diagnosticat de limfoma maligne. (ua: unitats arbitràries)

A TE curt s'observa un col·lapse dels dos senyals de la taurina resultant en un multiplet aparent centrat aproximadament a 3,30 ppm, com es pot veure a la figura 4.46. Comparar la diferència de resolució que es veu en la figura 4.47 (espectre *in vitro*).

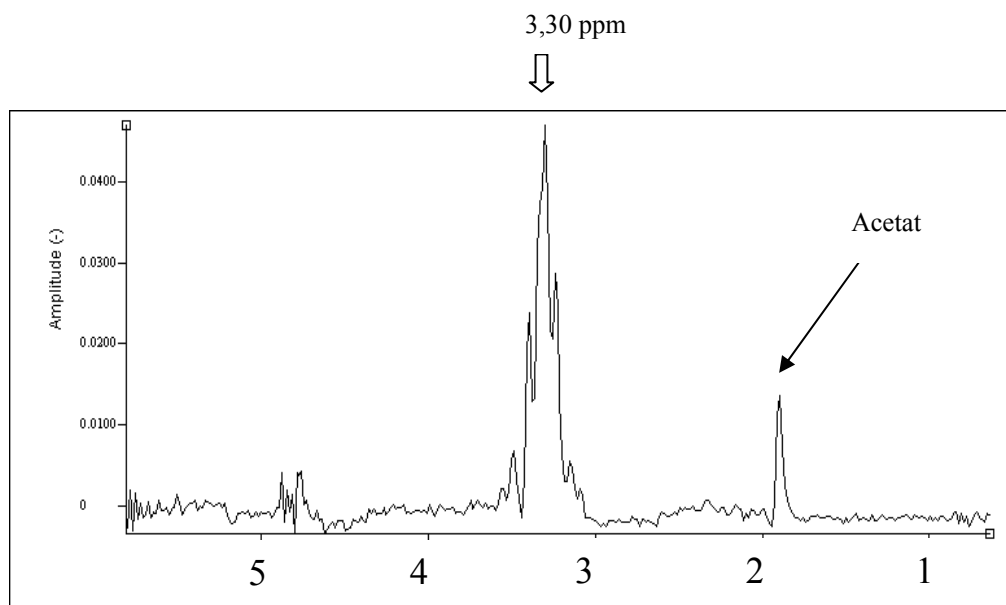


Figura 4.46: Espectre PRESS, 30 ms (1,5T) de taurina. En comptes de dos triplets resolts, com es veu a alta resolució, *in vivo* a 1,5T el que es veu es un col·lapse dels dos multiplets a 3,30 ppm.

En aquest cas, s'ha comprovat que el patró espectral del pacient *in vivo* es corresponia clarament amb el patró de taurina, el que ha quedat totalment confirmat després de l'anàlisi per extracció PCA de la biòpsia del tumor (fig. 4.47). Aquest era un cas on la gran predominància de la taurina no deixava lloc a dubtes. Majós i col (2002) han suggerit la presència de taurina com característica en determinats tipus de tumors com els PNETs. Degut, però, a que la quantificació i observació de la presència de taurina depèn d'un nivell acceptable de senyal/soroll en aquesta part de l'espectre, no sempre és utilitzada en processos de quantificació i classificació automàtica, ja que no tots els casos són tan clars com el que es mostra a la figura 4.45. En general, la identificació de la taurina en un espectre *in vivo* necessita experiència d'espectroscopista i coneixement del patró de modulació complex que presenta al camp magnètic emprat concret.

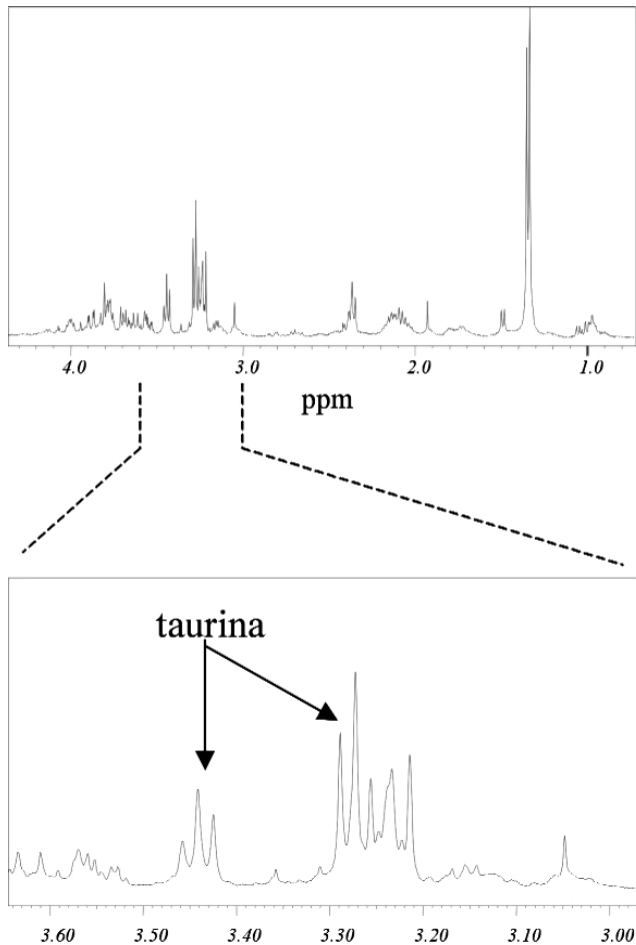


Figura 4.47: Fragment de l'espectre de  $^1\text{H}$  a 9,4T de l'extracte PCA de la biòpsia del pacient I0377, del qual s'ensenya espectre *in vivo* a la figura 4.45B. Veure taula 4.14 per les principals assignacions.

#### 4.3.2.2 ESTUDIS *IN VITRO*

Els valors calculats per taurina als extractes PCA s'il·lustren a la figura 4.48. Els valors més elevats s'han obtingut en metàstasis i medul·loblastomes. Per als altres tumors, es van obtenir resultats lleugerament superiors o inferiors al normal, sense, però, una variació extrema. Com les distribucions de valors eren normals (test de Kolmogorov-Smirnov), s'han contrastat les mitges pel test d'ANOVA, obtenint significació estadística de les metàstasis quan comparades a les següents patologies: astrocitoma grau II, oligodendroglioma, astrocitoma grau III, neurinoma ( $p < 0,05$  per a tots) i glioblastoma ( $p < 0,001$ ). Roda i col (2000) també troben valors més alts de taurina per metàstasis quan les comparen amb tumors astrocítics d'alt grau (A3 i GB).

La taurina és considerada un marcador de proliferació i d'estrès cel·lular. S'hipotetitza que funcioni com element regulador d'osmosi, antioxidant i possiblement pugui actuar com a

neurotransmissor (citada en Tappaz i col, 1992). Peeling i Sutherland (1992) indiquen que els astrocitomes malignes (grau III i GB) es distingeixen dels benignes (grau II) per concentracions més grans de taurina, a més d'alanina i glutamina. Els astrocitomes malignes (tal i com definit a dalt, grau III i GB) tenen quantitats significativament superiors ( $p < 0,05$ ) als benignes. El valor per astrocitomes de baix grau és de  $0,91 \pm 0,52 \mu\text{mol/gtf}$ , mentre el valor per astrocitomes d'alt grau és de  $1,95 \pm 1,99 \mu\text{mol/gtf}$ . Peeling i Sutherland (1992) reporten valors de  $0,33 \pm 0,09$  per astrocitoma de baix grau i  $1,77 \pm 0,34$  per astrocitomes d'alt grau.

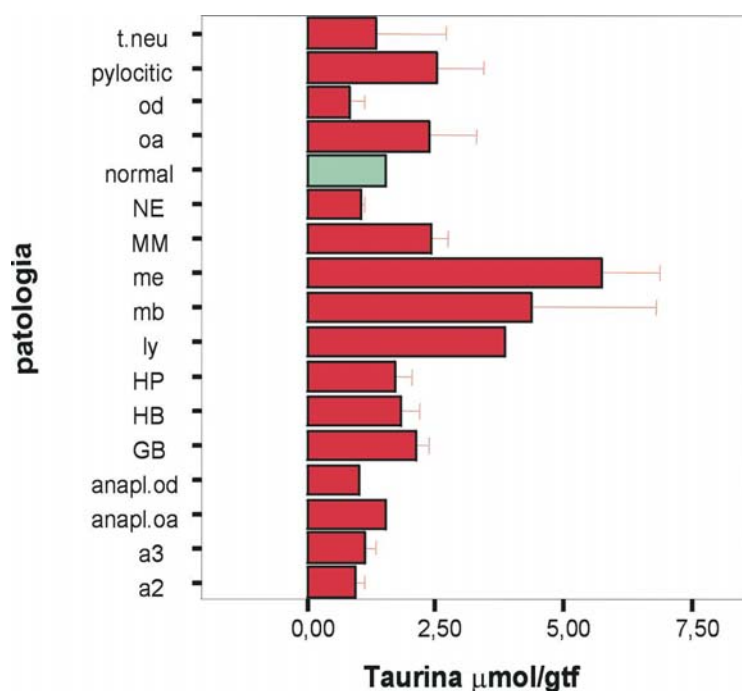


Figura 4.48: Promig  $\pm$  SEM dels valors de taurina per als diferents tipus tumorals. Significat dels acrònims com a la figura 4.20.

#### 4.3.2.3 CORRELACIONS *IN VIVO-IN VITRO* I PREGUNTES PLANTEJADES AMB L'ESTUDI

##### D'EXTRACTES PCA

##### 4.3.2.3.1 Discriminació entre PNETs i astrocitomes de baix grau

##### La taurina serveix per a discriminar entre PNETs i astrocitomes de baix grau ?

L'estudi *in vitro* (taula 4.13) ens indica que la taurina està més elevada als PNETs (medul·loblastomes, en aquest cas), presentant tendència a la significació ( $p=0,086$ ) quan comparada a astrocitomes de grau II. Els resultats per astrocitomes de grau II és  $0,91 \pm 0,20$  i pels medul·loblastomes és de  $4,37 \pm 2,45$  (mitja  $\pm$  SEM); els valors i la seva distribució en forma de *boxplot* s'ensenyen a la figura 4.49. La figura 4.50 mostra dos exemples d'espectres

d'extractes PCA de biòpsies: un de PNET i un d'astrocitoma de grau II, on les diferències en el pic de taurina són senyalades.

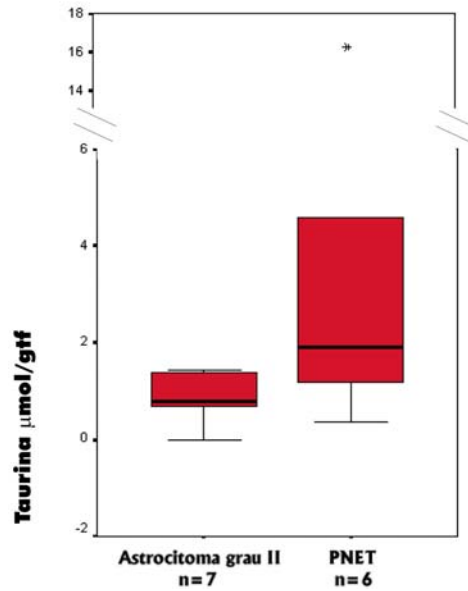


Figura 4.49: *Boxplot* dels valors de taurina ( $\mu\text{mol/gtf}$ ) per astrocitomes de grau II i PNETs. Detalls de la representació dels *boxplots* a la figura 4.9.

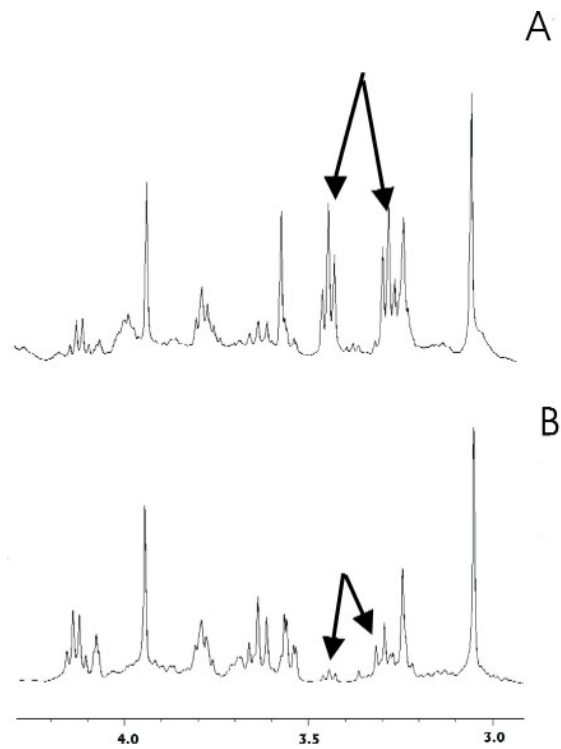


Figura 4.50: Fragments d'espectres  $^1\text{H}$  a 9,4T d'extractes PCA de biòpsies de A) pacient 96907, diagnosticat de PNET i B) pacient 192, diagnosticat d'astrocitoma grau II. Les fletxes apunten als pics de taurina, que han tingut valors de 16,28  $\mu\text{mol/gtf}$  en A i 1,43  $\mu\text{mol/gtf}$  en B.



La normalització dels valors dels metabòlits pel valor de proteïna no ha modificat aquest resultat ( $p=0,086$ ).

#### 4.3.2.4 RECONeixEMENT DE PATRONS *IN VITRO*

##### 4.3.2.4.1 PNET vs A2

L'anàlisi de les correlacions bivariades de les variables dels metabòlits en l'estudi de discriminació d'aquests dos tipus tumorals no ha resultat significatiu en cap cas, i cap valor de 'r' ha sobrepassat 0,4. L'intent d'anàlisi discriminant lineal amb aquests dos tipus tumorals ha resultat en que el programa SPSS, triant lliurement les variables, no ha considerat cap variable apta per a l'anàlisi. S'ha procedit, doncs, a la modalitat d'anàlisi on es força la inclusió de totes les variables (tots els metabòlits quantificats). Però d'aquesta manera es perd la natural tendència del programa de valorar les variables més importants. La figura 4.51 mostra el gràfic obtingut amb les puntuacions discriminants, separació visualment bona entre els dos grups. El percentatge d'encert va ser de 100% per a tots els casos i 46,2% per als casos per validació creuada, un percentatge força baix, molt possiblement resultat del nombre inadequat de variables en relació al grup amb un nombre més petit de casos.

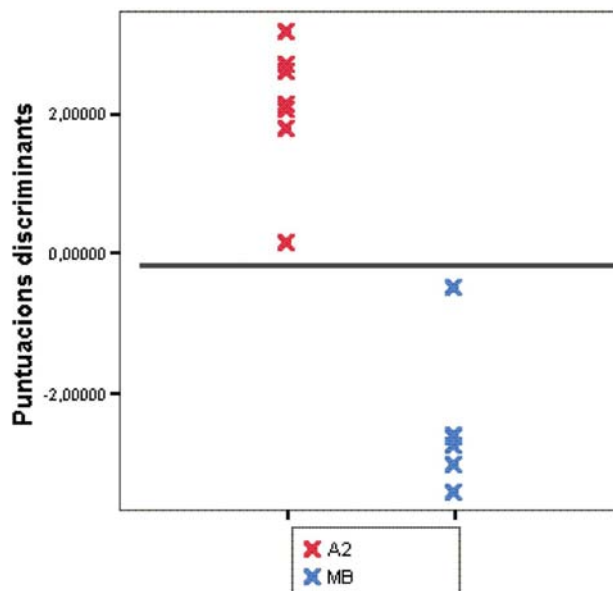


Figura 4.51: Representació obtinguda amb anàlisi discriminant lineal entre PNETs (mb) i astrocitomes de grau II (a2), *in vitro*. La línia entre els dos grups estableix un possible llinard per les puntuacions discriminants.

#### 4.3.2.4.2 Glioblastomes vs. metàstasis

Donat que hi havia significació estadística en les diferències per a les concentracions de taurina en glioblastomes i metàstasis, i donada la gran dificultat de separar aquests dos tipus tumorals, s'ha intentat una classificació per anàlisi discriminant lineal. L'anàlisi de correlacions bivariades presenta correlacions significatives per fosfocolina ( $p=0,05$  però un 'r' molt baix, de 0,239). Una anàlisi discriminant lineal deixant el programa amb lliure tria de variables resulta en la utilització dels valors de glutamina i taurina per a la discriminació amb un percentatge d'encert de 77,6% dels casos agrupats i 76,3% dels casos per LOO. Les puntuacions discriminants es mostren a la figura 4.52. Roda i col (2000) al seu treball també noten una tendència similar i la taurina fa part del classificador desenvolupat per aquests autors per a separació d'astrocitomes d'alt grau i metàstasis.

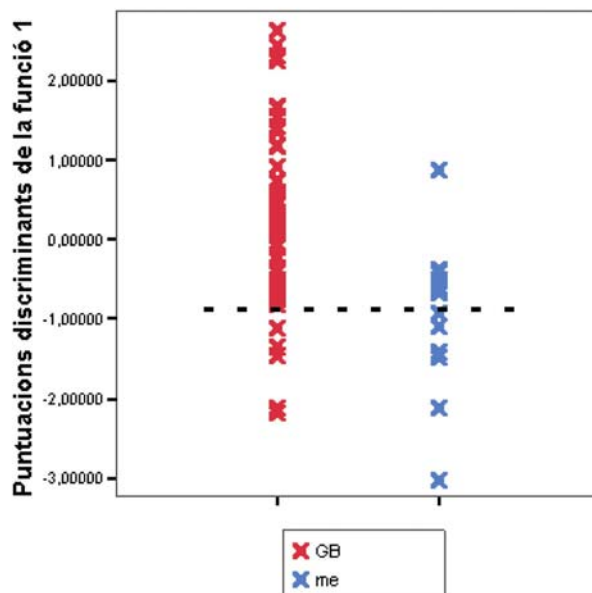


Figura 4.52: Representació obtinguda amb anàlisi discriminant lineal entre glioblastomes i metàstasis, *in vitro*. La línia entre els dos grups estableix un possible llindar per les puntuacions discriminants.