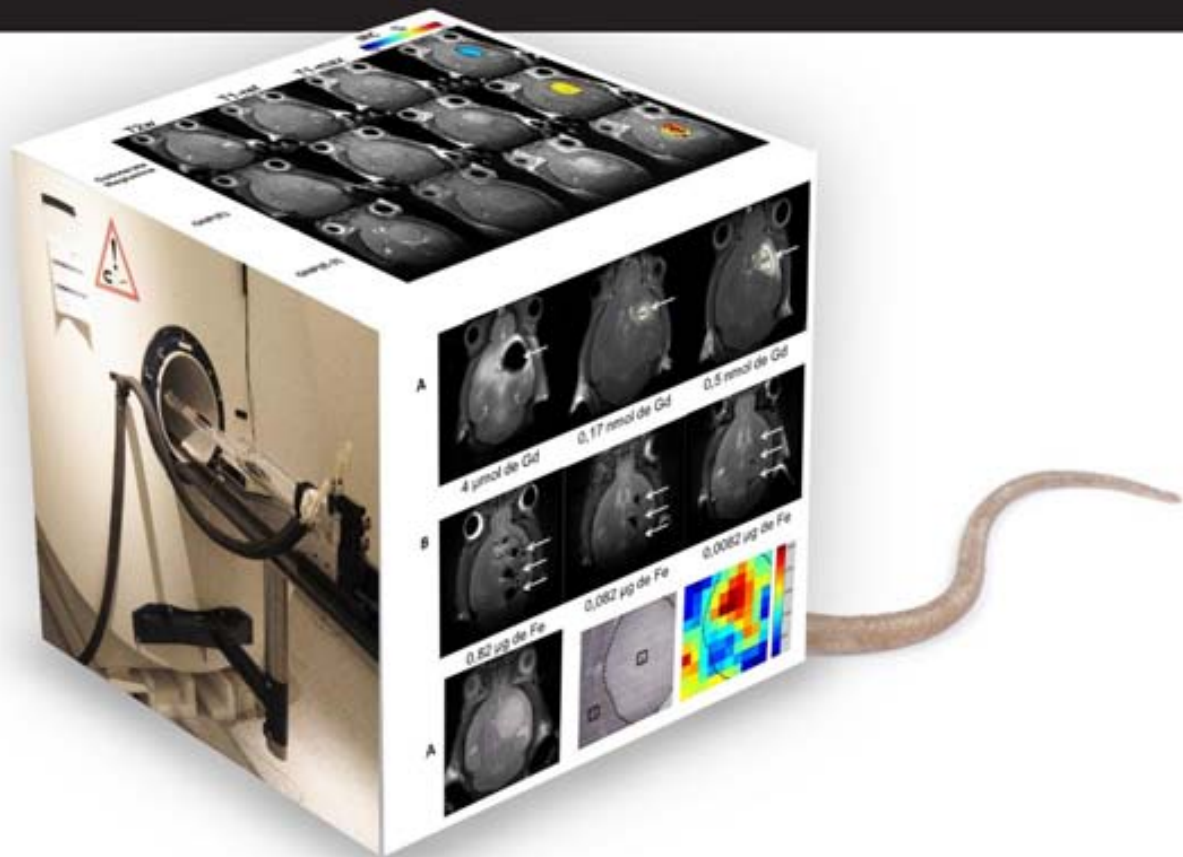




Universitat Autònoma de Barcelona

Mejora de los modelos preclínicos de tumores cerebrales. Aplicación a la caracterización ex vivo e in vivo de agentes de contraste nanoparticulados para imagen de resonancia magnética.



Milena Acosta González

*Septiembre de 2013
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona.*



Universitat Autònoma de Barcelona

Mejora de los modelos preclínicos de tumores cerebrales. Aplicación a la caracterización *ex vivo* e *in vivo* de agentes de contraste nanoparticulados para imagen de resonancia magnetica.

Milena Acosta González

Septiembre de 2013

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Universitat Autònoma de Barcelona.

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

Los abajo firmantes, Dr. Carles Arús Caraltó y la Dra. Ana Paula Candiota, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, certifican que la presente tesis ha sido realizada bajo su dirección por Milena Acosta González.

Firmado: Dr. Carles Arús Caraltó

Firmado: Dra. Ana Paula Candiota

Firmado: Milena Acosta González

Cerdanyola del Vallès, 26 de Septiembre de 2013.

*A mi familia por enseñarme a
soñar.*

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Carles Arús, por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y de esta manera realizar este trabajo bajo su dirección; por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de este, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años, por contribuir en mi crecimiento no solo científico sino personal.

A Ana Paula Candiota por su apoyo y confianza en mi trabajo, su disponibilidad y paciencia a lo largo de los años que he estado en el grupo.

A todos los compañeros del GABRMN por hacer más ameno el día a día en el laboratorio. A Margarida Julià-Sapé, por darme siempre ánimos y por facilitarme la ayuda necesaria para resolver los problemas que se me presentaron. A Teresa mi incondicional amiga, por todo sus conocimientos, porque darme la certeza de saber que siempre podré contar con ella, por enseñarme tantas cosas no solo a nivel científico sino a nivel personal, porque muchas de estas páginas estarían vacías si no hubiera sido por su constante dedicación y ayuda. Gracias de todo corazón. A Elena Jiménez por haber sido el punto de unión del grupo, por su increíble bondad, por su capacidad de ver siempre el lado bueno de las cosas, por su buen sentido del humor, por todos los buenos momentos compartidos, por su apoyo incondicional y por su desinteresada amistad. A Myriam Dávila, por todas las tardes de charlas existenciales, por sus oportunos consejos, por su increíble capacidad de estar siempre que la necesite, por su apoyo, su simpatía y buen humor y por su amistad. A Alina por su maravillosa sinceridad, por su transparencia, por ayudarme a resolver cada uno de los problemas en los que necesite su ayuda, por escucharme, y por lograr sacarme una sonrisa hasta en los momentos más difíciles. A Magda, por su indispensable ayuda, por su buen sentido del humor, por su apoyo y por todos los momentos compartidos. Y a todos los que estuvieron en el grupo y que

pusieron un granito de arena para que este trabajo fuera posible: Silvia Ferrer, Oscar Tibaduiza, Edgar Villarraga, Iván Olier, Sandra Ortega, Alexander Pérez, y Josep Alemany, ha sido un placer conocerlos y compartir buenos momentos dentro y fuera del trabajo.

A los miembros del *Servei de Ressonància Magnètica Nuclear* de la UAB, en especial Silvia Lope, por su paciencia, sabiduría, esfuerzo y dedicación. Por las charlas tan amenas que mantuvimos no solo a nivel científico sino a nivel personal, a Miquel Cabañas, por su increíble capacidad de solucionar cualquier problema y por su sentido del humor.

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

A Martí Pumarola, por colaboración e interés en el desarrollo de este trabajo y su asesoramiento con el diagnóstico histopatológico y a Ester Blasco, por todo el trabajo realizado.

A la gente del *Departamento de Bioquímica i Biologia Molecular* : Helena Carbó y Salvador Bartolomé por estar siempre dispuestos a colobaorarme cuando lo necesite,

A Pep Canals y Cristina Herranz del Grupo de Cèl·lules Mare i Medicina Regenerativa de la Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona-IDIBAPS, por su estrecha colaboración en una parte importante de este trabajo y por su ayuda y disposición.

A Sergio, Emanuel, Jhon, Gio, Barbara, Pablo, Ches, Juancarlos, Giovanni, Jean Philippe, Kate, Julio, Leire, Ruth, Maltita que siempre estuvieron a mi lado para

ayudarme, escucharme, aconsejarme y en muchas ocasiones guiarme, gracias por su infinita paciencia y su amistad incondicional.

A mi maravillosa familia por su infinito amor, por la confianza, el apoyo incondicional, por creer en mí, por enseñarme a ser libre, por enseñarme a luchar por lo que quiero, por sus consejos. Sin ustedes hubiera sido imposible realizar este doctorado,

Por ultimo quiero agradecer a todas las personas que de alguna u otra forma colaboraron durante todo este proceso, que compartieron charlas conocimientos y diversión para llevar a cabo este proyecto.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE ECUACIONES	xviii
INDICE DE TABLAS.....	xix
ABREVIATURAS.....	xx
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	1
1.1.1 Historia	1
1.1.2 Fundamentos físicos y conceptos básicos.....	2
1.1.3 Aplicaciones biomédicas de la RMN	8
1.1.3.1 Imagen de resonancia magnética (IRM).....	8
1.1.3.2 Espectroscopía de resonancia magnética (ERM).....	16
1.1.3.3 Imagen espectroscópica de resonancia magnética (IERM).....	21
1.2 TUMORES CEREBRALES	24
1.2.1 Epidemiología, clasificación y etiología	24
1.2.2 Diagnóstico.....	27
1.3 AGENTES DE CONTRASTE	38
1.2.3 Modelos animales de la patología tumoral cerebral	44
2. OBJETIVO GENERAL.....	55
3. CAPITULO 1: DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS COLONIASDE “GENETICALLY ENGINEERED MICE” (GEM) ACCESIBLES AL GABRMN.	56
3.1 SUB OBJETIVOS	56
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
3.2.1 Caracterización genotípica.....	57
3.2.1.1 Identificación de los animales y obtención de las muestras.....	57
3.2.1.2 Extracción de ADN	58
3.2.1.3 Amplificación del ADN	59
3.2.1.3.1. Protocolo de amplificación y PCR del gen constitutivo	61
3.2.1.4 Electroforesis.....	61
3.2.2 Estudio piloto de caracterización de la colonia GEM.....	64

3.2.2.1 Estudios por resonancia magnética (IRM/ERM/IERM)	65
3.2.2.1.1 Estudios por IRM	67
3.2.2.1.2 Estudios por ERM	68
3.2.2.1.3 Estudios por IERM	70
ANÁLISIS DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES	74
Clasificadores de animales GEM, mediante IERM-PM con glucosa.....	77
3.2.3 Estudios histopatológicos.....	78
3.3 RESULTADOS.....	78
3.3.1 Identificación genotípica.....	78
3.3.2 Estudios por RMN	82
3.3.2.1 Estudios por IRM, ERM, IERM durante el protocolo piloto.....	85
3.3.4. Estudios de integridad de la BHE (administración y captación de contraste).....	109
3.3.5 Resumen de los Estudios histopatológicos	114
3.4 DISCUSIÓN	117
3.5 Conclusiones relativas al estudio y caracterización de las colonias GEM	125
4. CAPITULO 2: INTENTO DE GENERACIÓN DE UN MODELO TRANSPLANTABLE DE TUMOR CEREBRAL MURINO DE GRADO BAJO.	128
.....	
4.1 OBJETIVO	128
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	128
4.2.1 Cultivos celulares-células GL261	128
4.2.2 Ratones C57BL/6.....	130
4.2.3 Modelo ortotópico de GBM murino.....	131
4.2.4 Puesta a punto del modelo: Generación de tumores cerebrales a partir de gliosferas obtenidas a partir de tumores GL261	133
4.2.4.1 Gliosferas producidas a partir de tumores GL261 en fresco	133
4.2.4.1.1 Disgregación del tumor y generación de gliosferas	134
4.2.4.1.2 Gliosferas producidas a partir de tumores GL261 congelados.....	135
4.2.4.2 Generación de una línea de tumores transplantables a partir de gliosferas generadas a partir de un tumor GEM de bajo grado.....	136
4.2.5 Estudios por IRM/ERM/IERM.....	137
4.2.6 Estudios histopatológicos.....	139
4.3. RESULTADOS.....	140

4.3.1 Cultivos celulares: curva de crecimiento de las células GL261	140
4.3.2 Generación de tumores a partir de células GL261	141
4.3.3 Generación de tumores a partir de gliosferas obtenidas de tumores GL261143	
4.3.3.1 Generación de tumores a partir de gliosferas de tumores congelados GL261	146
4.3.3.2 Producción de tumores transplantables a partir de gliosferas generadas con el tumor GEM S912	149
4.3.3.2.1. Detección de masa tumoral anómala en el animal S912.....	149
4.3.3.2.2 Tumores generados a partir de gliosferas obtenidas con el tumor GEM S912.....	155
4.3.4 Estudios de integridad de la BHE (administración de contraste)	163
4.3.4 Estudios por ERM	167
4.3.5 Estudios por IERM	174
4.3.6 Estudios histopatológicos.....	177
4.3.7 Clasificadores de animales generados a partir de gliosferas del animal GEM S912, mediante IERM-PM con glucosa	180
4.4 DISCUSIÓN	182
4.5 Conclusiones relativas al capítulo del intento de establecimiento de una línea transplantable de bajo grado a partir de un tumor GEM	186
5. CAPÍTULO 3: DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA EVALUAR EL POTENCIAL DE NANOPARTICULAS COMO AGENTES DE CONTRASTE <i>IN</i> <i>VIVO</i>.....	188
5.1 OBJETIVOS.....	188
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	188
5.2.1 Síntesis de agentes de contraste	188
5.2.1.1 Agentes de contraste positivo.....	188
5.2.1.2 Agentes de contraste negativos.....	191
5.2.2 Estudios de relajatividad <i>in vitro</i>	192
5.2.2.1 Estudios a 1,4 T	192
5.2.2.2 Estudios a 7T	193
5.2.3 Modelos animales	195
5.2.4 Estudios por IRM	196
5.2.4.1 Estudios <i>ex vivo</i>	196
5.2.4.2 Puesta a punto de las cantidades de AC convenientes para los estudios <i>ex vivo</i>	196

5.2.4.3. Puesta a punto del método de tres puntos de inyección:	199
5.2.4.4 Estudios <i>in vivo</i>	199
5.2.5 Post procesamiento	200
5.2.7 Estudios de Biodistribución	203
5.3 RESULTADOS.....	205
5.3.1 Estudios de relajatividad <i>in vitro</i>	205
5.3.2 Análisis de IRC en los estudios <i>ex vivo</i>	206
5.3.2.1 Puesta a punto de la cantidad óptima de AC	206
5.3.2.2 Puesta a punto en los experimentos <i>post-mortem</i> de los 3 puntos de inyección	208
5.3.3 Estudios de IRM <i>in vivo</i>	212
5.3.4 Estudios de biodistribución	217
5.4 DISCUSIÓN	222
5.5 Conclusiones relativas al Capítulo de desarrollo de un metodo <i>ex vivo</i> de evaluación de nuevos agentes de contraste.	231
6. DISCUSIÓN GENERAL	233
7. CONCLUSIONES GLOBALES.....	238
8. REFERENCIAS.....	¡Error! Marcador no definido.
ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Población de espines con distintas orientaciones espaciales, tras verse sometidos a un campo magnético. Caso del ^1H , que puede ocupar dos niveles energéticos diferentes (estados de espin, ms) tras experimentar un campo magnético distinto de cero.	4
Figura 1.2: Población de espines con distintas orientaciones espaciales, tras verse sometidos a un campo magnético. Caso del ^1H , que puede ocupar dos niveles energéticos diferentes (estados de espin, ms) tras experimentar un campo magnético distinto de cero.	6
Figura 1.3: Esquema de la transformación de la FID (dominio del tiempo) registrada en un experimento de RMN, en un espectro (dominio de la frecuencia), tras la aplicación de la transformada de Fourier.	7
Figura 1.4: Diagrama de una de las estrategias de selección de un voxel de excitación determinado dentro del tejido explorado por RMN, mediante el uso de tres gradientes ortogonales en el espacio.	9
Figura 1.5: Imágenes en el plano axial del encéfalo de un paciente afectado por una metástasis en el lóbulo frontal derecho. La imagen ponderada en T1 (A) imagen ponderada en T2 (B) y la figura C muestra un corte en el plano axial a un nivel inferior que A y B de un encéfalo normal ponderado en densidad.	10
Figura 1.6: Gráfico que representa la recuperación de la magnetización longitudinal de una sustancia a lo largo del tiempo.	12
Figura 1.7: Gráfico que representa la pérdida de magnetización transversal en función del tiempo.	13

Figura 1.8: Imágenes de IRM SE ponderadas en T1 en plano axial de un tumor cerebral humano, antes (A) y después (B) de la administración de un agente de contraste basado en Gadolinio	15
Figura 1.9: Posición que ocupan los protones en el espectro de una muestra según su entorno químico, dentro del rango de 0 a 12 ppm.....	18
Figura 1.10: Espectros adquiridos con el metodo PRESS y un TE 12 ms <i>in vivo</i> a 7T en un glo,a inducido por inoculación de células GL261 en el cerebro de un ratón	20
Figura 1.11: Bandas de saturación del volumen externo utilizadas para delimitar el VOI en una secuencia de IERM adquirida en parénquima cerebral normal de ratón C57BL/6 a 7 Teslas. Parte inferior derecha grid de adquisición con los espectros individuales y a la izquierda se representa un espectro representativo con las resonancias principales	22
Figura 1.12: Tasa de incidencia de los tumores cerebrales en mujeres (imagen superior) y hombres (imagen inferior) a nivel mundial estimada por GLOBOCAN	24
Figura 1.13: Imagen de RM ponderada en T2 y adquirida en el plano axial de un paciente afectado por una lesión hiperintensa en la región occipito-parietal del cerebro. Corte axial adquirido con el método FLAIR en un paciente afectado por esclerosis múltiple	28
Figura 1.14: A) Espectro de 1H de materia blanca de un voluntario sano. B) Espectro adquirido con los mismos parámetros que en A) en un GBM.....	32
Figura 1.15: Estudio por IERM de un glioma difuso de tronco cerebral en un niño. En la parte superior se muestran los cuatro cortes de IRM en los que se ha adquirido la secuencia de IERM con el grid en el VOI de adquisición. En la parte inferior grid conteniendo todos los espectros individuales adquiridos en el VOI. A la derecha se muestran tres espectros individuales extraídos de diferentes regiones espaciales de	

uno de los grids: A y B) Espectros adquirido en regiones de tejido normal; C) Espectro adquirido en el tumor.	35
Figura 1.16: Pantalla de la DSS (Decision Support System) v.3.0.1 de INTERPRET donde se muestra un ejemplo de clasificación de un espectro de glioblastoma. En la pantalla de la izquierda se observa el universo de la interficie con tres de los tipos tumorales principales de los que se obtuvieron casos en INTERPRET.....	37
Figura 1.17: Representación esquemática de las principales categorías de modelos preclínicos en uso. Los modelos in situ pueden ser subcategorizados por el método de inducción del tumor.....	45
Figura 3.1: Esquema de la forma en que se hicieron las marcas para la identificación de los ratones.....	57
Figura 3.2: Gel de electroforesis con los productos de PCR de las colonias G, N y S.. ..	61
Figura 3.3: Genotipado de colonias Ry P. A la izquierda se observa el marcador de peso molecular y el número (band size) se refiere al número de bp. El gen constitutivo tubulina corresponde a la banda de 120bp y está presente en todas las muestras.....	62
Figura 3.4: A la derecha visión general del montaje de una ratón en el biospec 70/30, a la izquierda detalle de la cama y la sonda.....	65
Figura 3.5: Ejemplo de imagen de alta resolución ponderada en T2. Espectros a TEC y TEL adquiridos a 12 y 136 ms respectivamente, en el rango de 0 a 4 ppm con algunos de los metabolitos más representativos señalados.....	68
Figura 3.6: VOI seleccionado sobre una imagen T2w-HR de referencia de una animal con un tumor GL261. Ampliación del VOI con los 100 espectros adquiridos en su interior. Patrones espectrales SV extraídos de los voxels señalados en el grid que se muestra en la parte superior de la imagen.....	70

Figura 3.7: Bandas de saturación colocadas alrededor del VOI en las secuencias de IERM utilizadas para minimizar el efecto de las señales del tejido exterior. localización del VOI en los planos coronal, sagital y axial del cerebro del ratón.....	71
Figura 3.8: Esquema de la estrategia de post-procesamiento utilizada para generar mapas codificados en color para la intensidad de metabolitos concretos, y espectros promedio a partir de las secuencias de IERM adquiridas.....	73
FIGURA 3.9: A la izquierda, imagen T_{2w} HR de referencia para secuencias de IERM; a la derecha ampliación del VOI a partir del cual se adquieren los espectros de interés.....	74
Figura 3.10: Mapas nosológicos extraídos de un sistema de clasificación para tumores de animales GEM.....	76
Figura 3.11: Total de animales genotipados en la colonia S, en el período entre 2006 y 2012 y su distribución genotípica.....	79
Figura 3.12: Total de genotipados en la colonia P en el período entre 2009 y 2012, y su distribución genotípica.	79
Figura 3.13: Total de animales genotipados en la colonia R en el período entre 2010 y 2012, y su distribución genotípica.....	80
Figura 3.14: Total de genotipados en la colonia N en el período entre 2006 y 2009, y su distribución genotípica.	80
Figura 3.15: Total de genotipados en la colonia G en el período entre 2006 y 2009, y su distribución genotípica.	81
Figura 3.16: Síntomas presentados por las colonias S, P y R durante las revisiones hechas por los veterinarios y promedio de edad.....	83
Figura 3.17: Principales genotipos de los animales explorados en las diferentes colonias, durante el protocolo piloto.....	85

Figura 3.18: Espectros SV a TEC y TEL adquiridos en un tumor GL261 estándar.....	87
Figura 3.19: IRM de alta resolución ponderada enT2 en orientación axial del cerebro del animal N34. Seguimiento de la progresión volumétrica tumoral. Volúmenes expresados en mm3. Imagen de alta resolución ponderada en T2 del animal N34, 36 días después de la detección de la masa tumoral.....	90
Figura 3.20: IRM de alta resolución ponderada en T2 en orientación axial del cerebro del animal G91. Seguimiento de la progresión volumétrica tumoral. Volúmenes expresados en mm3. Imagen de alta resolución ponderada en T2 del animal G91, 57 días después de la detección de la masa tumoral.....	92
Figura 3.21: IRM de alta resolución ponderada enT2 en orientación axial del cerebro del animal R371. Voxel utilizado en los estudios ERM, espectros a TEC y TEL adquiridos a 12 y 136 ms respectivamente, en el rango de 0 a 4 ppm.....	94
Figura 3.22: VOI de adquisición para las secuencias IERM (12ms TE) superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T2W HR) en el animal R371. El VOI a mayor aumento se muestra en el centro y la línea punteada negra marca el límite tentativo de la zona anómala. Mapa en escala de color de la intensidad de DMSO detectada en el VOI 88 minutos tras su administración.....	96
Figura 3.23: IRM de alta resolución ponderada enT2 en orientación axial del cerebro del animal P176, adquirida a 7T. Imagen de alta resolución ponderada en T2	98
Figura 3.24: VOI de adquisición para la secuencia IERM del animal P176. VOI a mayor aumento. Mapas en escala de color de la intensidad de D-Glucosa a TEC 12ms tras.	99
Figura 3.25: Mapa nosológicos extraídos de un sistema de clasificación para el tumor del animal P176	99
Figura 3.26: IRM de alta resolución ponderada en T2 en orientación axial del cerebro del animal S885. Seguimiento de la progresión volumétrica tumoral expresados en	

mm3. Imagen de alta resolución ponderada en T2, 38 días después de la detección de la masa tumoral. Espectros a TEC y TEL adquiridos a 12 y 136 ms respectivamente, en el rango de 0 a 4 ppm..... 101

Figura 3.27: VOI de adquisición para las secuencias IERM (12ms TE) superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T2W HR) en el animal S885. VOI a mayor aumento se muestra en el centro, y la línea punteada negra marca el límite del tumor. Mapa en escala de color de la intensidad de DMSO detectada en el VOI 88 minutos tras su administración. Al lado, imagen ponderada en T2 20 días después del estudio de DMSO..... 103

Figura 3.28: IRM de alta resolución ponderada en T2 en orientación axial del cerebro del animal S910. Seguimiento de la progresión volumétrica tumoral expresados en mm3. Imagen de alta resolución ponderada en T2, 11 días después de la detección de la masa tumoral. Espectros a TEC y TEL adquiridos a 12 y 136 ms respectivamente, en el rango de 0 a 4 ppm..... 105

Figura 3.29: VOI de adquisición para las secuencias IERM (12ms TE) superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T2W HR) en el animal S910. VOI a mayor aumento se muestra en el centro, y la línea punteada negra marca el límite del tumor. Mapa en escala de color de la intensidad de DMSO detectada en el VOI 88 minutos tras su administración. Al lado, imagen ponderada en T2 31 días después del estudio de DMSO..... 107

Figura 3.30: Mapa nosológicos extraídos de un sistema de clasificación para el tumor del animal S910..... 107

Figura 3.31: Porcentaje de animales totales estudiados que presentan comprometimiento de la BHE 109

Figura 3.32: IRM ponderada en T1 (pre- y post- administración de contraste de contraste, así como la substracción de dichas imágenes en orientación axial del cerebro del animal R279, adquirida a 7T	110
Figura 3.33: IRM ponderada en T1 (pre- y post- administración de contraste de contraste, así como la substracción de dichas imágenes en orientación axial del cerebro del animal S885, adquirida a 7T.....	111
Figura 3.34: IRM ponderada en T1 (pre- y post- administración de contraste de contraste, así como la substracción de dichas imágenes en orientación axial del cerebro del animal S910, adquirida a 7T.....	111
Figura 3.35: IRM ponderada en T1 (pre- y post- administración de contraste de contraste, así como la substracción de dichas imágenes en orientación axial del cerebro del animal S851, adquirida a 7T.....	112
Figura 3.36: Distribución de los diagnósticos encontrados en los estudios histopatológicos. A) Colonia N y B) Colonia G.	113
Figura 3.37: Distribución de las diferentes patologías encontradas en los estudios histopatológicos. A) Colonia P y B) Colonia R.....	115
Figura 3.38: A) Total de animales que presentaron tumor o lesión. B) Distribución de las diferentes patologías encontradas en los estudios histopatológicos en la colonia S.	115
Figura 4.1: Imagen general del sistema de inyección estereotáctico utilizado para inocular células GL261 en el estriado de los ratones C57BL/6..	131
Figura 4.2: Imagen de gliosferas generadas a partir de tumores GL261 en fresco...	132
Figura 4.3: Esquema del cálculo del volumen tumoral en las imágenes T _{2w} -HR.....	136
Figura 4.4: Curva de crecimiento de las células GL261..	139

Figura 4.5: IRM ponderada en T_2 (T_{2w} –HR) en orientación axial del cerebro del animal C482, adquirida a 7T a distintos días post-implantación.....	140
Figura 4.6: Curva de evolución del crecimiento de tumores GL261 en 6 animales....	140
Figura 4.7: IRM ponderada en T_2 de alta resolución en orientación axial del cerebro de los animales C453 y C497, adquirida a 7T a distintos días post-implantación.....	141
Figura 4.8: Seguimiento de la progresión en tumores generados a partir de gliosferas de tumores GL261 disgregadas en fresco a diferentes días post-implantación. <i>Bloplot</i> de la comparación de la evolución del crecimiento de tumores generados a partir de células GL261.....	142
Figura 4.9: IRM ponderada en T_2 de alta resolución en orientación axial del cerebro de los animales C594 y C596, adquirida a 7T a distintos días post-implantación.....	144
Figura 4.10: Seguimiento de la progresión en tumores generados a partir de gliosferas de tumores GL261 congeladas, a diferentes días post-implantación. <i>Bloplot</i> de la comparación de la evolución del crecimiento de tumores generados a partir de células GL261.....	145
Figura 4.11: Seguimiento por IRM de la progresión tumoral del animal S912 a diferentes días desde la detección de la masa hasta el sacrificio del animal, 62 días después de detectar la masa tumoral. Imagen ponderada en T_2 de alta resolución en orientación axial del animal S912 en el momento de la detección inicial de la masa tumoral anómala.....	147
Figura 4.12: Seguimiento de la progresión volumétrica tumoral del animal S912 desde el día de la detección de la masa tumoral hasta el día de sacrificio del animal.....	148
Figura 4.13: IRM ponderada en T_1 , (pre- y post- administración de contraste, así como la sustracción de dichas imágenes “resta”) en orientación axial del cerebro del animal S912, adquirida a 7T.....	148

Figura 4.14: VOI de adquisición para las secuencias IERM (12ms TE) superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T_{2W} HR) en el animal S912, 30 días después de la detección del tumor. VOI a mayor aumento, la línea punteada blanca marca el límite del tumor. Mapa en escala de color codificando la diferencia en relación al patrón pre-perturbación de la señal de DMSO detectada. Espectros de las regiones marcadas como 1 (parénquima peritumoral/normal), 2 (tejido tumoral) y 3 (parénquima peritumoral)	150
Figura 4.15: VOI de adquisición para la secuencia IERM (12ms TE) superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T_{2W} HR) en el animal S912. VOI a mayor aumento, la línea punteada blanca marca el límite del tumor. Mapa en escala de color de la intensidad de D-Glucosa a TEC.	151
Figura 4.16: Seguimiento de la progresión volumétrica tumoral en el animal G1-S912 perteneciente al grupo 1 “Crecimiento normal”. IRM ponderada en T_2 en orientación axial adquirida a 7T a distintos días post-implantación.	153
Figura 4.17: Seguimiento de la progresión tumoral volumétrica a diferentes días post-implantación de las gliosferas para animales del grupo 1. Curva de evolución conjunta del crecimiento de tumores generados a partir de gliosferas obtenidas a partir del tumor GEM S912.	154
Figura 4.18: Seguimiento de la progresión volumétrica tumoral en el animal G10-S912 perteneciente al grupo 2. IRM ponderada en T_2 en orientación axial adquirida a 7T a distintos días post-implantación.	156
Figura 4.19: Seguimiento de la progresión tumoral volumétrica a diferentes días post-implantación, para animales del grupo 2. Curva de evolución conjunta del crecimiento de tumores generados a partir de gliosferas obtenidas a partir del tumor GEM S912 (grupo 2).....	157

Figura 4.20: Evolución tumoral volumétrica a partir del día en que se observa la masa tumoral por primera vez para animales del grupo 1 (en negro) y el grupo 2 (en rojo).	158
Figura 4.21: Curvas de Kaplan-meier de supervivencia promedio.	160
Figura 4.22: Porcentaje de animales con la BHE comprometida observada a lo largo de las exploraciones IRM.	162
Figura 4.23: IRM ponderada en T_1 (pre- y post- administración de contraste, así como la substracción de dichas imágenes, en orientación axial del cerebro del animal G2-S912, adquirida a 7T	162
Figura 4.24: Porcentaje de desarrollo de tumores en los 30 animales implantados con gliosferas generadas a partir del tumor GEM S912.	163
Figura 4.25: Izquierda, imagen de alta resolución ponderada en T_2 del animal G1-S912, a 18 días post implantación. Espectros A) TEC adquirido a 12 ms, B) TEL adquirido a 136 ms, en el rango de 0 a 4 ppm.	165
Figura 4.26: Izquierda, imagen de alta resolución ponderada en T_2 del animal G1-S912, a 39 días post implantación. Espectros A) TEC adquirido a 12 ms, B) TEL adquirido a 136 ms, en el rango de 0 a 4,5 ppm.	166
Figura 4.27: Espectros promedio a TEC y TEL obtenidos de los tumores generados a partir de gliosferas obtenidas del tumor GEM S912 en los estudios de ERM 18, 21 y 40 días post implantación.	170
Figura 4.28: Espectros promedio a TEC y TEL obtenidos de tejido tumoral en los estudios de ERM.	170
Figura 4.29: VOI de adquisición para las secuencias IERM (14ms TEC) superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T_{2w} HR) en el animal G1-S912. VOI a mayor aumento: la línea punteada negra marca el límite tentativo de la zona anómala. Mapa en escala de color codificando el cociente entre el patrón pre y post perturbación de la	

señal de DMSO detectada en el VOI 88 minutos tras su administración. D) Espectros de las regiones marcadas como 1 (parénquima no afectado/normal) y 2 (tejido anómalo).....	171
Figura 4.30: VOI de adquisición para las secuencias IERM (12ms TEC) superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T_{2W} HR) en el animal G1-S912. VOI a mayor aumento, la línea punteada negra marca el límite tentativo de la zona anómala. Mapa en escala de color de la intensidad de D-Glucosa a TEC 12ms y TEL 136ms.....	172
Figura 4.31: Arriba imagen T_{2W} -HR del animal G2-S912 a 43 días post-implantación en orientación axial. Abajo, las diferentes tinciones realizadas con el tejido.....	175
Figura 4.31: Mapa nosológicos extraídos de un sistema de clasificación para el tumor del animal G2-S912.....	177
Figura 5.1: Representación esquemática del quelato de Gd y brazos de sacáridos contenidos en las (GNPs) estudiadas en esta tesis..	186
Figura 5.2: Ensayos de puesta a punto con diferentes cantidades de AC en los ensayos <i>ex vivo</i> . AC positivos y negativos.....	203
Figura 5.3: <i>Boxplot</i> con la comparación de la intensidad de señal detectada en las imágenes MRI ponderadas en T_2 para cada concentración utilizada de los agentes comerciales Endorem y Ferumoxtran -10.	204
Figura 5.4: Imágenes ponderadas en T_1 , con el agente de contraste gadoterato de Meglumina. Un punto de inyección y tres puntos de inyección por animal.	205
Figura 5.5: Imagen representativa ponderada en T_1 y ejemplo de los ROIs utilizados con la GNP (E). Expansión de la región central, <i>Boxplot</i> del incremento relativo de contraste para la solución salina, gadoterato de meglumina (G.M.) y las diferentes GNPs.....	207

Figura 5.6: Imagen representativa ponderada en T_2 y ejemplo de los ROIs usados para la disminución de señal de los SPION. Expansión de la región central, <i>Bloxplot</i> de la variación de contraste para los SPIONs.....	208
Figura 5.7: Imágenes representativas axiales ponderadas en T_{2w} , imagen ponderada en $T_1(T_1\text{-ref})$ antes y después de la administración de contraste y en el punto máximo de captación de contraste ($T_1\text{-max}$), y mapas codificados en color para el IRC de 3 animales inoculados con células GL261.....	210
Figura 5.8: Series temporales obtenidas a partir de la cuantificación de las imágenes DCE. Las curvas muestran el incremento de contraste promedio obtenido para cada grupo experimental. Gadoterato de meglumina; GNP(E). Gadoterato de meglumina; GNP(E_2). Los círculos corresponden a los valores medidos en los tumores, mientras los triángulos corresponden a la zona contralateral.....	211
Figura 5.9: Imágenes ponderadas en T_1 , superpuestas con mapas de color de K_{ep} en tres ratones portadores de glioma GL261. Gadoterato de meglumina, GNP(E) y GNP(E_2). <i>Bloxplot</i> de comparación de los valores de K_{ep} (min^{-1}) obtenidos con todos los pixels de los animales estudiados.....	213
Figura 5.10: Biodistribución por ICP-MS de Oro (Au), 24 horas post-administración para GNP(E) y GNP(E_2). Los recuadros en cada gráfico muestran la acumulación de Au en el tumor, comparada con las concentraciones de plasma y el parénquima contralateral	215
Figura 5.11: Biodistribución evaluada por IRM y ICP-MS de la GNP(E). Imagen ponderada en T_1 del cuerpo de uno de los animales estudiados. Antes de la inyección de la GNP(E), 1 hora después de la administración y 48 horas después de la administración.....	217

Figura 5.12: Porcentaje de Au y Gd detectados en el hígado para la GNP(E) correspondiente a las 24h post-administración y para la GNP(E_2) 48h post-administración.....	217
Figura 5.13: <i>Bloplot</i> de la comparación del valor IRC obtenido en los resultados <i>ex vivo</i> y estudios <i>in vivo</i> en el tiempo máximo T ₁ -max para cada agente de contraste estudiado.....	224
Figura 5.14: Bloxplot de la comparación del valor IRC obtenido en los resultados <i>ex vivo</i> y estudios <i>in vivo</i> a 3 min después de la inyección de AC, para cada agente de contraste estudiado	225

INDICE DE ECUACIONES

eq. 1.1	Momento magnético de un núcleo	3
eq. 1.2	Frecuencia de precesión de Larmor.....	3
eq. 1.3	Energía desprendida por los núcleos sometidos a B_0 tras la aplicación de una RF.....	5
eq. 1.4	Desplazamiento químico.....	17
eq. 1.5	Cociente señal/ruido	19
eq. 4.1	Contaje de células GL261 por flascón.....	128
eq. 4.2	Resuspensión de células GL261 para la implantación	129
eq. 5.1	Cálculo del incremento relativo de contraste.....	197
eq. 5.2	Modelo de Hoffmann-Brix	198

INDICE DE TABLAS

Tabla 3.1: Principales metabolitos estudiados y sus desplazamientos químicos	68
Tabla 3.2: Número total de animales genotipados.....	78
Tabla 3.3: Número de animales explorados por IRM/ERM de las colonias S,N y G...	82
Tabla 3.4: Número total de animales de las colonias S, R y P.....	85
Tabla 3.5: Promedio de los cocientes de las alturas de los principales metabolitos	89
Tabla 3.6: Número animales explorados por IRM/ERM de las colonias S,P y R.....	108
Tabla 4.1: Número de animales asignados a cada grupo de crecimiento	152
Tabla 4.2: Promedio de cocientes de las alturas de los principales metabolitos	167
Tabla 4.3: Diagnóstico histopatológico.....	174
Tabla 4.4: Resultados caracterizacion genotipica del animal S912 y animales generados a partir de este.....	176
Tabla 5.1: Gliconopartículas estudiadas como potenciales agentes de contraste	187
Tabla 4.2: SPION estudiados como potenciales agentes de contraste	195
Tabla 4.3: Descripción de los estudios de biodistribución.....	200
Tabla 4.4 Valores obtenidos para % IRC ex vivo, % IRC <i>in vivo</i> a T1-max a 3 min T1-max, A*kep y IAUC valores obtenidos de 3 AC estudiados <i>in vivo</i>	214

ABREVIATURAS

AC	Agente de contraste
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
ASCII	<i>American standard code for information interchange</i>
A K_{ep}	Constante de la tasa de lavado entre el espacio extracelular y el plasma
AUC	<i>Area under the curve</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
B₀	Campo magnético principal
BHE	Barrera hematoencefálica
CBATEG	<i>Centre de Biotecnologia Animal i de Teràpia Gènica</i>
CSI	<i>Chemical shift imaging</i>
CHESS	<i>Chemical shift selective</i>
DCE	<i>Dynamic contrast enhancement</i>
DMEM	Medio de cultivo modificado por Dulbecco
DMPM	<i>Dynamic MRSI processing module</i>

DMSA	Ácido dimercaptosuccínico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSS	<i>Decision support system</i>
EGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial
EPI	<i>Echo planar imaging</i>
ERM	Espectroscopía de resonancia magnética
FASTMAP	<i>Fast Automatic Shimming Technique by Mapping Along Projections</i>
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FLAIR	<i>Fluid attenuated inversion recovery</i>
FID	<i>Free induction decay</i>
FOV	<i>Field of view</i>
GAP	Espacio entre cortes
GBM	Glioblastoma multiforme
Gd-DTPA	Gadopentato dimeglumine
GEM	<i>Genetically engineered mice</i>
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
GLUT	<i>Glucose transporter</i>
GRE	<i>Gradient echo</i>

GNP	Gliconanopartícula
HEPES	Ácido hidroxietil – piperazina 1 - etanosulfónico
HR	<i>High resolution</i>
IAUC	<i>Initial area under the curve</i>
ICP-MS	<i>Induced Coupled Plasma-Mass Spectrometry</i>
IDL	<i>Interface description language</i>
IERM	Imagen espectroscópica de resonancia magnética
IERM-PM	Imagen espectroscópica de resonancia magnética con perturbación metabólica
I.P.	Intraperitoneal
IR	Inversión-recuperación
IRC	Incremento relativo de contraste
IRM	Imagen de resonancia magnética
Ko	<i>knock-out</i>
LNB-CICBio	Laboratorio de Nanomateriales Biofuncionales del CIC- Biomagune
MSME	<i>Multi-slice-multi-echo</i>
MTX	Matriz
MV	Multivoxel

NA	Número de promedios
NAA	N-acetil aspartato
NAC	Compuestos N-acetilados (NAA, glucosamino-glicenos, etc)
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NEX	<i>Number of excitations</i>
NFP-INA	Grupo de Superficies y Partículas Nanoestructuradas del Instituto de Nanociencia de Aragón
NS	Número de cortes
OA	Oligoastrocitoma
ODG	Oligodendroglioma
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate-Buffered saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p.i.	Post implantación
ppm	Partes por millón
PRESS	<i>Point-resolved spectroscopy</i>
P/V	Peso/volumen
RARE	<i>Rapid acquisition refocused echoes</i>

RF	Radiofrecuencia
RM	Resonancia magnética
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROI	Región de interés
RPMI	Medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSV	Virus del sarcoma de Rous
SD	Desviación estándar
SE	Espín-eco
SeRMN	Servicio de Resonancia Magnética Nuclear
S/N	Cociente señal/ruido
SNC	Sistema nervioso central
SPION	<i>Superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i>
ST	Grosor del corte
STEAM	<i>Stimulated echo acquisition mode</i>
SV	<i>Single voxel</i>
SW	Amplitud espectral
TAC	Tomografía axial computarizada
T	Tesla
TAT	Tiempo total de adquisición

T_{1w}	Imagen ponderada en T ₁
T_{1w}-CE	Imagen ponderada en T ₁ con administración de contraste
T_{2w}	Imagen ponderada en T ₂
T₂*	Tiempo de relajación transversal aparente
TE	Tiempo de eco
TEG	Trietilenglicol
TF	Transformada de Fourier
Tg	Transgén
TR	Tiempo de reciclaje
VAPOR	<i>Variable pulse power optimized relaxation delays</i>
VOI	Volumen de interés
UAB	<i>Universitat Autònoma de Barcelona</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
wt	<i>Wild type</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

1.1.1 Historia

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

En 1970, Raymond Damadian investigó las diferencias existentes entre tumores y tejido normal detectables por RMN, basándose en los tiempos de relajación transversal y longitudinal del agua de cada tejido (ver apartado 1.1.2 de la introducción). Su descubrimiento fue publicado en Science en 1971 [3] y supuso el primer paso en la aplicación de la RMN para la detección y diagnóstico de tumores. Por otra parte, Paul Lauterbur, un físico coetáneo de Damadian, implementó la técnica de RMN utilizando diferentes gradientes magnéticos en las tres direcciones del espacio para poder aplicar campos magnéticos de diferente intensidad a los distintos puntos espaciales de un objeto en estudio [4]. Esto permitía el registro de señales de diferente radiofrecuencia procedentes de cada punto espacial, generando una imagen en escala de grises que contenía la información de cada punto espacial registrado, lo que dio nacimiento a la técnica de Imagen por Resonancia Magnética (IRM). En 1975, Richard Ernst introdujo la adquisición mediante codificación en fases y en frecuencias, reduciendo significativamente los tiempos de adquisición y, para

OBJETIVO GENERAL

procesar los datos obtenidos por IRM, aplicó por primera vez los conceptos de la transformada de Fourier, que se utilizaban tradicionalmente para la evaluación de espectros de RMN [5]. Peter Mansfield utilizó los gradientes descritos por Lauterbur y contribuyó al desarrollo de las secuencias EPI (*Echo Planar Imaging*) permitiendo que las imágenes de RM pudieran ser obtenidas en menos de un segundo. Con motivo de sus descubrimientos, ambos, Lauterbur y Mansfield, compartieron el Premio Nobel de fisiología y medicina en el año 2003.

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

1.1.2 Fundamentos físicos y conceptos básicos

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

OBJETIVO GENERAL

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

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

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

El estado de menor energía es el correspondiente a la orientación del momento

magnético $\vec{\mu}$ en el mismo sentido que B_0 , por lo que en un sistema en equilibrio

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

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

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

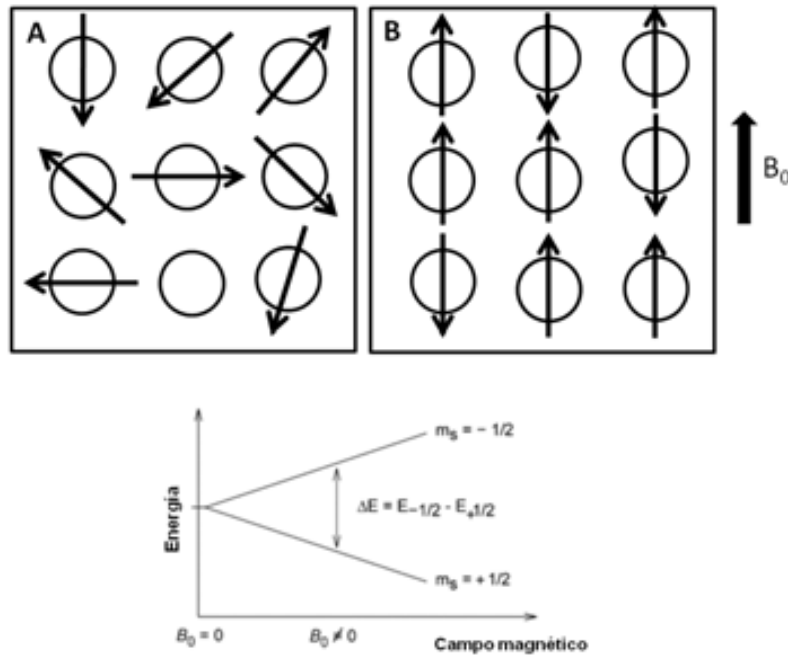


Figura 1.1: En la parte superior se esquematiza una población de espines con distintas orientaciones espaciales (A) que, tras verse sometidos a un campo magnético externo B_0 , se orientan en dos direcciones diferentes con distinto nivel energético (B), debido a sus momentos magnéticos. En el estado de equilibrio, habrá más espines orientados en el mismo sentido que B_0 . En la parte inferior se muestra el caso del ^1H , que puede ocupar dos niveles energéticos diferentes (estados de espín, m_s) tras experimentar un campo magnético distinto de cero tomada de [7].

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

OBJETIVO GENERAL

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

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

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

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

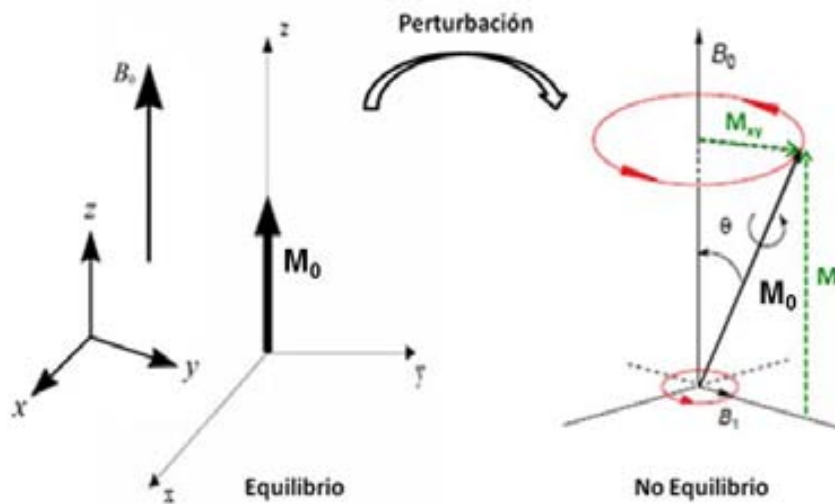


Figura 1.2: Representación de la perturbación de la magnetización macroscópica de una muestra por parte de un campo magnético externo aplicado adicional (B_1) perpendicular a B_0 . En la parte izquierda de la figura se representa el sistema en equilibrio sometido a un campo magnético con la magnetización global (M_0) en la dirección y sentido de B_0 . A la derecha, se observa el efecto de aplicar una radiación electromagnética sobre el sistema en equilibrio: la magnetización global se desplaza un cierto ángulo θ respecto al estado inicial (tránsito espectroscópico), adquiriendo componentes longitudinal (M_z) y transversal (M_{xy}). Finalmente, “M” es la magnetización global que se aparta de B_0 al mismo tiempo que mantiene su precesión. Tomado de [7].

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

OBJETIVO GENERAL

obtiene un espectro de RMN (figura 1.3) Los estudios de RMN detectan una señal proporcional a la magnetización inicial de la muestra.

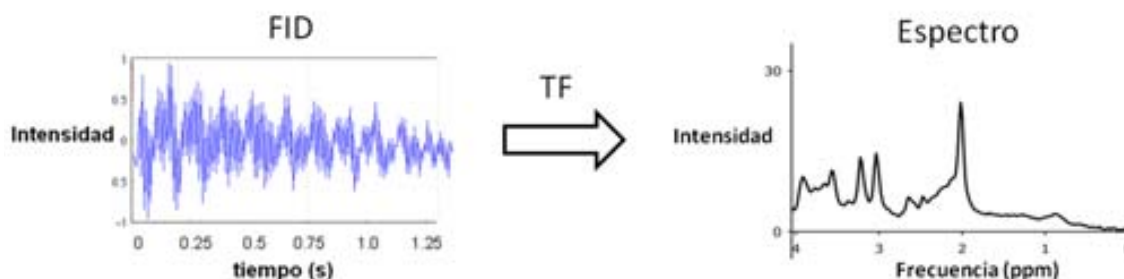


Figura 1.3: Esquema de la transformación de la FID (dominio del tiempo) registrada en un experimento de RMN, en un espectro (dominio de la frecuencia), tras la aplicación de la transformada de Fourier.

Tiempos de relajación longitudinal y transversal

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

El proceso de relajación longitudinal hace referencia al aumento paulatino de la magnetización longitudinal, debido al intercambio energético entre los espines nucleares y el entorno molecular. El T_1 es la constante que mide el tiempo que tarda el

OBJETIVO GENERAL

sistema en recuperar el 63,2% de la magnetización longitudinal tras la aplicación de un pulso de 90° o el 26,4% de ese valor tras la aplicación de un pulso de 180°.

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

1.1.3 Aplicaciones biomédicas de la RMN

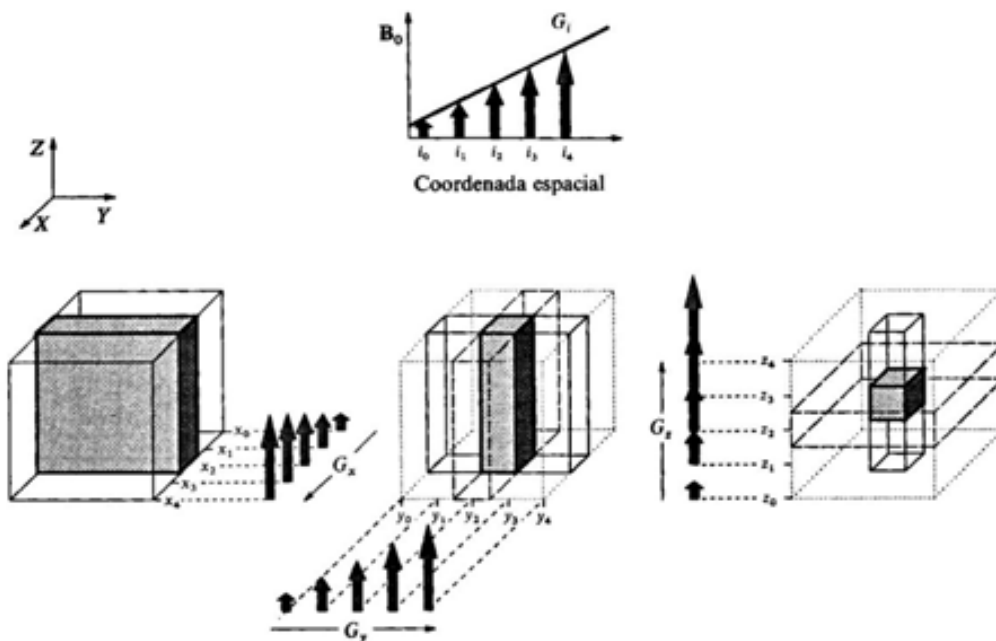
1.1.3.1 Imagen de resonancia magnética (IRM)

La IRM se basa en los principios de la RMN para obtener señales de resonancia localizadas espacialmente mediante el uso de gradientes para formar una imagen. El hidrógeno (^1H) es el núcleo más utilizado por su abundancia en el cuerpo humano y el gran momento magnético que posee. Las imágenes se obtienen a partir de la señal de los ^1H presentes en el tejido, dependiendo de su concentración y movilidad. La mayoría de la señal procede del agua y en una proporción mucho menor de la grasa corporal. El resto de metabolitos con ^1H visibles por RMN no contribuyen significativamente a la obtención de las imágenes debido a que se encuentran en una concentración mucho menor a la de la grasa y el agua. El contraste obtenido en las imágenes de IRM se consigue fundamentalmente gracias a las diferencias en densidad protónica (de hidrógenos) entre los tejidos de la muestra en estudio, así como a sus tiempos característicos de T_1 y T_2 . En general, se definen tres tipos de imágenes según el parámetro en el que se basa la generación de contraste durante su adquisición: ponderadas en T_1 , en T_2 o en densidad protónica.

En resumen, para la adquisición de imágenes por IRM, la muestra, o el paciente en estudios clínicos, son estudiados en presencia de un elevado campo magnético que permite la orientación preferencial de los momentos magnéticos de los hidrógenos de

OBJETIVO GENERAL

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



OBJETIVO GENERAL

Figura 1.4: Diagrama de una de las estrategias de selección de un voxel de excitación determinado dentro del tejido explorado por RMN, mediante el uso de tres gradientes ortogonales en el espacio. Tomado de [7].

Existe una gran variedad de secuencias de pulsos para IRM que combinan de diferentes maneras los pulsos de RF, variando el tiempo de reciclaje (TR) (tiempo transcurrido entre pulsos de excitación de RF) y el tiempo de eco (TE) (tiempo transcurrido desde la aplicación del pulso de excitación para generación de eco hasta la obtención de la señal de RMN (FID), normalmente en el máximo del eco. De esta manera se obtiene contraste (diferencia de intensidad en la imagen entre dos regiones contiguas) y se puede seleccionar el parámetro en el que se va a ponderar la imagen obtenida, por ejemplo una imagen ponderada en T_1 , que es más sensible a los detalles anatómicos estándar, o ponderada en T_2 , que es más sensible al contenido de agua y su movilidad y a la presencia de patología [8]. En general, para que una imagen esté ponderada en T_1 se utilizan TR y TE cortos en su adquisición y por el contrario, para que esté ponderada en T_2 se emplean TR y TE largos. En el caso de la densidad protónica, se aplican TR largos y TE cortos (figura 1.5).

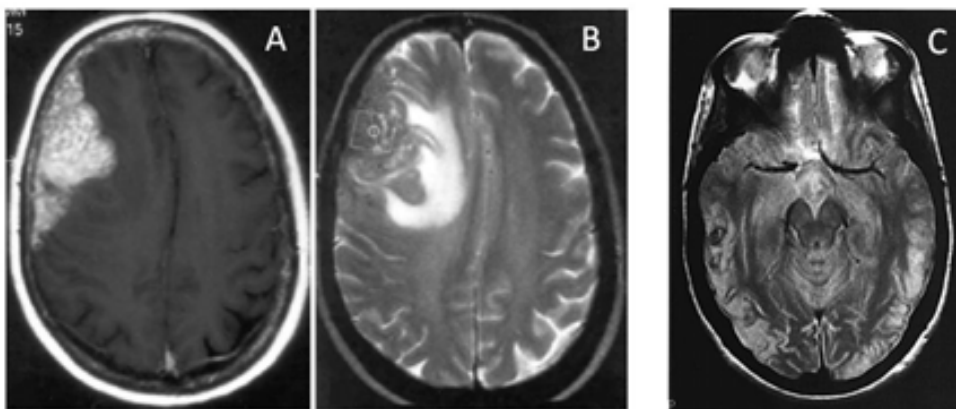


Figura 1.5: Las imágenes A y B, obtenidas a 1,5 T, muestran un corte en el plano axial del encéfalo de un paciente afectado por una metástasis en el lóbulo frontal derecho. La imagen ponderada en T_1 (A) muestra una hiperintensidad (más blanco) en la lesión, relativamente

OBJETIVO GENERAL

heterogénea, mientras que la imagen ponderada en T_2 (B) muestra edema (blanco) y efecto de masa en el tejido circundante [9]. La figura C muestra un corte en el plano axial a un nivel inferior que A y B de un encéfalo normal ponderado en densidad protónica (adaptada de [10]).

Imágenes ponderadas en T_1

Se basan en los distintos tiempos de relajación longitudinal según el tipo y región del tejido estudiado y aprovechan para ello el tiempo que tardan los núcleos en alcanzar de nuevo el estado de equilibrio poblacional tras la aplicación de un pulso de RF (figura 1.6).

Los núcleos con T_1 cortos cederán a su entorno molecular la energía recibida en la excitación por RF más rápidamente que los núcleos con T_1 largo, y eso dependiendo de su tipo y movilidad relativa dentro de la muestra. Por ejemplo, los núcleos del agua libre tienen un T_1 relativamente largo debido a que su elevada movilidad se encuentra en el rango que dificulta la relajación cruzada longitudinal. En cambio, los núcleos de agua asociados a macromoléculas tienen una movilidad restringida, lo que facilita normalmente la relajación cruzada longitudinal, produciendo un acortamiento del T_1 efectivo. En muchas patologías se observa un aumento del agua intersticial libre, produciendo un aumento del T_1 . En una imagen estándar ponderada en T_1 , la intensidad de señal es inversamente proporcional al valor de T_1 de cada molécula, porque para adquirirla se emplean tiempos muy cortos después de la aplicación de la RF de excitación y las sustancias con T_1 corto están llegando ya al máximo de recuperación de la magnetización longitudinal, mientras que las de T_1 largo sólo han recuperado una pequeña parte. Hay que destacar que las secuencias utilizadas para medir T_1 son las de pulso adquisición con un ángulo de 90° , en las que la magnetización se mide a diferentes TR y las de inversión-recuperación (IR), que constan de un pulso de 180° seguido (tras un cierto tiempo, denominado tiempo de

OBJETIVO GENERAL

inversión) de otro pulso de 90° , el cual vuelca la magnetización restante en el plano transversal para así poder detectarla. En estas últimas, la magnetización se mide tras diferentes tiempos de inversión.

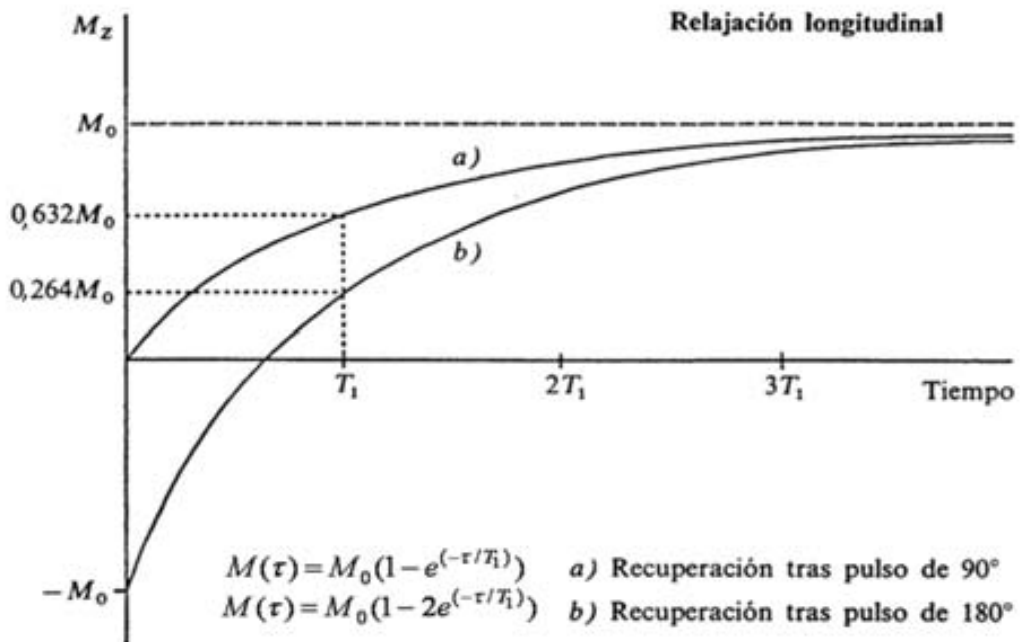


Figura 1.6: Gráfico que representa la recuperación de la magnetización longitudinal de una muestra a lo largo del tiempo. El T_1 se ve representado como el punto temporal en el cual se ha recuperado el 63,2% de la magnetización inicial. Debajo del gráfico se muestra la fórmula para calcular el T_1 tras la aplicación de un pulso de 90° (a) o de 180° (b), siendo $M(\tau)$ la magnetización longitudinal a un tiempo τ tras la aplicación de la RF de excitación y M_0 la magnetización inicial antes de aplicar el pulso [11].

Imágenes ponderadas en T_2

Estas imágenes se basan en los distintos tiempos de relajación transversal (figura 1.7), según el tipo y región del tejido estudiado. Dichos tiempos dependen de la presencia de heterogeneidades a nivel molecular y macroscópico en el entorno de los núcleos de la muestra excitada por la RF y de su efecto en la frecuencia de precesión efectiva de

OBJETIVO GENERAL

dichos núcleos. En el caso del agua libre, debido a la elevada movilidad de sus moléculas, el promedio de las variaciones magnéticas locales es prácticamente nulo, por lo que hay una gran coherencia en la frecuencia de precesión de los núcleos y el T_2 es en consecuencia relativamente largo. Sin embargo, en estructuras que mantienen el agua ligada, los núcleos del agua perciben ligerísimas diferencias de campo magnético en función de las moléculas circundantes, lo cual implica una gran incoherencia en su frecuencia de precesión y un acortamiento del T_2 efectivo. En las imágenes ponderadas en T_2 , la intensidad de la señal es directamente proporcional al valor de dicho T_2 .

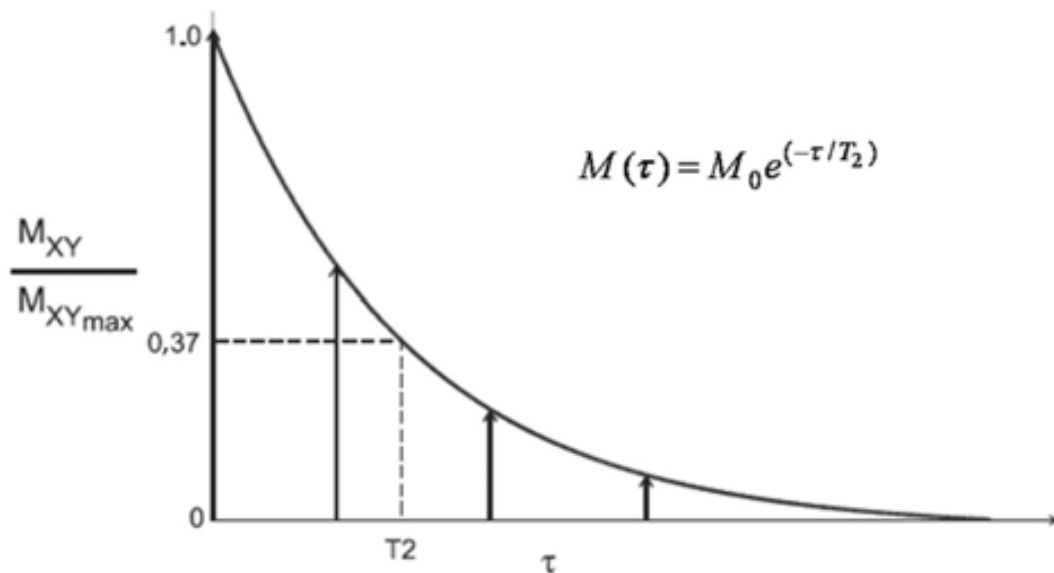


Figura 1.7: Gráfico que representa la pérdida de magnetización transversal (M_{xy}) en función del tiempo. El T_2 se representa como el punto temporal en el que sólo se detecta el 37% de la magnetización transversal máxima y sobre la gráfica se muestra la fórmula para calcularlo (ver pie de figura 1.6 para otros parámetros) [11].

Una de las secuencias clásicas de pulsos que se utilizan en IRM es la secuencia denominada SPIN-ECHO (SE): Consiste en un pulso de 90° seguido de otro de 180° , dejando transcurrir un tiempo $TE/2$ después de cada uno de ellos. La señal (FID) se

OBJETIVO GENERAL

registra una vez transcurrido el TE/2 después del pulso de 180°. El proceso completo se repite una vez transcurrido el TR establecido. La ventaja de esta secuencia es que permite recuperar la magnetización transversal perdida por efectos de T_2^* durante el TE. Una posible modificación de esta secuencia consiste en obtener varios ecos dentro del mismo TR (ej. secuencia RARE) añadiendo más pulsos de 180°, teniendo en cuenta que la señal en cada eco a TE creciente es cada vez más pequeña [12].

Esto tipo de secuencia ha sido posible gracias al desarrollo de la tecnología aplicada a la RMN, para diseñar secuencias rápidas que optimicen la obtención de imágenes de buena resolución en tiempos totales de segundos, como por ejemplo las secuencias *fast spin echo* (FSE) o *fast gradient echo* (FGRE).

Una manera de optimizar el contenido de información en las imágenes obtenidas por IRM es la utilización de agentes de contraste (ver también apartado 1.3 de la Introducción), que proyectan la IRM clásica más allá de sus posibilidades morfológicas, siendo capaces de valorar una respuesta dinámica incorporando una dimensión temporal en la caracterización tisular (figura 1.8). Lo que caracteriza a estas sustancias es la presencia de un ion metálico con propiedades magnéticas, el cual constituye el agente activo que se suele unir a una sustancia quelante para reducir su toxicidad y facilitar su transporte. Dichos agentes afectan a la relajatividad del agua de los tejidos en contacto con ellos, generalmente disminuyendo el T_1 y el T_2 , para potenciar la imagen con contrastes positivos (T_1) o negativos (T_2) en aquellas regiones donde ha penetrado el agente. El alcance de su acción dependerá de la estructura química del agente, de la movilidad del agua (sustancia que interacciona en mayor medida con los agentes) y de la compartimentalización del tejido. En general, puede decirse que existen agentes de contraste paramagnéticos (por ejemplo el gadolinio, Gd) y superparamagnéticos (como los óxidos de hierro). En este trabajo los agentes de contraste comerciales utilizados fueron: A) Magnevist[®], aprobado para uso clínico y

OBJETIVO GENERAL

con gran capacidad para disminuir el T_1 del agua del tejido. Es un compuesto iónico paramagnético (está compuesto por gadopentato de meglumina (Gd-DTPA)) con estructura de quelato lineal y se distribuye inicialmente por el espacio intravascular, difundiéndose posteriormente al espacio intersticial y B) Dotarem[®], su estructura se compone de ácido gadotérico (DOTA) unido a gadolinio, único de cadena macrocíclica (mayor estabilidad, mayor retención de gadolinio en el quelante) ya que los demás agentes de contraste usados para exploraciones de IRM de cerebro son lineales. Posee propiedades paramagnéticas que permiten realzar el contraste en IRM. No posee actividad farmacológica específica y se caracteriza por poseer un alto grado de inercia biológica.

Actualmente existen numerosos agentes de contraste que utilizan el Gd como base de su composición y que se combinan con otras estructuras para alcanzar determinadas dianas en el tejido e incluso actuar como *carriers* de algunas sustancias terapéuticas, como en el caso de las nanopartículas [13].

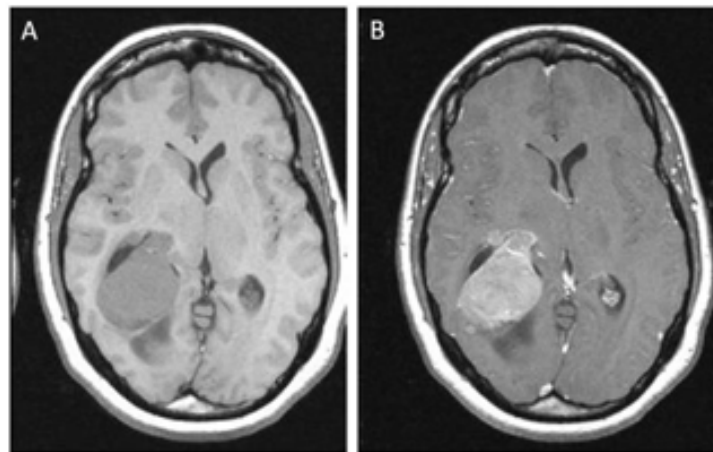


Figura 1.8: Imágenes de IRM SE ponderadas en T1 en plano axial de un tumor cerebral humano, antes (A) y después (B) de la administración de un agente de contraste basado en Gadolinio, adaptada de [11].

OBJETIVO GENERAL

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

1.1.3.2 Espectroscopía de resonancia magnética (ERM)

La ERM es una técnica que permite medir de manera no invasiva la concentración de metabolitos presentes en una muestra o tejido. Además aporta información referente al metabolismo tisular, por lo que puede aplicarse al estudio de diversas enfermedades, como por ejemplo tumores cerebrales, para determinar el tipo y grado de la lesión, así como para detectar respuesta a terapia a nivel molecular [14]

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

- El desplazamiento químico:

Los núcleos presentes en la muestra analizada forman parte de estructuras atómicas y moleculares, por lo que se encuentran rodeados de electrones que también están sometidos al campo magnético externo B_0 . Los electrones

OBJETIVO GENERAL

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

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

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

Las referencias más utilizadas en experimentos *in vitro* para ^1H -ERM son el tetrametilsilano (TMS) o el 3-trimetilsilil [2,2,3,3- ^2H] propionato sódico (TSP), y se les asigna el valor de 0 ppm. Se ha observado que utilizando estos compuestos como referencia, el grupo metilo de la creatina/fosfocreatina aparece a 3,03 ppm y el del N-acetil aspartato (NAC) a 2,01 ppm, por lo que

OBJETIVO GENERAL

estos dos valores se utilizan como referencia en los estudios *in vivo*, en los que no es conveniente añadir TMS o TSP.

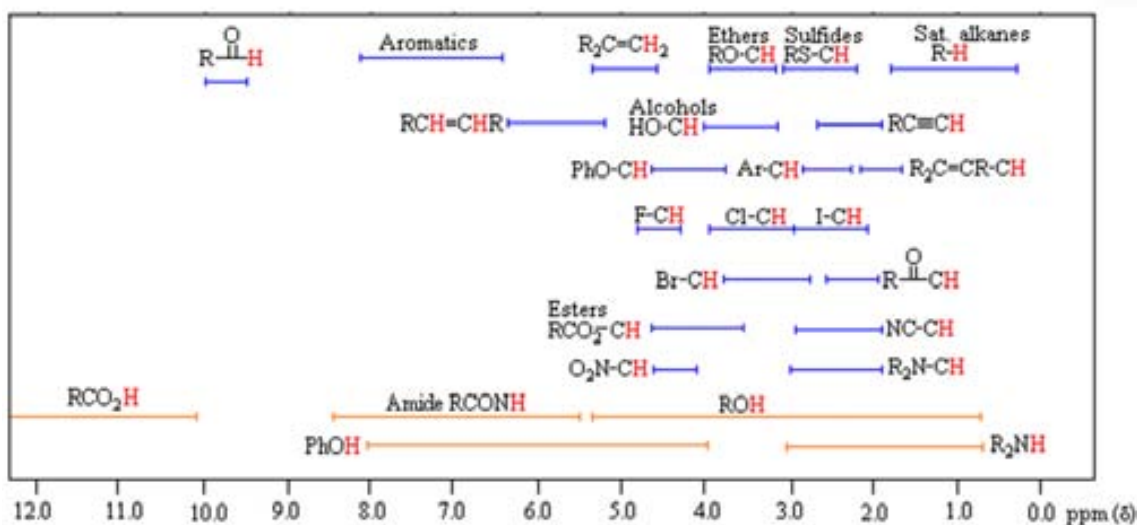


Figura 1.9: En esta figura se muestra la posición que ocupan los protones en el espectro de una muestra según su entorno químico, dentro del rango de 0 a 12 ppm. Por ejemplo, entre 9 y 10 ppm se encuentran los de los grupos aldehído; en la región entre 6 y 8 ppm se encuentran protones que pertenecen a grupos aromáticos; las resonancias entre 5 y 6,5 ppm pertenecen a los alquenos; entre 3,5 y 4,5 ppm se encuentran los grupos éster y entre 3 y 4 ppm los éter. Los protones unidos a nitrógeno y oxígeno pueden tener un desplazamiento químico diferente dependiendo del pH, la temperatura, el solvente de la muestra y la concentración [11].

- La intensidad y la anchura de la señal:

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

OBJETIVO GENERAL

experimentos en los que la anchura de la señal puede considerarse constante, cambios en la altura de las señales pueden considerarse proporcionales a cambios de intensidad y, por tanto, de concentración.

- Cociente señal/ruido:

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

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

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

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

OBJETIVO GENERAL

largos de baja potencia a la frecuencia de resonancia del agua combinados con gradientes de campo magnético para desfazar la señal: *chemical shift selective* (CHESS) *imaging*, con lo que se consigue suprimir o atenuar en su mayor parte la resonancia de la señal del agua en el momento de la detección final de la FID.

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

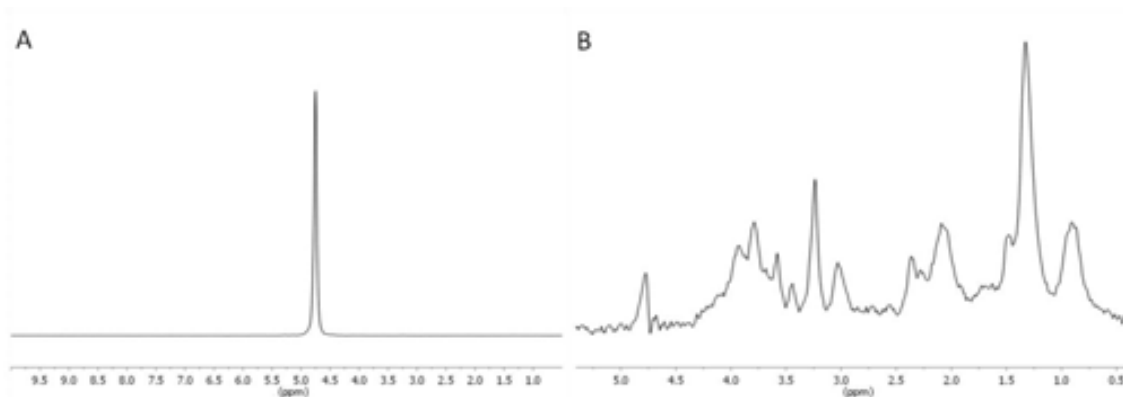


Figura 1.10: Espectros adquiridos con el método PRESS y un TE de 12 ms *in vivo* a 7T en un glioma inducido por inoculación de células GL261 en cerebro de ratón (día 16 post-implantación). El voxel de adquisición era de $2,5 \text{ mm}^3$ y ocupaba exclusivamente volumen

OBJETIVO GENERAL

tumoral sin contaminación de parénquima peritumoral/normal. En A) se muestra un espectro sin supresión de agua en el que sólo puede apreciarse la resonancia correspondiente a los protones del agua a 4,75 ppm. En B) se muestra un espectro adquirido en el mismo tumor pero con supresión de la señal de agua. En este caso, las señales de los metabolitos del tejido son perfectamente visibles entre 0,5 y 4,5 ppm. Obtenido en la presente tesis.

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

1.1.3.3 Imagen espectroscópica de resonancia magnética (IERM)

La IERM es una técnica que permite la adquisición de múltiples espectros ERM localizados de manera simultánea [15,16], se aplica principalmente al estudio de cerebro, próstata y mama, y puede ser mono, bi o tridimensional según el modo de obtención de la señal: de columnas (o filas) en un plano, o de filas y columnas en un volumen, respectivamente. En el caso del cerebro, se preselecciona el volumen de interés previamente para evitar la señal procedente de la grasa subcutánea. Esto puede complementarse con la aplicación de múltiples bandas de saturación (figura 1.11). La principal ventaja de la IERM es que permite obtener espectros de zonas patológicas y normales en una misma exploración (ver también apartado 1.2.2 de la

OBJETIVO GENERAL

Figura 1.11: En A) se muestran las bandas de saturación del volumen externo utilizadas para delimitar el VOI en una secuencia de IERM adquirida en parénquima cerebral normal de ratón C57BL/6 a 7 Teslas (la saturación fue realizada en todas las zonas mostradas en la imagen excepto en la zona central). En B) (parte inferior derecha) se muestra el *grid* de adquisición con los espectros individuales contenidos en él (recuadro azul) y a la izquierda se muestra un espectro representativo de dicha matriz (recuadro rojo) con las resonancias principales indicadas [20,21] Alanina (Ala), Colina (Cho), Creatina (Cr), Glutamato (Glu), Lactato (Lac), Lípidos Móviles y macromoléculas (MM), n-acetil aspartato (NAA), Taurina (Tau), miolinositol (Ino), Glutamina (Glu), Gamma-aminobutirato (GABA), N-acetil aspartato glutamató (NAAG).
Figura tomada de [21]

IERM-PM

Con los estudios de IRM y ERM podemos conocer las alteraciones en la morfología y en el metabolismo que presentan diferentes patrones según el tipo y grado de los tumores cerebrales humanos investigados [22], y recientemente, los clasificadores automáticos basados en el análisis de reconocimiento de patrones por ERM, han mejorado aún más la caracterización de los tumores cerebrales *in vivo* [23]. Sin embargo, aún no es posible discriminar perfectamente ciertos grados de tumores y tampoco los diferentes subtipos moleculares que la anatomía clásica no puede definir [24,25]. Es por esta razón que nuestro grupo ha desarrollado técnicas de imagen molecular basadas en IERM en las cuales el patrón metabólico es perturbado mediante utilización de sustancias como DMSO y glucosa [26,27], con el objetivo de aumentar el rango dinámico para algunos tipos de discriminación. Esto sucede porque la respuesta a la perturbación metabólica, es distinta en diferentes zonas del mismo tumor o lesión y, por lo tanto, añade más especificidad a la discriminación [28], en estos subtipos o grados.

1. 2 TUMORES CEREBRALES

1.2.1 Epidemiología, clasificación y etiología

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) presentan una incidencia bastante baja a nivel mundial (figura 1.12), pero a pesar de ello, constituyen una fuente importante de mortalidad y discapacidad.

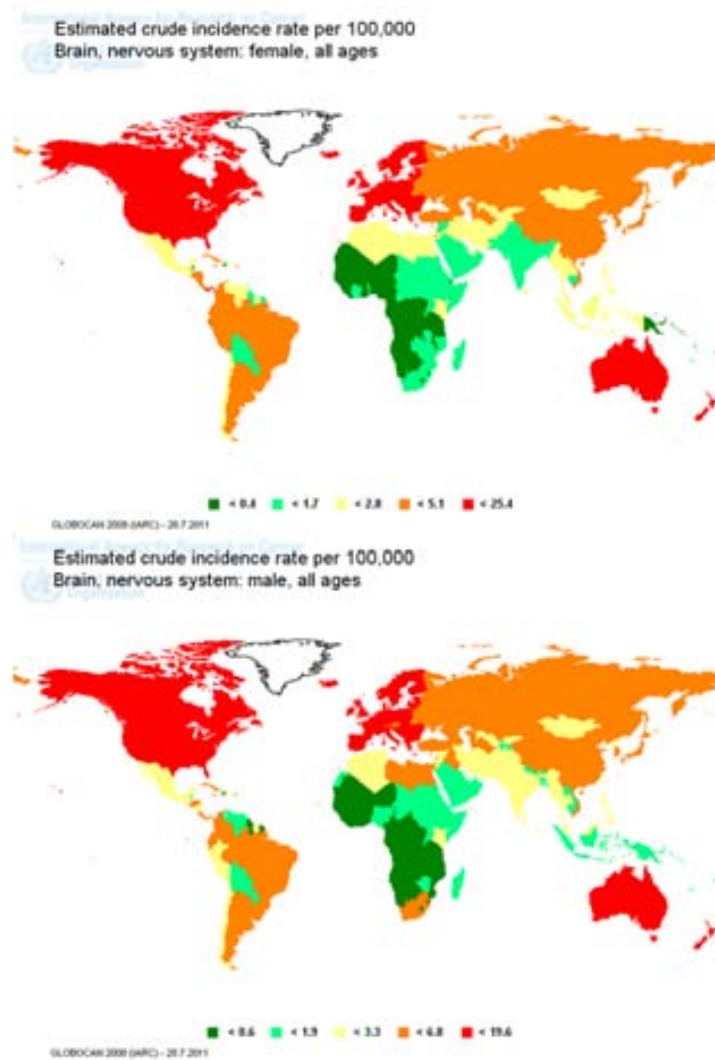


Figura 1.12: Tasa de incidencia de los tumores cerebrales en mujeres (imagen superior) y hombres (imagen inferior) a nivel mundial estimada por GLOBOCAN [29].

De todos los tumores intracraneales primarios, la mayoría (60%) están originados por células gliales; el 28% derivan de las meninges y un 7,5% tienen localización en los nervios espinales y craneales. Los linfomas y tumores de líneas germinales constituyen aproximadamente un 4% y un 1% del total respectivamente [30]. En el Anexo 1 se muestra un resumen de los tumores del SNC más frecuentes. La Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, (WHO)) clasifica los tumores del sistema nervioso en diferentes grados de malignidad basándose en cuatro criterios histopatológicos (atipia nuclear, actividad mitótica, hiperplasia endotelial y necrosis) y en datos de supervivencia, correspondientes a las entidades tumorales y a los pacientes respectivamente [31,32]. Todo esto se combina dando como resultado una escala de cuatro grados de malignidad, que conforman el sistema de clasificación más aceptado actualmente:

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

OBJETIVO GENERAL

Los gliomas se clasifican en diferentes grupos según el tipo celular que los origina y la localización que ocupan, siendo los principales grupos astrocitomas (derivados de astrocitos), oligodendrogliomas (ODGs, derivados de por oligodendrocitos) y oligoastrocitomas (OAs, que poseen un componente astrocítico y uno oligodendrocítico). Los astrocitomas constituyen la mayor parte de los gliomas y se dividen en: astrocitoma pilocítico (grado I), astrocitomas difusos de bajo grado (grado II) y astrocitomas anaplásicos (grado III). Los astrocitomas pilocíticos son tumores de crecimiento lento con pronóstico favorable y tasas de supervivencia superiores a cinco años en más del 85% de los casos. Los astrocitomas difusos, sin embargo, no pueden ser reseccionados quirúrgicamente en su totalidad y tienden a evolucionar a estadios más agresivos (grado III) siendo la tasa de supervivencia mayor o igual a 5 años del 60%. Por otro lado, los ODG se clasifican en ODG de bajo grado (II) y ODG anaplásicos (III). Tienen un pronóstico menos favorable que los astrocitomas difusos pero también una menor tendencia a progresar hacia estadios más agresivos. La incidencia de los oligoastrocitomas puede variar de un 1,8 a un 19% del total de gliomas, porque el diagnóstico varía según los diferentes laboratorios de análisis y muchas veces son considerados bien como ODGs o bien como astrocitomas. Su pronóstico y tendencia a la malignización dependen de las proporciones de los distintos tipos celulares que los constituyen.

Cualquiera de los tres tipos principales de glioma puede transformarse en glioblastoma multiforme (GBM) (grado IV) [33]. El GBM es el tumor maligno más frecuente en el SNC: es muy resistente a la quimio y radioterapia y sólo un 3% de los pacientes afectados sobrevive más de tres años, siendo la supervivencia media de 12 meses [34,35]. Entre sus características histopatológicas cabe destacar: atipia nuclear, pleomorfismo celular, trombosis vascular, proliferación microvascular y necrosis.

OBJETIVO GENERAL

Un caso particular dentro de los tumores del SNC son las metástasis, ya que no son tumores primarios sino que proceden de neoplasmas originados en otros tejidos, en su mayoría carcinomas de pulmón o mama. Algunos se originan a partir de melanomas, coriocarcinomas y carcinomas de células claras de riñón [30].

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

1.2.2 Diagnóstico

Los síntomas más comunes entre los pacientes de tumor cerebral suelen ser: dolor de cabeza, mareos, cambios cognitivos no específicos o signos neurológicos focales, dependiendo de la localización, tamaño y tasa de proliferación del tumor. El diagnóstico debe permitir distinguir estos casos de otras patologías que pueden presentar síntomas similares, como por ejemplo hematomas subdurales, abscesos cerebrales, hidrocefalia, esclerosis múltiple, malformaciones vasculares, infartos cerebrales y otros. Muchas de estas patologías presentan características radiológicas que permiten diferenciarlas de los tumores, por lo que las herramientas más utilizadas en el diagnóstico diferencial de dicha enfermedad son la tomografía axial computerizada (TAC) y la IRM. Una de las limitaciones más importantes de estas herramientas no invasivas es la dificultad para distinguir los tumores del SNC de otras patologías, como abscesos o enfermedades desmielinizantes, que precisan un estudio más detallado y que, en muchos casos, terminan requiriendo una biopsia del tejido anómalo (figura 1.13)

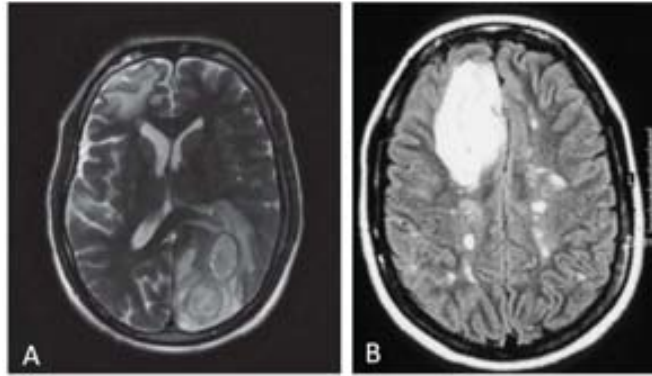


Figura 1.13: En A) puede verse una imagen de RM ponderada en T_2 y adquirida en el plano axial de un paciente afectado por una lesión hiperintensa en la región occipito-parietal del cerebro. Aparentemente, dicha lesión podría confundirse con una metástasis, a pesar de que resultó ser un absceso piogénico [37]. La imagen B) muestra un corte axial adquirido con el método FLAIR (*Fluid attenuated inversion recovery*), similar a una ponderación en T_2 , en un paciente afectado por esclerosis múltiple. La gran masa en el lóbulo frontal derecho muestra características de intensidad y homogeneidad similares a las de las lesiones pequeñas centrales (placas de esclerosis múltiple), lo cual, unido al historial del paciente, podría sugerir que se trata de una placa de tamaño anormalmente grande. Sin embargo una biopsia estereotáctica demostró que la lesión frontal era un OA de grado II, a pesar de lo poco habitual que es la concurrencia de ambas enfermedades [38].

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

Un estudio rutinario clínico de una masa cerebral anómala por IRM se compone de imágenes ponderadas en T_2 (TR y TE largos) (T_{2w}), imágenes ponderadas en T_1 (TR y TE cortos) (T_{1w}) y secuencias FLAIR (TR largo y TE variable), que atenúan la señal del líquido cefalorraquídeo. La detección, caracterización y delimitación precisa de las

OBJETIVO GENERAL

lesiones requiere la obtención de un buen contraste entre tejido tumoral y tejido circundante. Por ello, la administración de agentes de contraste (AC) durante los estudios por IRM es un método de diagnóstico establecido en los centros clínicos (ver también apartado 1.3 de la introducción). Este tipo de compuestos acentúan la diferencia de intensidad de señal entre los tumores y el tejido normal. Los AC de uso más habitual en la clínica alcanzan el espacio extracelular del tejido a través de lesiones en la barrera hematoencefálica (BHE) [39]. El grado de contraste alcanzado en ese caso, depende del nivel de rotura de la BHE, la concentración intravascular de agente de contraste y de sus propiedades magnéticas, la vascularización de la lesión (perfusión) y el flujo sanguíneo, entre otros factores.

Actualmente existen muchos agentes de contraste aplicables a la detección de tumores cerebrales, siendo los más utilizados aquellos cuya composición base es el gadolinio, y que se denominan agentes de contraste de primera generación. Éstos sólo cruzan la BHE en caso de lesión o rotura, por lo que normalmente no son captados por tumores de bajo grado [40]. Los GBM sí que presentan normalmente rotura de BHE y aparecen como nódulos hipointensos en su centro necrótico que captan el contraste de manera irregular (normalmente siguiendo un patrón en forma de anillo hiperintenso que bordea los límites de la masa) al estudiarlos con secuencias ponderadas en T_1 post-contraste [41]. El problema principal de este sistema de diagnóstico es que entre 9-37,5% de los gliomas de alto grado no muestran captación de contraste y un 34-50% de los gliomas de bajo grado sí captan contraste, por lo que en esos casos un diagnóstico limitado únicamente a los resultados obtenidos mediante el contraste por IRM sería erróneo [42,43]. Existe una segunda generación de protocolos y agentes de contraste que difiere de la anterior en la concentración de gadolinio y en las propiedades de relajatividad (inverso del tiempo de relación por mol del agente). Además se están sintetizando nuevos agentes para mejorar la detección y seguimiento de este tipo de lesiones (sección 1.3) [44].

OBJETIVO GENERAL

Además de las secuencias de IRM en la exploración radiológica se han incluido secuencias de difusión, de imagen funcional y angiografía dentro del protocolo de diagnóstico de tumores cerebrales para evaluar el tipo de tumor, extensión de la lesión y características vasculares de la misma [45].

En resumen, puede decirse que el diagnóstico no invasivo de un tumor cerebral comprende diferentes etapas, siendo la última de ellas la orientación radiológica del grado y tipo de la lesión. El primer paso es la detección, que normalmente se lleva a cabo mediante las imágenes T_{2w} , ya que los tumores aparecen como masas hiperintensas respecto al parénquima cerebral normal. Las secuencias T_{1w} con contraste producirán diferentes tipos de imagen dependiendo de la vascularización del tumor y de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE). A continuación, se evalúa el impacto de la lesión en el resto del encéfalo así como en los ventrículos y se determina con la mayor precisión posible la localización espacial del tumor y su extensión. Es importante analizar si las estructuras vasculares propias del cerebro como la arteria carótida o la arteria cerebral media se ven afectadas por la masa. Finalmente se procede a determinar el tipo y grado de la lesión, si es primaria o metastásica, benigna o maligna, con el fin de aplicar el tratamiento más adecuado según el caso. Normalmente la confirmación del diagnóstico se realiza a partir de un análisis histopatológico de una biopsia del tejido anómalo, bien sea estereotáctica o parte de una resección mayor. Esto conlleva riesgos tanto a nivel de mortalidad/morbilidad del paciente [46,47] como de diagnóstico, ya que se puede subestimar el grado del tumor dependiendo de la zona de la que se haya extraído la biopsia. En ese caso, disponer de una herramienta adicional eficaz de diagnóstico no invasivo constituiría un importante avance para mejorar en lo posible el tratamiento de este tipo de lesiones.

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

Un método no invasivo prometedor para el diagnóstico de tumores cerebrales es la ERM de protón (^1H -ERM), que está considerada como un complemento muy útil de la IRM y que actualmente se utiliza de manera rutinaria en los estudios de tumores cerebrales de diversos centros clínicos del mundo, requiriendo solamente unos pocos minutos para la adquisición de espectros SV en imanes de 1,5T [9] . Los espectros se obtienen normalmente de volúmenes conocidos como voxels de aproximadamente 2-4 cm^3 y contienen información sobre metabolitos cerebrales importantes, como por ejemplo colina, creatina, mioinositol, glutamato, N-acetil aspartato (NAA), lactato y lípidos móviles (figura 1.14). El NAA se considera como un marcador de viabilidad neuronal que suele ver disminuida su concentración en el caso de los tumores cerebrales, reflejando la afectación de neuronas y axones. La resonancia de la colina (colina total) procede de un grupo de moléculas involucradas en la degradación y síntesis de membrana celular, principalmente de fosfocolina, glicerofosfocolina y colina libre, por lo que se considera como un marcador de proliferación. La creatina total (creatina + fosfocreatina) hace referencia a compuestos involucrados en el metabolismo energético de tejidos con demanda fluctuante de energía y se ve disminuida en los tumores con respecto a parénquima cerebral sano. El lactato en condiciones normales presenta valores no detectables en el parénquima cerebral normal, pero en el caso de lesiones tumorales su concentración suele elevarse asociándose a regiones de alta actividad glicolítica. La función del mioinositol no es bien conocida aunque se considera un marcador glial, pero se sabe que la intensidad relativa de su resonancia se altera en determinadas patologías cerebrales. Las resonancias correspondientes a los lípidos móviles aumentan en algunos tipos de tumores, especialmente en los de alto grado, y cuando constituyen las resonancias más intensas son un indicador de necrosis (muerte celular). El glutamato es un importante neurotransmisor excitador en el SNC y se ve elevado en los

OBJETIVO GENERAL

oligodendrogliomas. La alanina suele ser detectable en los meningiomas aunque no está muy claro cuál es el significado funcional de dicho aumento de concentración [48,49] En el anexo 2 se detallan los principales metabolitos detectables en parénquima cerebral humano, normal y/o patológico.

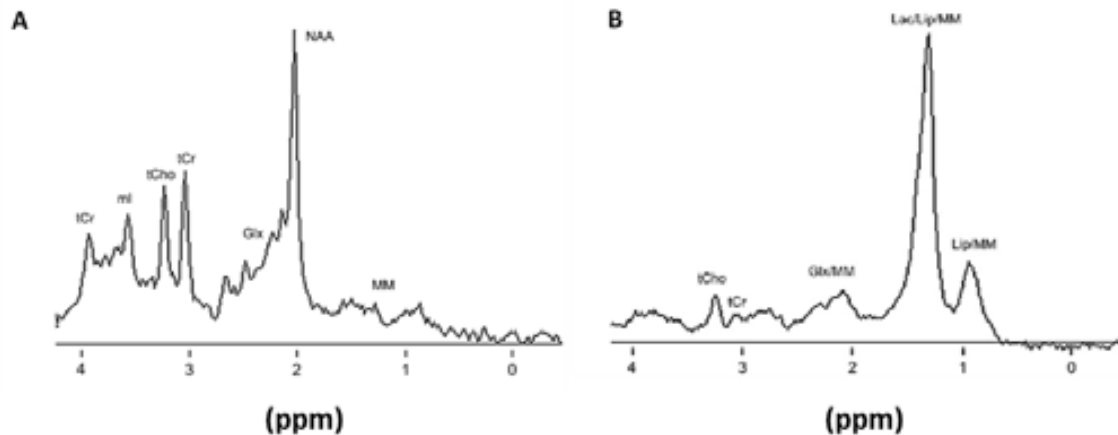


Figura 1.14: A) Espectro de ^1H (TE=30ms; TR=2000ms) de materia blanca de un voluntario sano. B) Espectro adquirido con los mismos parámetros que en A) en un GBM. Los principales metabolitos están marcados sobre sus resonancias correspondientes: creatina total (Cr) a 3,03 y 3,94 ppm; colina total (Cho) a 3,22 ppm; NAA a 2,01 ppm; mio-inositol (ml) a 3,56 ppm; glutamato y glutamina (Glx) entre 2 y 2,4 ppm; lípidos (Lip) y macromoléculas (MM) a 0,9 y 1,3 ppm y lactato (Lac) a 1,3 ppm (Figura adaptada de [48]).

Los radiólogos pueden así correlacionar la información anatómica obtenida con la IRM con la información metabólica obtenida mediante la ^1H -ERM. Los espectros aportan información bioquímica que, una vez caracterizada para cada tipo de tumor y utilizando el sistema de soporte informático adecuado, pueden ayudar a la clasificación no invasiva de este tipo de tumores, aportando un apoyo adicional al actual sistema de diagnóstico [9]. Con la debida experiencia, los patrones de niveles relativos de metabolitos se pueden interpretar visualmente para llegar a una orientación radiológica, pero el resultado más robusto se obtiene a partir de un análisis cuantitativo

OBJETIVO GENERAL

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

La IERM es una técnica no invasiva, al igual que la ERM, que proporciona información metabólica del tejido en estudio. En el caso de los tumores cerebrales, la IERM aporta información que puede traducirse en mapas de intensidad o concentración relativa de diversos metabolitos, como colina, creatina, mio-inositol, lípidos o lactato. Estos mapas muestran la distribución espacial de los metabolitos en los tumores, que normalmente suelen ser heterogéneos en composición, y también permiten determinar el borde de la lesión (importante para la resección quirúrgica) de una manera más precisa que las imágenes de T_1 y T_2 , detectando patrones de anomalía metabólica en zonas que no muestran anomalías morfológicas por IRM (figura 1.15). La IERM también permite estudiar posibles infiltraciones de células tumorales en el tejido normal, monitorizar respuesta de los tumores a terapia y controlar la progresión de la lesión [49]. Este examen permite obtener información sobre la celularidad tumoral (colina), el metabolismo energético celular (creatina), la densidad neuronal (NAA), el nivel de hipoxia (lactato) y la necrosis (lípidos móviles). Por ello ha sido una técnica muy utilizada en el estudio de gliomas de grado alto, combinando estos resultados con la información anatomopatológica correspondiente, aunque no en todos los centros clínicos pueden adquirirse secuencias de IERM de calidad suficiente. Los mapas más utilizados son los que representan el cociente colina/NAA [50]. En el caso de GBM y metástasis, estudios de la región peritumoral por IERM han demostrado que en los gliomas de alto grado estas zonas presentan cocientes NAA/colina menores de 1 y valores elevados de creatina y colina, mientras que esto no sucede en las metástasis. Estos resultados probablemente reflejan la presencia de edema vasogénico en el caso de las metástasis e infiltración de células tumorales más allá del límite de la masa tumoral detectable por IRM en los GBM. Este hecho puede aplicarse también en la

OBJETIVO GENERAL

distinción de tumores infiltrativos versus lesiones más circunscritas como los abscesos, que no presentan espectros de patrón patológico en el tejido adyacente a la lesión [48]. Recientemente se han combinado los resultados obtenidos por IERM con los extraídos de estudios de difusión para gliomas de alto grado, relacionando zonas de patrón metabólico anómalo con aquellas en las que la infiltración tumoral es más probable debido a las características de difusión del tejido [51]. Por otro lado, se está trabajando en el desarrollo de clasificadores que combinen datos de IERM e IRM [52]. Además, la IERM es muy útil para diferenciar radionecrosis de recidiva tumoral en pacientes sometidos a ciclos de radioterapia. Los estudios por IRM no permiten distinguir entre tumor recurrente o progresión tumoral y cambios de necrosis o inflamatorios debidos a efectos secundarios de la radioterapia. Estudios con IERM han demostrado que existen diferencias en los cocientes colina/creatina y colina/NAA calculadas en tumor recurrente, parénquima cerebral normal y zonas de radionecrosis [53]. Aunque el desarrollo de las de las técnicas de IERM-PM se encuentre en un estadio preclínico los resultados obtenidos [28] apuntan a que probablemente en el futuro formará parte de las herramientas diagnósticas basadas en ERM/IERM para tumores cerebrales [23,54].

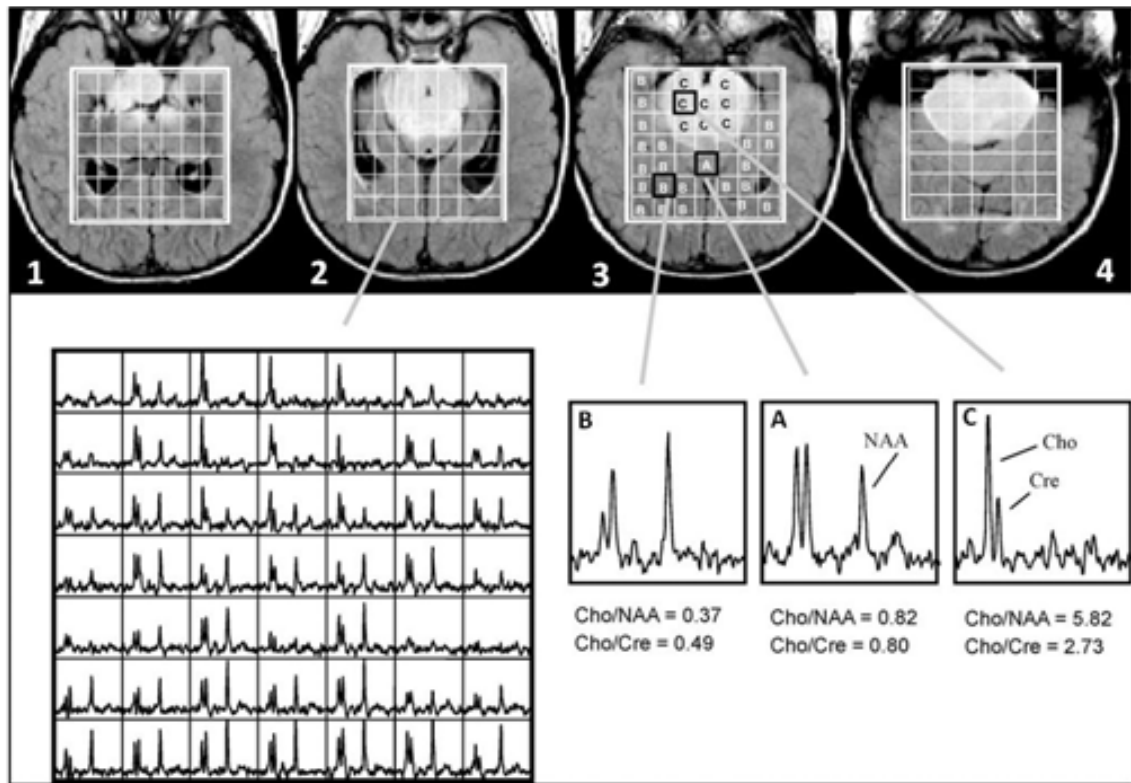


Figura 1.15: Estudio por IERM de un glioma difuso de tronco cerebral en un niño. En la parte superior se muestran los cuatro cortes de IRM en los que se ha adquirido la secuencia de IERM con el *grid* en el VOI de adquisición. En la parte inferior izquierda puede observarse un *grid* conteniendo todos los espectros individuales adquiridos en el VOI. A la derecha se muestran tres espectros individuales extraídos de diferentes regiones espaciales de uno de los *grids*: A y B) Espectros adquiridos en regiones de tejido normal; C) Espectro adquirido en el tumor, conviene tener en cuenta que el patrón por ERM en A, que se encuentra en una zona aparentemente normal por IRM, muestra anomalías espectrales por IERM) (Adaptación de [50]).

Análisis de reconocimiento de patrones

Aunque los radiólogos están altamente familiarizados con la información anatómica proveída por la IRM, no así con la información proporcionada por la ERM/IERM, la cual requiere un “*background*” bioquímico importante para su correcta interpretación.

OBJETIVO GENERAL

En este sentido, son muy útiles las técnicas de reconocimiento de patrones, que analizan objetivamente la información espectroscópica.

El análisis por reconocimiento de patrones consiste en el reconocimiento de patrones de señales. El sistema de reconocimiento debe asignar a cada objeto su categoría o clase (conjunto de entidades que comparten alguna característica que las diferencia del resto).

Un ejemplo de este tipo de aplicación se ha desarrollado durante el proyecto INTERPRET:

El sistema INTERPRET *Decision Support System* v3.1.0 (DSS) (<http://azizu.uab.es/INTERPRET/>) es un sistema de apoyo al diagnóstico desarrollado inicialmente en el proyecto INTERPRET, financiado por la comisión europea (figura 1.16). El objetivo de este proyecto era desarrollar nuevas metodologías que permitiesen automatizar la clasificación de tumores cerebrales humanos utilizando datos de IRM y ERM y fue diseñada para facilitar la incorporación de resultados de análisis de espectros de ERM en el proceso global de diagnóstico establecido para tumores cerebrales.

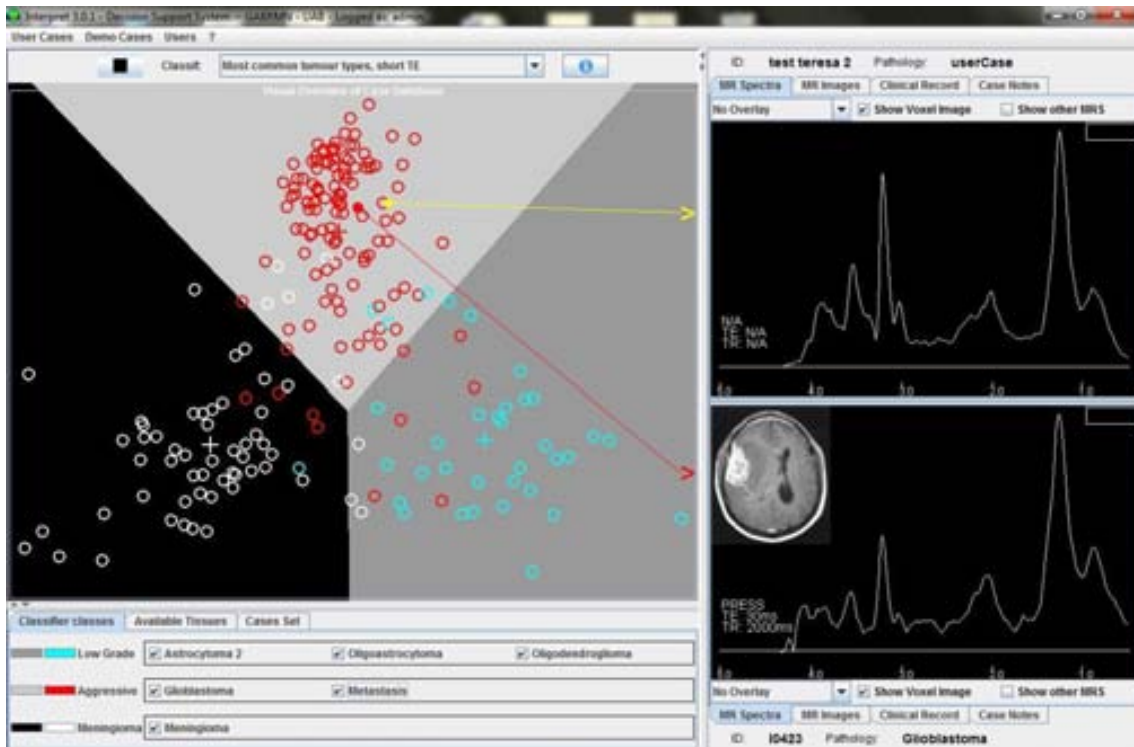


Figura 1.16: Pantalla de la DSS (*Decision Support System*) v.3.0.1 de INTERPRET donde se muestra un ejemplo de clasificación de un espectro de glioblastoma. En la pantalla de la izquierda se observa el universo de la interfaz con tres de los tipos tumorales principales de los que se obtuvieron casos en INTERPRET. Se muestran en rojo los casos de glioblastomas, en blanco los meningiomas y en azul claro los astrocitomas de bajo grado. El caso en amarillo es el caso problema. A la derecha, en la región superior se ve el espectro en estudio y en la región inferior un espectro de GBM vecino en el “universo” de casos de la base de datos de la DSS (con la imagen del voxel del que se obtuvo) [23,55,56].

Otro ejemplo es el *Spectra Classifier v3.0* [57,58], una aplicación en Java que permite a los usuarios crear clasificadores basados en análisis discriminante lineal (LDA). Actualmente se están desarrollando e implementando métodos de clasificación de tumores cerebrales que incluyen datos de ERM e IERM y se basan en el sistema de reconocimiento de patrones, utilizando diferentes tipos de datos pre-procesados de ERM e IERM y representando la información de una manera sencilla de interpretar mediante sus herramientas de visualización.

1.3 AGENTES DE CONTRASTE

Tal y como se introdujo brevemente en la sección 1.1.3.1, el uso de los AC mejora considerablemente la sensibilidad de la técnica de IRM para detectar posibles diferencias entre el tejido normal y el patológico. Históricamente en 1946, Bloch *et al* [59], describió el uso de una sal de nitrato de hierro, paramagnética, para aumentar las velocidades de relajación de los protones del agua. Treinta años después, Lauterbur y Rudin [60] produjeron la primera imagen por RM mediante el uso de la sal de manganeso Mn (II) con el fin de distinguir entre los diferentes tejidos, basado en las diferentes velocidades de relajación. La fuerte expansión de la imagen médica ha llevado al desarrollo de nuevas clases de agentes de contraste para IRM basados en sustancias paramagnéticas y superparamagnéticas que están diseñados para la administración a pacientes, ya sea para mejorar el contraste entre tejido normal y patológico, o para evaluar la funcionalidad habitual normal del órgano o el flujo de sangre en el tejido [61].

Dichos agentes actúan disminuyendo el T_1 y el T_2 de los protones del agua con los que están en contacto y por lo tanto se describen como "agentes T_1 " o "agentes T_2 " (o de contraste positivo y negativo, respectivamente) dependiendo de si la reducción relativa de los tiempos de relajación causada por el agente de contraste es mayor para los tiempos de relajación longitudinales (T_1) o transversales (T_2).

Los "agentes T_1 " son paramagnéticos mientras los "agentes T_2 " son superparamagnéticos de manera natural. Los primeros tienen un momento magnético permanente. En solución acuosa, se establece una interacción magnética dipolar entre el momento magnético electrónico del átomo paramagnético y los momentos magnéticos mucho más pequeños de los protones de las moléculas de agua

OBJETIVO GENERAL

circundante. Fluctuaciones aleatorias en esta interacción magnética dipolar, principalmente como resultado de los movimientos moleculares, puede reducir los tiempos de relajación tanto longitudinales (T_1) como transversales (T_2) de los protones de agua, aunque la reducción en T_2 es menor que en el T_1 . Por otro lado, los agentes de contraste T_2 son usualmente partículas de óxido de hierro formados por varios miles de iones con momento magnético. Las propiedades superparamagnéticas aparecen cuando los iones magnéticos están alineados en presencia de un campo magnético externo, resultando en partículas con un gran momento magnético únicamente en presencia de dicho campo externo.

En los tumores cerebrales en particular, los agentes más utilizados en clínica son los AC paramagnéticos basados en Gd^{3+} [62]. Dicho ion tiene siete electrones desapareados que lo hacen el ion metálico paramagnético más estable (es el ion metálico paramagnético de mayor efecto sobre la relajatividad del agua) [61,63,64].

El uso de agentes de contraste basados en óxido de hierro (agentes T_2) es más limitado debido a una serie de inconvenientes tales como su contraste “negativo” (disminución de señal en lugar de aumento de esta) y el tamaño relativamente grande de las partículas a utilizar [63,65], que puede conllevar problemas en cuanto a su distribución y nanotoxicidad.

Los agentes de contraste basados en Gd^{3+} presentan limitaciones importantes: el átomo de Gd^{3+} en solitario es tóxico, y por este motivo se utiliza conjuntamente con agentes quelantes que con él, forman complejos termodinámicamente estables y cinéticamente inertes. En clínica es habitual el uso de complejos de Gd^{3+} como Magnevist[®] (Gadopentetato de Dimeglumina) $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$ y Dotarem[®] (Gadoterato de Meglumina) $[Gd(DOTA)(H_2O)]^-$. Los complejos paramagnéticos de

OBJETIVO GENERAL

Gd³⁺ mejoran la señal de las imágenes ponderadas en T₁ (aumentando la señal en los sitios donde están presentes) y por lo tanto, las imágenes son más brillantes (hiperintensas). Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos agentes requieren una ruptura de barrera hematoencefálica para acceder a la localización del tumor cerebral, lo que suele producirse en general en grados avanzados de dicho tumor, retrasando por lo tanto su diagnóstico diferencial. Estos agentes son generalmente inyectados a una concentración milimolar, porque no son específicos y su relajatividad es relativamente baja ($\sim 3\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) [66].

Una de las estrategias utilizadas para aumentar, potencialmente, la capacidad de relajación de estos agentes *in vivo* es disminuir la facilidad de su movimiento de rotación (aumento del tiempo de correlación) del complejo mediante el uso de conjugados macromoleculares de quelatos de Gd³⁺ [67]. Estos macro-conjugados tienen otra ventaja sobre los quelatos clásicos de Gd³⁺: una vida útil en la sangre más prolongada, lo cual es de utilidad para ciertas aplicaciones en resonancia magnética. Sin embargo, pocos de estos productos macromoleculares basados en Gd están aún aprobados para humanos. La mayoría de agentes de contraste actualmente utilizados no son específicos y además, son mucho menos eficientes que lo previsto por la teoría. Además, es conocida la posible asociación de estos agentes con la fibrosis sistémica nefrogénica [68].

Por todo esto, se hace importante la investigación con vistas a producir nuevos AC, más específicos, eficientes y seguros. Dentro de la investigación en el campo de nuevos agentes de contraste, la nanotecnología ofrece un enorme potencial para la tecnología biomédica del futuro. Así, han surgido nuevos materiales nanoestructurados como potenciales agentes de aplicación en el diagnóstico y enfoques terapéuticos médicos futuros. Ello es debido a sus características únicas reunidas en la misma

OBJETIVO GENERAL

“plataforma”, tales como su comportamiento superparamagnético, sus propiedades fluorescentes (dependiendo del agente), así como su tamaño comparable a las biomoléculas. Especialmente, los nanomateriales con diferentes propiedades pueden actuar como plataformas médicas multifuncionales, que hacen posible llevar a cabo la adquisición de imágenes multimodales, con uso diagnóstico, pero también para terapia, de manera simultánea [69,70]. Las nanopartículas poliméricas, incluyendo los dendrímeros, también se han explorado ampliamente para el diagnóstico y terapia [71]. Los materiales nanoparticulados “naturales”, tales como virus o lipoproteínas, también han sido empleados para una variedad de aplicaciones, tales como la administración de genes y también para producir contraste en IRM [72,73]. Éstas pueden ser combinadas con nanopartículas inorgánicas para crear las llamadas nanoestructuras híbridas, que pueden ser adaptadas para aplicaciones específicas tales como el transporte de fluidos con funciones farmacológicas y el suministro controlado de medicamentos, entre otras [74]. Las nanopartículas de óxido de hierro y de oro fueron pronto reconocidas por tener características extraordinarias tanto para el diagnóstico, como para la terapia [75,76]. Por ejemplo, las nanopartículas de óxido de hierro se han utilizado ampliamente como contraste para la imagen de resonancia magnética (IRM) [65]. Por otra parte las nanopartículas de oro puede ser utilizadas, de forma híbrida con óxidos de hierro o solas en la detección óptica [77] así como para aplicaciones relacionadas con el tratamiento con hipertermia [78,79].

El desarrollo de agentes de contraste con potencial de vectorialización específica, capaces de reconocer moléculas o receptores característicos de un determinado tejido o patología, tendría un impacto clínico significativo. Una de las maneras de acercarse a esta meta es desarrollar una plataforma para la fijación de los AC a polímeros o polisacáridos, formando agentes de contraste nanoparticulados que además permiten su derivatización con sustancias adicionales que permiten dicha vectorialización

OBJETIVO GENERAL

[80,81]. Las nanopartículas, por lo tanto, aparecen como candidatos prometedores para las plataformas de imagen molecular vectorializadas. Dentro de los agentes de contraste de tamaño nanométrico, se encuentran las gliconanopartículas (GNP) con un núcleo de oro y unidas a glúcidos y a quelatos de gadolinio [82] como nuevas herramientas polivalentes que imitan glicoesfingolípidos de la superficie celular. Pequeñas modificaciones en la estructura química de las GNPs podrían dar lugar a grandes cambios en el potencial de producción de contraste, ya que podrían afectar, por ejemplo, el número de hidratación del (Gd^{3+}) o el tiempo total de correlación del AC, que, tal como se ha comentado previamente, puede tener una gran influencia en su capacidad de ejercer efectos de relajación en los protones adyacentes del agua del tejido estudiado.

En relación a los AC negativos, el óxido de hierro es el material más investigado de nanopartículas para uso como agente de contraste negativo en técnicas biomédicas debido a su alto momento magnético, la estabilidad química en condiciones fisiológicas y su baja toxicidad [83,84]. Además, modificaciones en la superficie de estos AC negativos pueden mejorar su rendimiento, haciéndolos más selectivos y por lo tanto más eficientes, por ejemplo, mejorar su estabilidad coloidal y proporcionar mayor área superficial para funcionalización [85,86]. Sin embargo, algunas de las modificaciones introducidas en las nanopartículas para la funcionalización pueden alterar sus propiedades superparamagnéticas (y, por lo tanto, el efecto de contraste obtenido) que deben ser evaluados antes de seguir adelante con el desarrollo de las mismas.

Para analizar el rendimiento de los nuevos candidatos a agentes de contraste se requieren ensayos exhaustivos de relajatividad *in vitro*, ensayos preliminares de toxicidad así como estudios *in vivo*, lo que requiere el consumo de grandes cantidades

OBJETIVO GENERAL

de AC, las cuales no siempre están disponibles. Por consiguiente, en una selección preliminar de una serie de nuevos AC, es importante escoger compuestos candidatos con un buen potencial de eficacia *in vivo*, para reducir al mínimo el tiempo y el coste invertidos en su desarrollo. La mayor parte de las estrategias *in vitro* usadas para evaluar el rendimiento de un agente de contraste no son capaces de reproducir correctamente las condiciones *in vivo*, lo que puede modificar su capacidad de generar contraste a nivel preclínico o clínico [82,87,88].

Se han utilizado diferentes aproximaciones para mejorar esta situación. Por ejemplo, Fries y colaboradores [89] han utilizado directamente un enfoque *in vivo* utilizando animales con tumor, sin ningún paso intermedio descrito entre los tests *in vitro* e *in vivo*. Alternativamente, Cosentino y colaboradores [88] han intentado métodos computacionales de simulación para predecir el comportamiento de un agente de contraste. Por otro lado, Högemann y colaboradores [90] han analizado varios tipos de nanopartículas superparamagnéticas unidas a un péptido, incubándolas con una línea celular de gliosarcoma para comprobar la interacción y la internalización del AC usando IRM. Aunque dicho método puede ser útil para el análisis del rendimiento de potenciales AC, el entorno *in vivo* no está completamente reproducido en los cultivos celulares utilizados. Es decir, además de la capacidad de producción de contraste con las células del tejido diana, también es necesario considerar la capacidad del AC para alcanzar dicho tejido y su interacción con la matriz extracelular así como con sustancias liberadas por otras células.

Sería útil, entonces, desarrollar un método fiable para evaluar el potencial de un nuevo candidato a AC antes de ir a estudios *in vivo*. Para ello puede ser conveniente tener en cuenta algunas estrategias *ex vivo* que se han utilizado tanto para estudiar el potencial de producción de contraste del AC *in vivo* [91] como para evaluar las diferencias en su

cinética de eliminación debido a la estructura molecular del agente de contraste [92], o la capacidad del AC para internalizarse y ser retenido por las células [93], aunque es evidente que los mecanismos dinámicos de eliminación presentes *in vivo* están ausentes *ex vivo*.

Otro aspecto a tener en cuenta es la interacción del AC con macromoléculas o proteínas de membrana que podrían restringir la movilidad general del quelato, con el consiguiente cambio en su relajatividad [94]. Este tipo de efectos no pueden ser evaluados fácilmente *in vitro* y ello podría conducir a conclusiones erróneas cuando se elige un compuesto entre una serie de potenciales AC. En conjunto, el método estándar *in vitro* para evaluar el rendimiento del AC, el cálculo de su relajatividad [95], puede no ser un buen indicador del rendimiento *in vivo* y no se ha descrito aún un método "ideal" *post-mortem* de evaluación en modelos preclínicos.

En resumen, el desarrollo de nuevos y mejores AC podría beneficiarse del uso de un método rápido y fiable para seleccionar AC con buen potencial de producción de contraste *in vivo* entre una serie de compuestos candidatos, y que fuese capaz de reproducir lo más fielmente posible el entorno biológico que se dará *in vivo*. Además, preferiblemente, este método debería llevarse a cabo con pequeñas cantidades de material, dado que muchas veces la síntesis del AC puede ser costosa o compleja.

1.2.3 Modelos animales de la patología tumoral cerebral

Actualmente, muchos de los avances en la caracterización de los tumores cerebrales, así como en la mejora de su diagnóstico y tratamiento se están llevando a cabo en modelos animales que desarrollan la enfermedad de manera muy semejante al ser

OBJETIVO GENERAL

humano. No obstante, ningún modelo animal es perfecto, dado que los gliomas humanos presentan un comportamiento biológico y clínico muy heterogéneo.

De manera resumida, los modelos animales se pueden dividir en dos grandes clases: Los modelos “transplantables” y los modelos “in situ” [96] (equivalente a los modelos manipulados genéticamente de desarrollo espontáneo de tumores), (esquema en la figura 1.17). Por su mayor rapidez en el desarrollo y mayor penetrancia y reproducibilidad, los modelos transplantables (sobre todo los de inoculación directa de células) son más utilizados, aunque es sabido que su desarrollo extremadamente rápido no recapitula la mayoría de los comportamientos observados en gliomas humanos, donde el periodo de desarrollo suele ser mucho mayor.

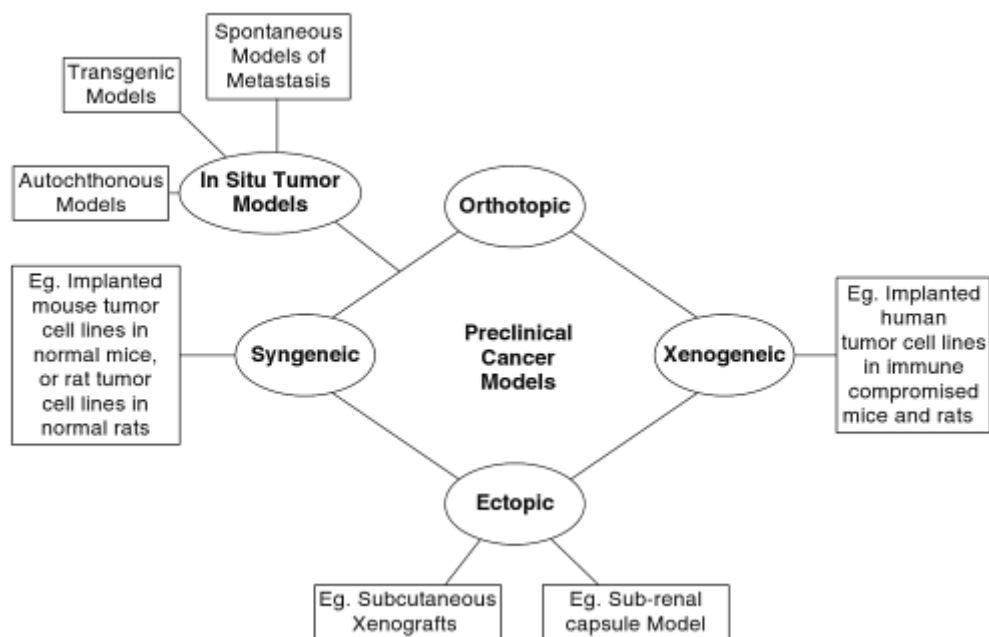


Figura 1.17: Representación esquemática de las principales categorías de modelos preclínicos de tumores cerebrales en uso. Los modelos *in situ* pueden ser subcategorizados por el método de inducción del tumor. Los modelos transplantables de tumor son comúnmente subcategorizados dependiendo de si el tumor ha sido implantado en el órgano del que la línea celular es originario (ortotópico vs ectópico) y de la especie del cual es originario (singénico vs xenogénico). Figura adaptada de [96].

Modelos transplantables de tumores preclínicos

Los primeros intentos de desarrollar modelos transplantables singénicos a partir de los tumores sólidos se remontan a los años 60-70, tal y como exponen en su revisión McConville *et al*, de tumores de colon y páncreas, entre otros [97]. Dentro de los modelos transplantables preclínicos, hay muchas variantes. Inicialmente, y ya centrándonos en los modelos preclínicos de tumores cerebrales murinos, que serán los estudiados en esta tesis, estos se pueden dividir entre la inyección estereotáctica de células de glioma en parénquima cerebral, bien de líneas celulares de ratón (modelos *allograft singénicos*) o de muestras obtenidas de biopsias de tumores humanos (modelo *xenograft*). Una de las características favorables de los modelos *allograft* es que puede ser llevado a cabo en animales inmunocompetentes, evitando posibles problemas de enfermedades concomitantes con el tumor que pudiesen presentar los animales inmunodeprimidos [98-100].

Otra posible variante de los tumores transplantables sería el sitio de inyección de la células tumorales, que puede ser ortotópico (el mismo sitio donde tuvieron origen), o ectópico (en un sitio distinto al original) [101]. Algunos autores, por comodidad, optan por el modelo ectópico transplantable, sobre todo en tumores cuyo sitio ortotópico era muy profundo o de difícil evaluación (p.ej. en casos de respuesta a alguna terapia), aunque hace 20 años ya se sugería que el efecto del entorno del tumor puede afectar el comportamiento/respuesta de éste [102].

Estudios previos [103,98] han demostrado la importancia del entorno del “huésped” (animal receptor) en la migración de las células tumorales [104,105]. Por ejemplo la presencia de factores específicos en el huésped como el proto-oncogen tirosina-kinasa (src) en el endotelio del cerebro es esencial para la ruptura de la BHE en el tumor y la invasión glioma [105,106].

Modelo ortotópico de glioma murino del alto grado: GL261

La línea GL261 de glioma de ratón es una de las más utilizadas para el estudio de GBM y se inocula normalmente en animales de la cepa singénica C57BL/6, dando lugar a tumores con características invasivas e infiltrativas similares a las de los GBMs humanos [107]. Dichos tumores crecen de manera exponencial durante, aproximadamente, cuatro semanas, ocasionando la muerte de los animales por efecto de masa al final de este período de tiempo. Además, estudios que correlacionan los hallazgos sobre angiogénesis tumoral obtenidos por IRM (volumen sanguíneo cerebral relativo) e histopatología (marcadores de densidad vascular) en este modelo, han demostrado que la IRM es una técnica no invasiva capaz de caracterizar la evolución de este modelo y por tanto aplicable en estudios de mejora del diagnóstico y de respuesta a terapia [108]. Estudios sobre alteraciones génicas, características inmunológicas y sensibilidad a la radiación demuestran la utilidad del modelo GL261 para investigar el efecto anti-tumoral de diversas estrategias terapéuticas: inmunoterapéuticos, terapia génica, quimioterapia, radioterapia o terapia antiangiogénica, teniendo en cuenta la moderada inmunogenicidad intrínseca de las células GL261 en la cepa C57BL/6 [109].

Por otro lado, es cierto que los modelos inducidos, a pesar de tener la ventaja de presentar un rápido desarrollo tumoral y de ser muy reproducibles no representan exactamente las características de angiogénesis e invasividad de los tumores cerebrales humanos. Por ello, se han desarrollado modelos transgénicos en los cuales los tumores aparecen de manera espontánea a lo largo de la vida de los animales, emulando de una manera más precisa la evolución de la enfermedad en humanos [110,111].

Otros intentos de modelos transplantables a partir de tumores sólidos:

Distintos autores han llevado a cabo intentos de establecer modelos transplantables a partir de tumores sólidos. Para obtener el modelo singénico, en general la estrategia es inducir el desarrollo de tumor en un animal, de manera espontánea, y luego “perpetuar” esa línea en otros animales de la misma especie. No obstante, este tipo de estrategia requiere una expansión de las células tumorales lo que inevitablemente supone o bien un paso de cultivo *in vitro*, o bien etapas de crecimiento subcutáneo en los mismos animales, lo que puede presentar ciertos inconvenientes. Por ejemplo, en 1984, Corbett *et al* [97] en su estudio habían detectado algunos cambios en las características de células tumorales originales al pasarlas por un cultivo “*in vitro*” antes de implantarlas otra vez en subsecuentes animales, como por ejemplo la producción intrínseca de edema o ulceraciones locales. Barket *et al*, [112], también observaron cambios en la morfología del tumor obtenido después de los cultivos *in vitro*, aunque este tiempo fue largo (empezando aproximadamente en 3 meses de pases entre animales). Aunque en este estudio el tumor generado recapitulaba bastante bien el tumor original, histopatológicamente presentaba formas nucleares más anómalas y más zonas de necrosis. En dicho estudio, el tumor que originalmente era un astrocitoma de grado III mostró que, tras 6 meses de cultivo *in vitro*, empezaba a presentar elementos compatibles con un sarcoma, lo que, incluso, a tiempos más largos de cultivo de dichas células *in vitro*, modificaba la supervivencia global de los animales con los tumores transplantados, disminuyéndola, lo que supuso por tanto un paso de grado III a grado IV.

Es, por lo tanto preferible que el tumor transplantable lo sea hacia el mismo entorno del que se originó, y que no sufra un cultivo demasiado largo “*in vitro*” para evitar posibles modificaciones en la biología y comportamiento del tumor resultante. Hay que tener en cuenta también que el tumor transplantable, en todo caso, recapitulará en

OBJETIVO GENERAL

mayor o menor medida el tumor de origen, pero puede no ser representativo de toda la clase histopatológica a la que pertenece.

La expansión de los tumores para trasplante – cultivos *in vitro*, obtención del estadio gliosferas en el caso de los tumores gliales, nos ofrece el potencial de perpetuar de manera reproducible las características biológicas del tumor del cual fueron generadas, además de asegurarnos la continuidad genotípica del animal del cual se extrae el tumor. Una vez generadas estas gliosferas [113], podemos contar con un modelo transplantable en cualquier momento, dado que se pueden congelar y volver a inducir tumores en los animales de experimentación.

Modelos “in situ” o de desarrollo espontáneo de tumores

Estos modelos se basan en la expresión de transgenes o el silenciamiento *knock-out* de determinados genes involucrados en el desarrollo de tumores cerebrales humanos primarios, por lo que son capaces de reproducir sus patrones de progresión [114]. Uno de los ejemplos más representativos son los modelos murinos llamados *genetically engineered mice* (GEM).

En esta tesis se ha tenido acceso a varios tipos de ratones GEM (ver capítulo 1 para detalles adicionales) algunas características principales de las cuales se introducen a continuación. Para facilitar el seguimiento de dichos modelos se ha adoptado una codificación arbitraria, nombrando cada tipo con una letra de “colonia de cría” (S, P, G, N, y R)

Colonia S:

OBJETIVO GENERAL

Los ratones pertenecientes a la colonia "S": ($s100\beta$ -v-erbB / Ink4a-Arf (+/-)) son animales que principalmente generan oligodendrogliomas de grado II.

Una de las características de los oligodendrogliomas es la desregulación de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). Los factores de crecimiento pertenecen a una familia de polipéptidos que se unen a sus correspondientes receptores y estimulan la proliferación y diferenciación celular tanto en las células normales como en las malignas. Uno de los receptores de factores de crecimiento cuya unión a su ligando específico lleva a la proliferación celular es el EGFR cuyo gen se encuentra en el cromosoma 7 en la región 7p12 [115].

En el modelo murino de la colonia S se utiliza el promotor de proteína S-100 β (una proteína que se expresa en células progenitoras de oligodendrocitos) [116], para generar ratones transgénicos que expresen v-erbB un alelo de transformación de EGFR, el cual es estructural y funcionalmente similar a EGFR (una versión truncada y constitutivamente activa) [111], y como resultado se obtienen tumores infiltrantes que reflejan las características histopatológicas de los oligodendrogliomas humanos.

Son animales transgénicos heterocigotos para ink4a/arf. La pérdida de heterocigosidad de Ink4a/Arf es decir, que se pierde el alelo normal ink4a/arf que quedara después de que el otro hubiera mutado, con lo que solo queda en esa célula la expresión del mutado inicial que pasa a ser entonces dominante común en los oligodendrogliomas de alto grado en los seres humanos y se asocia con una supervivencia más corta [117]. Estos ratones presentan homocigosis de Ink4a/Arf, lo que ayuda al desarrollo de tumores con latencia corta, aumento de penetrancia, y aumento del grado patológico.

Colonia P

OBJETIVO GENERAL

Los animales pertenecientes a las colonia "P": S100B-v-erbB/p53(+/-), son animales que generan oligodendrogliomas de alto grado. Para la generación de estos ratones el grupo productor (ver sección 3.2.1.3 en métodos del capítulo 1) utilizó el promotor de la proteína S100 β para generar ratones transgénicos que expresaban v-erbB, un alelo de transformación de EGFR en sus células precursoras de oligodendrocitos como en la colonia S, y como resultado se obtienen tumores muy infiltrantes que reflejan las características histopatológicas de los oligodendrogliomas humanos.

Los oligodendrogliomas humanos se caracterizan por: a) la desregularización de la vía de crecimiento dependiente de EGFR, b) la inactivación de los supresores de tumor INK4a/Art y/o PNET y c) La mutación de p53 [115,118]. Los oligodendrogliomas humanos muestran también una combinación de la pérdida del brazo corto del cromosoma 1 y el brazo largo del cromosoma 19 o una mutación en p53 lo que permite su progresión tumoral [119]. Varios de los cambios moleculares mencionados se encuentran presentes en los ratones de la colonia P.

Según los proveedores de las colonias S y P originales (grupo W.A. Weiss ver sección 3.2.1.3), la colonia P tenía un tiempo de latencia inferior para la aparición de tumores espontáneos y se generaban oligodendrogliomas mas bien de tipo anáplastico.

Colonia G

Entre las colonias estudiadas en esta tesis se encuentra también la colonia G (GFAP-v-src) la cual genera animales que desarrollan tumores astrocíticos de grado intermedio. Es conocido que la expresión constitutiva de la proteína tirosin kinasa viral (SRC) homologada del dominio tirosin kinasa del EGFR es capaz de generar tumores neuroectodérmicos en roedores [120] y estos gliomas experimentales pueden ser inducidos por inoculación intracerebral del virus del sarcoma de Rous (RSV) en

OBJETIVO GENERAL

perros [119]. En un estudio inmunohistoquímico incluyendo 108 tumores cerebrales humanos, en varios de ellos se encontró que eran positivos para SRC mientras que en el tejido normal cerebral eran negativos [121]. Es por ello que una de las características principales de este modelo tumoral es la presencia de la secuencia de codificación de SRC tirosin kinasa viral del virus de sarcoma de Rous (RSV) (en esencia homóloga a un EGFR truncado, sin dominio extracelular), bajo control de los elementos reguladores del gen GFAP, proteína que aumenta su expresión en el proceso de diferenciación de los astrocitos [122].

Colonia N

Otra de las colonias GEM estudiadas en esta tesis fue la colonia N, (Nf1-Trp53(+/-)). Como es bien conocido, los astrocitomas son tumores altamente infiltrativos. En este sentido un modelo de ratón para astrocitomas debe ser capaz de permitir hacer un seguimiento de la progresión tumoral que permita la prueba de agentes terapéuticos en distintos estadios de dicha progresión. Los modelos astrocíticos hasta ahora comentados fueron diseñados para expresar principalmente proteínas oncogénicas en astrocitos, aunque presentaban limitaciones importantes, como su baja penetrancia tumoral o la limitada progresión del tumor [123,124]. Por otra parte los ratones pertenecientes al modelo N, presentan la mutación de dos genes supresores de tumor Nf1 y p53. Las mutaciones en Nf1, en pacientes humanos causan desarrollo de neurofibromatosis tipo I (Nf1) y, estas presentan un elevado riesgo de progresar a gliomas, astrocitomas y glioblastomas [125,126]. El supresor de tumor p53 a menudo lleva al desarrollo de un subconjunto de astrocitomas que se presentan a edades tempranas y tienen un progreso lento a glioblastoma (tipo secundario por tanto). Los glioblastomas secundarios, progresan más lentamente que los primarios.

El modelo de ratón GEM de la colonia N debería mostrar un rango de etapas del astrocitoma desde astrocitoma de bajo grado a glioblastoma multiforme y se suponía

OBJETIVO GENERAL

que modelaba con exactitud un glioblastoma secundario humano con la pérdida de p53 normal. Este fue uno de los primeros modelos reportados para astrocitomas en grados bajos ocasionados por la pérdida de genes supresores de tumor [127,128]

Colonia R

Los animales de esta colonia desarrollan astrocitomas. El modelo RasB8 [127] está caracterizado por la presencia del transgen GFAP-V¹² HA-*ras* cuya expresión es regulada por el promotor específico de astrocitos *Glial fibrillary acid protein* (GFAP), como en el caso de la colonia G. Además el gen Lac Z que codifica para la proteína β -galactosidasa también es parte de la construcción transgénica y está bajo el control del mismo promotor. Por lo tanto, dicho Lac Z puede utilizarse como control de la incorporación del transgen. Los ratones RasB8 se obtuvieron por parte del grupo desarrollador del modelo por la técnica de transfección de un retrovirus que lleva el gen de interés y un marcador que solo se expresa en células madre embrionarias de ratón. Después de la selección positiva, las células se transfieren a una hembra pseudo-preñada, con el fin de crear embriones quiméricos. Los ratones quiméricos se cruzan con ratones normales y aquellos que incorporaron el transgén en su línea germinal generaran descendencia transgénica. La sobreexpresión del gen V¹² HA-Ras, aunque no es una aberración primaria molecular clásica de los astrocitomas humanos, inicia la secuencia de acontecimientos genéticos que conduce al desarrollo de astrocitomas en ratones. Los ratones RasB8 muestran una progresión similar tanto a nivel patológico como molecular a los astrocitomas humanos [127,129]. Los ratones que expresan dicho transgen desarrollan astrocitomas con polimorfismo mitótico y astrocitos infiltrativos y también están asociados con un aumento de vascularización y necrosis [127]. Además, varias de las alteraciones genéticas asociadas con astrocitomas humanos de bajo y de alto grado fueron también observadas en este

OBJETIVO GENERAL

modelo de ratón, incluyendo el aumento de expresión de EGFR y VEGFR, así como cambios en la expresión o mutaciones de p53 [129].

2. OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de la presente tesis fue:

Mejorar los modelos preclínicos accesibles de tumores cerebrales humanos para futuros estudios de imagen molecular de progresión tumoral y de respuesta a la terapia.

Dentro de dicho objetivo general la tesis se ha desarrollado en dos capítulos de mejora de dichos modelos preclínicos:

Capítulo 1: Descripción y caracterización de las colonias de “Genetically Engineered Mice” (GEM) accesibles al GABRMN.

Capítulo 2: Intento de generación de un modelo transplantable de tumor cerebral murino de bajo grado

Y, finalmente, en un capítulo dedicado a una aplicación del estudio de dichos modelos.

Capítulo 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*.

3. CAPITULO 1: DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS COLONIAS DE “GENETICALLY ENGINEERED MICE” (GEM) ACCESIBLES AL GABRMN.

3.1 SUB OBJETIVOS

- Caracterizar genotípicamente las diferentes colonias de animales GEM introducidas en la sección 1.2.3, identificando los animales poseedores de los genotipos de interés para detección y estudio de posibles masas tumorales y su caracterización por IRM/ERM/ IERM.

- Realización de estudios preclínicos de IRM/ERM/IERM, además de estudios histopatológicos, para la caracterización de las colonias y de los tumores desarrollados por los animales que las componían.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los animales de la colonia S y P se obtuvieron del repositorio MMHCC del NCL, Estados unidos, los animales de la colonia G del repositorio EMMA de Monterotondo Italia, los animales de la colonia N a través de una colaboración con la Dra Karlyne Reilly, co-desarrolladora del modelo finalmente la colonia R fue obtenida del laboratorio del Dr. A. Guha's en Toronto, Ontario, Canada.

3.2.1 Caracterización genotípica

Se realizó la caracterización genotípica de 5 diferentes colonias de animales GEM. Las colonias con las que se trabajaron fueron las siguientes:

- S: s100 β -v-erbB / inK4a-Arf (+/-).
- R: GFAP-V12 HA-*ras* B8 (RasB8)
- P: S100B-v-erbB/p53(+/-)
- N: Nf1-Trp53(+/-)
- G: GFAP-v-src.

3.2.1.1 Identificación de los animales y obtención de las muestras

Pasadas 3 semanas desde el nacimiento de los animales, se procedió a marcar las orejas de cada ratón con “muecas” (agujeros troquelados circulares, en ambos pabellones auriculares) figura 3.1, de manera de generar un patrón único de marcas para cada animal dentro de una determinada jaula (1,2,3 muecas y combinaciones entre las dos orejas), el número máximo de animales por jaula era de 8.

Para la extracción del ADN se cortó un pequeño trozo del extremo de la cola (4 mm), el cual se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso. El extremo de la cola de los animales se cauterizó inmediatamente para evitar un sangrado excesivo.

CAPITULO 1:
**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**



Figura 3.1: Esquema de la forma en que se hicieron las marcas para la identificación de los ratones.

3.2.1.2 Extracción de ADN

Se puso un fragmento de 4mm de la cola de cada ratón en 30-40 μ l de solución de lisis en un tubo de eppendorf de 0,5 ml. La solución de lisis fue preparada mezclando: 75 μ l de tris-HCl pH = 8, 5mM, 3 μ l de EDTA 1 mM, 15 μ l de SDS 0,2%, 6 μ l de NaCl 20 mM, 15 μ l de proteinasa K a 100 mg/l y 1386 μ l de H₂O.

Las colas permanecieron en la solución de lisis durante toda la noche en un baño de agua a 55°C. La solución fue posteriormente llevada a temperatura ambiente (~24°C), y se le añadió 200 μ l de H₂O. A continuación, la solución se agitó en el vórtex por aproximadamente 10 segundos. Las muestras se calentaron a 100°C durante 5 minutos en un baño de vapor (Digital Dry Bath, Labnet international Inc), y finalmente fueron centrifugadas a 16.300xg (microcentrifuga Spectrofuge 24D) por 5 minutos. El sobrenadante, que contenía el ADN, fue recuperado y transferido a un eppendorf de 0,5 ml.

CAPITULO 1:
**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

3.2.1.3 Amplificación del ADN

Cinco diferentes protocolos de PCR, que se describirán a continuación, fueron utilizados para la amplificación del ADN, cada uno correspondiente a las diferentes colonias de animales estudiado.

Paralelamente y con la finalidad de control del correcto desarrollo de la PCR, se amplificaron también genes “constitutivos” (tubulina), protocolo común a todas las colonias y que se describirá en la sección 3.2.1.3.1. Todos los encebadores citados a continuación se adquirieron de Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Germany.

PCR Colonia S: s100 β -v-erbB / Ink4a-Arf (+/-)

Para la amplificación del gen S100 β -v-ErbB se utilizaron los encebadores 5'-CTCACAGCAATCTCAAAGCTCCCC-3' y 5'-AGCCTCCAAAGTCAGGTTGATGAGC-3', según lo descrito en [111]. Para Ink4a-Arf(+/-) se utilizaron tres encebadores diferentes (para analizar los dos supresores tumorales)

5'-GTGATCCCTCTACTTTTTCTTCTGACTT-3', 5'-GAACGCAAATATCGCAC-3', y 5'-GAGACTAGTGAGACGTGCTACTTCCA-3'. El protocolo de PCR fue el siguiente: ([temperatura (°C)/duración (min)] / número de ciclos): [95/5] / 1; [(95/1), (60/0,5), (72/2)] / 29; [72/10] / 1

PCR Colonia R: GFAP-V12 HA-ras B8 (RasB8)

Para la amplificación del gen GFAP-V12 HA-ras se utilizaron los encebadores (GFAP-GFP 5'-ACTCCTTCATAAAGCCCTCG -3' localizado en el promotor GFAP y encebador inverso Ras: 5'-CTCGAATTCTCAGGAGAGCACACA CTT-3' localizado en la región 3' del

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

HA-*ras* cADN [127]. El protocolo de PCR fue el siguiente: ([temperatura (°C)/duración (min)] / número de ciclos): [94/10]; [(94/1), (52/1), (72/2)], [72/1]/ 39; [72/5] / 1.

Para la amplificación del gen Lac Z se utilizaron los encebadores, (LacZ): 5'-CCA GCTGGCGTAATAGCG AAG -3' y encebador inverso (LacZ): 5'-CATCGTAACCGT GCATCTGCC-3'. El protocolo de PCR fue el siguiente: ([temperatura (°C)/duración (min)] / número de ciclos): [94/10]; [(94/1), (62/1), (72/1)], / 39; [72/5] / 1.

PCR colonia P: S100B-v-erbB/p53(+/-)

Para la amplificación de los genes S100B-v-erbB/p53(+/-) se utilizaron los siguientes encebadores: wt P53-wt1 5'-GTGTTTCATTAGTTCCCCACCTTGAC-3', P53-wt2 5'-CTGTCTTCCAGATACTCGGGATAC-3', y los mutantes P53-M1 5'-GGGACAGCCAAG TCTGTTATGTGC-3', P53-M2 5'-TTTACGGAGCCCTGGCGCTCGATGT-3'. El protocolo de PCR fue el siguiente: ([temperatura (°C)/duración (min)] / número de ciclos): [94/3] / 1; [(94/1), (57/1)] / 29; [72/1] / 1; [72/10] / 1; [4/5] / 1.

PCR colonia N: Nf1-Trp53(+/-)

Para la amplificación de los genes Nf1 y p53 se utilizaron los siguientes encebadores X6.5, 5'ACAGCGTGGTGGTACCTTAT3', X7, 5'TATACTCAGAGCCGGCCT3', Neo18, 5'CTATCAGGACATAGCGTTGG3', Nf1wt, 5'TTCTGGCCTTATTGGACACC3', NFcm, 5'GCACAAAAGAGGCACTGG AT3', NF1mt, 5'GGAGAGGCTTTTTGCTTCCT3'. El protocolo de PCR fue el siguiente: ([temperatura (°C)/duración (min)] / número de ciclos): [94/3] / 1; [(94/1), (57/1)] / 29; [72/1] / 1; [72/10] / 1; [4/5] / 1.

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

PCR colonia G: GFAP-v-src:

Para la amplificación del gen GFAP-v-src se utilizaron los siguientes encebadores 5'TGGAGCGCAGACGCATCAC-3', 5'GCAGCACACAGACAAAAGCG-3'. El protocolo de PCR fue el siguiente: ([temperatura (°C)/duración (min)] / número de ciclos): [94/3] / 1; [(94/1), (57/1)] / 29; [72/1] / 1; [72/10] / 1; [4/5] / 1.

3.2.1.3.1. Protocolo de amplificación y PCR del gen constitutivo

El gen constitutivo tubulina se utilizaba como control en todos los casos, excepto en la colonia R para el gen LacZ, dado que la similitud de los fragmentos producidos causaba superposición con el gen constitutivo. En este caso se utilizó el gen de la actina.

Los encebadores para la tubulina fueron: 5'-TCGTGGAATGGATCCCCAAC-3' y el encebador inverso: 5'-CTCCATCTCGTCCATGCCCT-3' y los encebadores para la actina fueron: 5'-ACTCTTCCAGCCTTCCTTC-3' y el encebador inverso: 5'-ATCTCCTTCTGC ATCCTGTC-3'. El protocolo de PCR fue el siguiente: ([temperatura (°C)/duración (min)] / número de ciclos): [94/10] / 1; [(94/1), (52/1), (72/1)] / 39; [72/5] / 1.

3.2.1.4 Electroforesis

Los productos de la PCR fueron analizados en un gel de agarosa horizontal al 2% peso/volumen (p/v), disuelta antes de la gelificación en la solución tampón de electroforesis Tris-Borato-EDTA pH:8, 50mM (TBE, AppliChem GmbH). Se añadió

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

bromuro de etidio (EtBr) a la agarosa diluida a una concentración final de 0,1 µg/ml, con el fin de permitir la visualización del ADN bajo luz ultravioleta (UV). La preparación de la muestra de ADN para cargarla en el gel consistió en añadir 2 µl del tampón de electroforesis (Ecogen) a 10 µl de muestra (la muestra es lo que se obtiene de los ciclos de la PCR directamente). Los marcadores de peso molecular de ADN en un rango de tamaño concreto (50-1000 pares de bases (pb) BioVentures, Inc.) se cargaron de la misma manera que una muestra en un carril de cada gel para poder evaluar de manera visual el número de pares de bases de los fragmentos amplificados. El ADN teñido mediante EtBr fue visualizado en un transiluminador de Bio-Rad a 260 nm.

Un ejemplo del resultado obtenido con el análisis de animales de las colonias G, N y S se muestra en la figura 3.2.

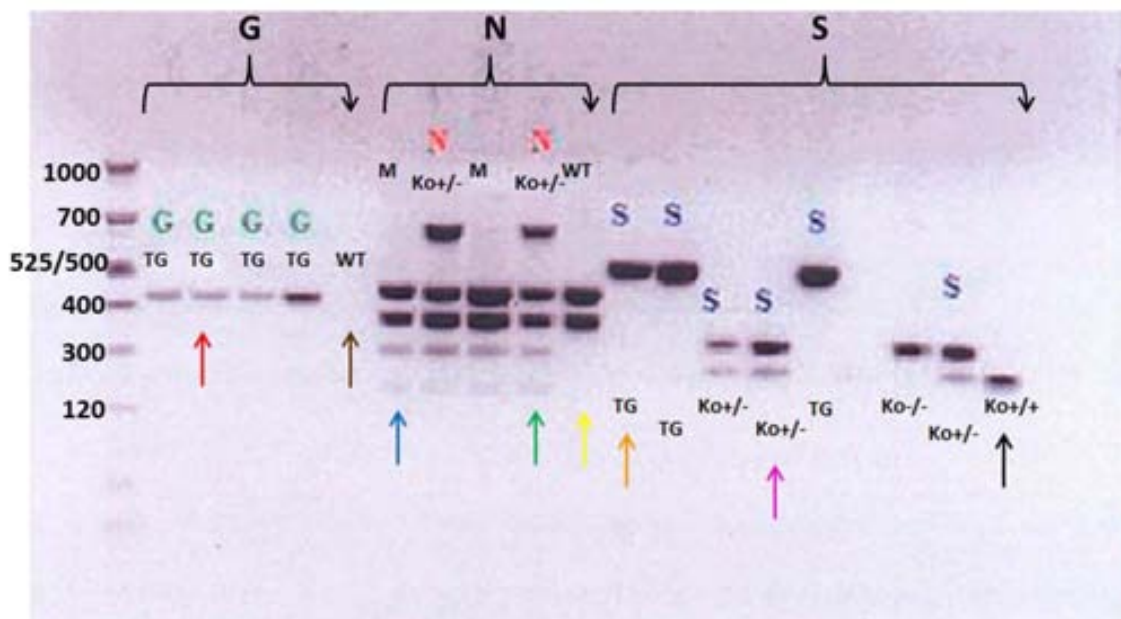


Figura 3.2: Gel de electroforesis con los productos de PCR de las colonias G, N y S. En la colonia G se observa una banda a 400 bp (flecha roja) cuando el animal es transgénico, mientras que si es wt (flecha café) no se aprecia ninguna banda. En la colonia N, 5 ejemplos: en el primer y tercer carril está el genotipo mutante (M) con bandas a 460, 390, 300 y 130 bp (flecha azul). El segundo y cuarto carril de la colonia N corresponden al genotipo Ko+/- que

CAPITULO 1:

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

tiene bandas a 675, 460, 390, 300 y 130 bp (flecha verde) es decir las mismas de “M” más una a 675 mientras que en el caso de los wt, solo se detectaban bandas a 460 y 390 bp (flecha amarilla). Finalmente en la colonia S, se observa el resultado obtenido para 9 animales (el transgen TG se ve en un carril diferente al Ko) detectando bandas a 525 bp para el Tg, a 313 bp para el mutante Ink4a-Arf (flecha rosa) y a 278 bp para el wt Ink4a-Arf (flecha negra).

Un ejemplo del resultado obtenido con el análisis de animales de las colonias R y P se muestra en la figura 3.3.

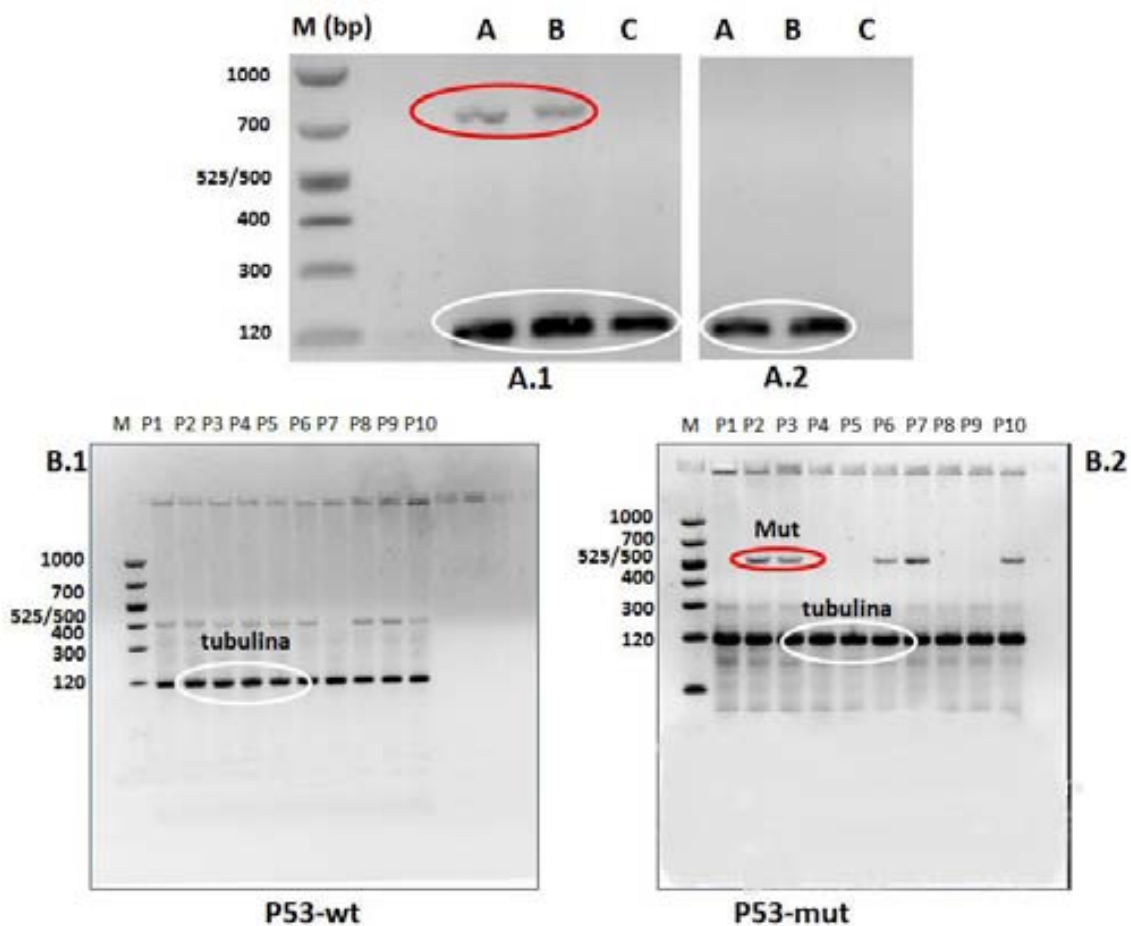


Figura 3.3: Genotipado de colonias R y P A.1) Ejemplo del genotipado de animales de la colonia R. A la izquierda se observa el marcador de peso molecular y el número (*band size*) se refiere al número de bp. El gen constitutivo tubulina (elipse blanca) corresponde a la banda de 120bp y está presente en todas las muestras (figura A y B). La banda visible a 700bp (elipse

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

roja) representa la amplificación del transgen (V12 HA-ras) por lo tanto, las muestras con dos bandas visibles confirman ratones transgénicos RasB8 (columnas A y B en A.1), mientras que en ratones wt, sólo la banda de tubulina (elipse blanca) es visible (columna C en A.1), lo que nos confirma que la PCR es correcta pero no hay transgen. A.2) La PCR para Lac Z (elipse blanca) se hace en un gel diferente (A.2) porque su producto de amplificación genera una banda similar a la tubulina (120bp). Las bandas relativas a este gen se ven en los animales transgénicos (A, B en A.2) y están ausentes en los animales wt. En B.1y B.2 se muestra un ejemplo del genotipo de ratones de la colonia P. B.1) Ejemplo del genotipado de un ratón de la colonia P s100 β -v-erbB / P53 +/- para wt de p53 por lo que solo es visible la banda de tubulina (elipse blanca), B.2) Ejemplo del genotipado de un ratón de la colonia P s100 β -v-erbB / P53 para el gen mutante para p53 (elipse roja), que se puede observar en la banda de 500bp (animales P2, P3, P6, P7 y P10).

3.2.2 Estudio piloto de caracterización de la colonia GEM

El protocolo estándar de caracterización consistía en explorar semanalmente mediante IRM/ERM/IERM los animales más abajo mencionados, con métodos que se describen de manera detallada en subsecciones posteriores.

Inicialmente los animales incluidos en el protocolo piloto eran animales reportados como portadores de síntomas neurológicos que podrían indicar la posible presencia de alguna masa tumoral. Dichos animales habían sido inspeccionados por los veterinarios del *Servei d'Estabulari* de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB) mediante el protocolo de supervisión incluido en el Anexo 3. En una **primera fase** solo se estudiaron los animales pertenecientes a las colonias G, N y S, es decir nos centramos en las colonias que en trabajos previos del grupo parecían producir los mejores resultados, es decir, las que presentaban mayor número de animales con masas anómalas detectadas. A continuación se inició una **segunda fase**, para explorar periódicamente (1 vez por

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

semana) los animales que presentaban síntomas neurológicos, y además incluir rutinariamente como en la fase 1, todos aquellos animales que tuvieran los genotipos transgénicos. Además se creyó conveniente en esta segunda fase incluir dos colonias que se habían empezado a cruzar recientemente, las colonia P y R, por el interés en el desarrollo de tumores con características ligeramente distintas (p. ej. Colonia R, astrocitoma en evolución).

La finalidad de este estudio piloto fue desarrollar e implementar protocolos para la detección y posterior estudio de masas anómalas de manera que fueran utilizados en estudios posteriores más complejos, pero debido a falta de tiempo/recursos no se pudieron llevar a cabo dichos estudios, aunque cabe destacar que si nos permitió obtener resultados necesarios para el desarrollo de clasificadores diagnósticos de tipo y grado tumoral.

Otra de las finalidades de este protocolo piloto, era llevar a cabo estudios de respuesta a terapia con Temozolamida (TM2) en tumores de grado bajo/intermedio, pero, al no obtener una buena penetrancia dicho estudio “más completo” no fue posible. Razón por la cual se decidió iniciar la colaboración con el grupo del Dr. Canals para intentar desarrollar un modelo transplantable de grado bajo con mejor penetrancia (ver capítulo 2).

3.2.2.1 Estudios por resonancia magnética (IRM/ERM/IERM)

Los estudios por resonancia magnética se llevaron a cabo en un imán horizontal de 7T (BioSpec 70/30, Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania) instalado en el *Servei de RMN* (SeRMN) de la UAB (figura 3.4), que es parte de la plataforma tecnológica de Aplicaciones Biomédicas de la Resonancia Magnética Nuclear de la UAB, conjunta entre

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

el Centro de Investigación Biomédica en Red - Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), y la UAB. Este imán se encuentra equipado con gradientes (bobina de gradientes B-GA12 insertada en un sistema de gradientes B-GA20S) y una sonda de recepción de superficie en cuadratura para ^1H , desacoplada activamente de una sonda de emisión de volumen de 72 mm de diámetro interno.

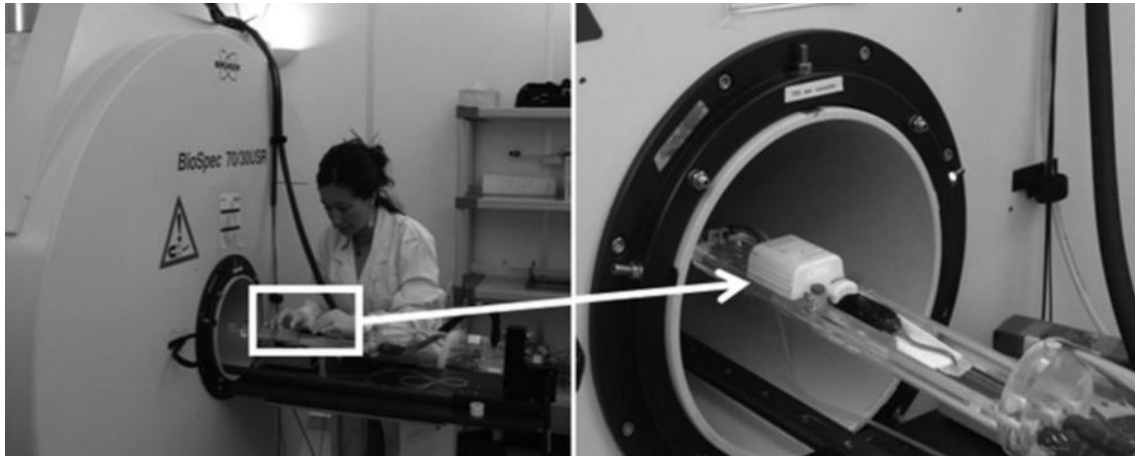


Figura 3.4: A la izquierda visión general del montaje de un ratón en el Biospec 70/30, a la derecha detalle de la cama y la sonda.

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

Los animales fueron colocados en una plataforma adecuada para el escáner y anestesiados con isoflurano 0,5-1,5% en O₂, de manera que su patrón respiratorio se mantenía a frecuencia aproximadamente constante (60-80 respiraciones por minuto). La temperatura de los animales se mantuvo constante (36,5 - 37,5°C) por medio de un baño de agua recirculante conectado a la plataforma para animales. Un mismo sistema de

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

monitorización permitió controlar la temperatura rectal (mediante el uso de una sonda para la medición de dicha temperatura) y la frecuencia respiratoria: (PC-SAM Instruments, Inc., New York, USA).

La mayor parte de puesta a punto de los métodos de IRM/ERM/IERM de esta tesis se llevó a cabo con ratones aquejados de tumores GL261 (inducidos por inyección estereotáctica) y por eso son los que aparecen en las figuras ilustrativas de los distintos apartados de métodos. Todos los ratones usados para experimentación fueron identificados con un código único (letra + número), por ejemplo la letra C indica normalmente un ratón con tumor GL261 (ver también sección 4.2 del capítulo 2).

3.2.2.1.1 Estudios por IRM

Para los estudios por IRM se utilizaron secuencias de referencia en los planos axial, sagital y coronal. Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: para los planos sagital y coronal se adquirió una secuencia RARE, número de ecos registrados, 8; campo de vista (FOV), 19,2 x 19,2 mm; matriz (MTX), 128 x 128 (32 x 32 $\mu\text{m}/\text{pixel}$); número de cortes (NS), 3; grosor de cada corte (ST), 0,5mm; espacio entre cortes (*Gap*) 0,1mm; TR/TE, 2000/16ms; número de promedios (NA), 1; tiempo total de adquisición (TAT), 24 s. Para los planos axial y coronal, se realizaron secuencias de alta resolución ponderadas en T_2 ($T_{2w}\text{-HR}$). Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: secuencia RARE, número de ecos registrados, 8; (FOV), 19,2 x 19,2 mm; (MTX), 256 x 256 (75 x 75 $\mu\text{m}/\text{pixel}$); (NS), 10; (ST), 0,5mm; (*Gap*) 0,1mm; TR/TE, 4200/36ms; (NA), 4; (TAT), 6 min y 43s. Estas secuencias se utilizaron para localizar y evaluar la presencia de posibles masas anómalas en el encéfalo del ratón. A continuación se procedió a adquirir otras secuencias para una mejor caracterización de los tejidos de interés.

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

Imágenes ponderadas en T_1 (T_{1w})

Para evaluar la integridad de la BHE (o rupturas en su integridad) y poder así orientar mejor el grado de la lesión, se llevaron a cabo estudios con inyección intraperitoneal de Gadolinio-DTPA (Magnevist, Schering, España) (0,2 mmol/Kg). 80 μ l por cada 20g de peso del animal. Para ello, se utilizó una secuencia ponderada en T_1 para detectar cambios en la captación de contraste (T_{1w} -CE) cuyos parámetros de adquisición fueron los siguientes: secuencia *Spin Echo* con FOV, 17,6 x 17,6 mm; MTX, 128 x 128; NS, 3; ST, 1 mm; *Gap*, 0,1 mm; TR/TE, 350/8,5 ms; NA, 1; TAT, 44,8s. La secuencia se adquirió antes y 20 min después de la inyección intraperitoneal (i.p) de Gd-DTPA.

3.2.2.1.2 Estudios por ERM

Los patrones espectroscópicos de parénquima cerebral potencialmente tumoral fueron adquiridos con secuencias de ERM, que se llevaron a cabo posicionando el volumen de interés (voxel) de forma que de poder ser, quedase totalmente englobado en la masa anómala detectada en la exploración por IRM (figura 3.5). Los estudios por ERM se realizaron cuando el volumen de la lesión era lo suficientemente grande como para colocar un voxel de (2,5 mm)³ (2,5 x 2,5 x 2,5 mm; 15,6 μ l) en su interior sin abarcar tejido peritumoral/normal para evitar contaminaciones de metabolitos procedentes del tejido circundante en el patrón espectral de interés. Para ello se utilizaron secuencias con localización PRESS y supresión de agua con el método *variable pulse power optimized relaxation delays* (VAPOR) [130] y dos tiempos de eco: 12 ms y 136 ms. Los parámetros de adquisición fueron: amplitud espectral (SW), 4006,41 Hz; TR, 2500 ms; NA, 128; TAT, 5 min y 30 s.

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

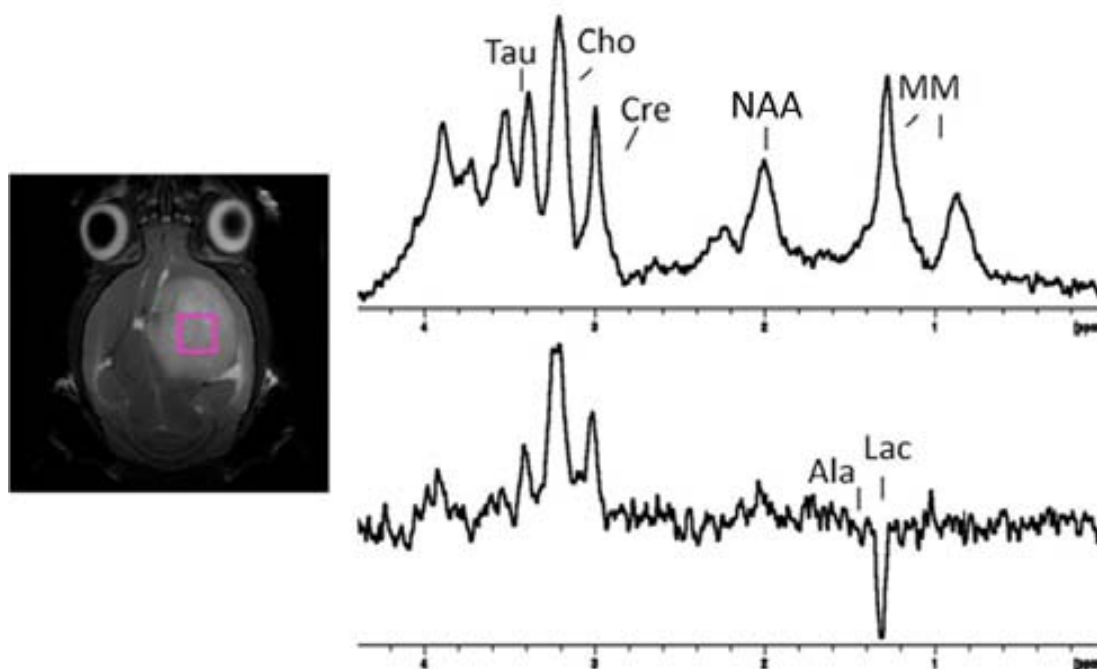


Figura 3.5: Izquierda: ejemplo de imagen de alta resolución ponderada en T_2 (T_{2w} HR), del ratón C567 (tumor GL261). El recuadro rosa muestra la posición del voxel. A la derecha, se muestran los espectros a TEC (superior) y TEL (inferior) adquiridos a 12 y 136 ms, respectivamente, en el rango de 0 a 4,2 ppm con algunos de los metabolitos más representativos señalados. Ver anexo 2 para el significado de las abreviaturas.

En la tala 3.1 se pueden observar los principales metabolitos estudiados en esta tesis y su desplazamiento químico.

Metabolito	ppm
Lípidos Móviles (MM)	0,9, 1,3 y 2,0
Lactato (Lac)	1,33
Alanina (Ala)	1,47
N-acetil aspartato (NAA)	2,02
Creatina (Cre)	3,03
Colina (Cho)	3,21
Taurina, Glucosa (Tau)	3,43
Glucosa (Gl)	3,80

Tabla 3.1. Principales metabolitos estudiados en esta tesis y sus desplazamientos químicos.

3.2.2.1.3 Estudios por IERM

Algunos de los animales que presentaban masa intraencefálica anómala, potencialmente tumoral, de un tamaño y posición favorables fueron estudiados con secuencias IERM, que permiten obtener información acerca de la heterogeneidad del patrón metabólico de la masa anómala y de su tejido circundante. Además se adquirieron imágenes T_{2w} -HR como referencia en cada caso.

Las secuencias de IERM se adquirieron utilizando el método 2D *Chemical Shift Imaging* (CSI) con localización PRESS. Los parámetros utilizados fueron: FOV, 17,6 x17,6 mm; Volumen de Interés (VOI), 5,5 x 5,5 x 1,0 mm, colocado de manera que abarcase parte del posible tumor y también parte del tejido normal/peritumoral; ST, 1 mm; TR, 2500 ms; SW, 4006,41 Hz; 512 NEX; TAT, 21 m y 30 s (figura 3.6) . La supresión de agua se efectuó con el método VAPOR (300 Hz de ancho de banda). Los *shims* lineales y de segundo orden fueron ajustados automáticamente con el método FASTMAP [17] en un volumen de 5,8 x 5,8 x 5,8 mm, dentro del cual estaba incluido el VOI. Seis bandas de saturación (ST,10 mm; pulsos *sech-shaped*: 1,0ms/20250Hz) se posicionaron alrededor del VOI para minimizar el efecto de las señales provenientes del exterior de dicho VOI (figura 3.7). La resolución especial obtenida quedó definida por una matriz de 8 x 8 voxels en el FOV (4,84 μ l de resolución nominal). Posteriormente, mediante una interpolación de Fourier, se reconstruyó una matriz de 32 x 32, tal y como se describe en [131] lo que produjo una resolución final de 0,30 μ l/voxel. En dicha matriz interpolada se encontraba el VOI seleccionado (10 x 10 voxels).

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

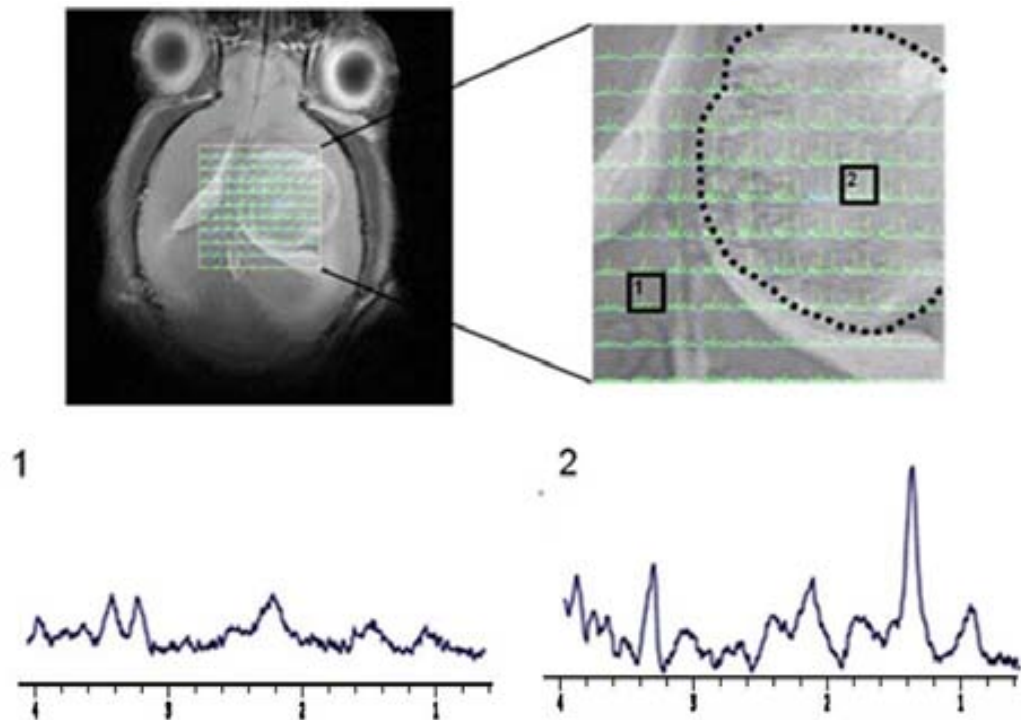


Figura 3.6: En la parte superior, a la izquierda se muestra un ejemplo de VOI seleccionado sobre una imagen T2w-HR de referencia de un ratón con un tumor GL261 (ver también sección 4.2 para la generación del modelo GL261). A la derecha, se muestra una ampliación del VOI con los 100 espectros adquiridos en su interior. Los cuadrados negros 1 y 2 señalan dos elementos de volumen (voxels) que producen los espectros correspondientes a regiones de tejido diferentes: 1-parénquima peritumoral/normal y 2-tumor GL261. En la parte inferior pueden verse los patrones espectrales SV extraídos de los voxels señalados en el *grid* que se muestra en la parte superior de la imagen.

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

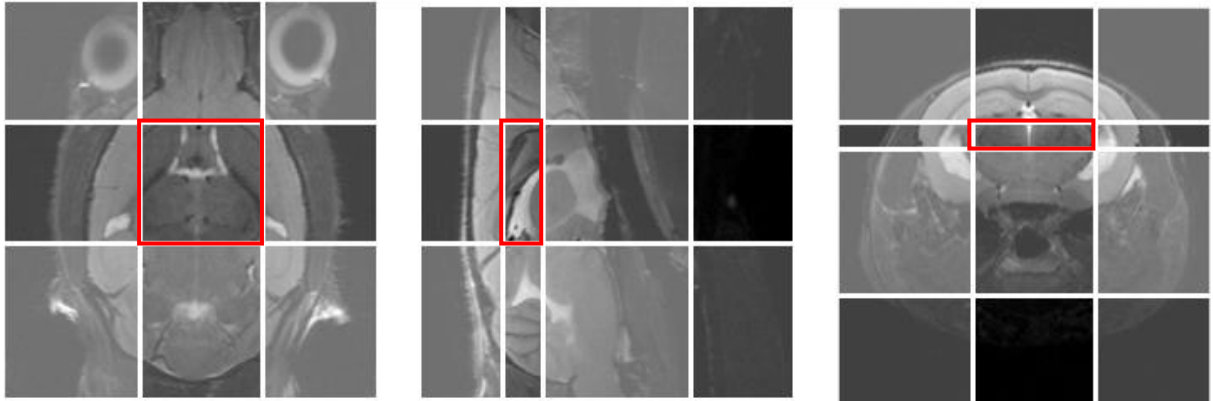


Figura 3.7: Esquema de las seis bandas de saturación colocadas alrededor del VOI en las secuencias de IERM, utilizadas para minimizar la contribución de las señales del tejido exterior a dicho VOI. De izquierda a derecha, se observa la localización del VOI (en rojo) en los planos coronal, sagital y axial del cerebro de un ratón wt.

Estudios de perturbación metabólica

En animales donde había especial interés en la caracterización de sus masas anómalas, se llevaron a cabo estudios adicionales de perturbación metabólica (IERM-PM), tanto por sobrecarga de glucosa (hiperglicemia transitoria) como por administración de dimetilsulfóxido (DMSO), ambos por inyección intraperitoneal. Para los estudios con DMSO, se inyectaron i.p. 200 μ l de DMSO diluido al 10% en suero fisiológico y tras la inyección del “bolus”, se adquirieron tres secuencias consecutivas de IERM cada 22 minutos. Para los estudios de hiperglicemia, se inyectaron i.p. 10 μ l /g (de peso del animal) de una solución al 25% (peso/volumen) de D-glucosa en suero fisiológico. Esta perturbación se llevó a cabo en hipotermia 28.5-29.5°C [131]. Una hora después de la inyección del “bolus” de glucosa, se adquirieron tres secuencias consecutivas de IERM: dos a TEC (TE= 12ms a 44-88 min post-inyección) y otra a TEL (TE=12ms a 66 min post-inyección).

CAPITULO 1:

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

Para llevar a cabo experimentos de IERM-PM, lo ideal era que la masa anómala tuviera un volumen suficiente para poder localizar en su interior el ROI de IERM (el volumen ideal es de aproximadamente 70 mm^3 , tamaño con el que se realizaron estudios anteriores en el grupo [131]). Para una calidad espectral óptima, se evitaba localizar el ROI en interfaces tejido – aire o cerca del hueso craneal.

Post-procesamiento

Los espectros IERM fueron post-procesados de la manera descrita en [131]. En resumen, los datos se procesaron inicialmente en una estación de trabajo con el *software* ParaVision 5.0 y después se post-procesaron con el *software* 3D *Interactive Chemical Shift Imaging* 3diCSI (versión 1.9.10) (Dept. Radiology, Columbia University/NY, USA, <http://hatch.cpmc.columbia.edu/public/3DiCSI>). Se aplicó un ajuste de *line broadening* (4 Hz de ajuste a una curva lorentziana), la TF y los fasados de orden cero y uno. Los datos en formato ASCII fueron exportados y se utilizaron en el programa MatLab (The MathWorks Inc., Natick/MA, USA) con otro módulo de *software* de procesamiento desarrollado por el GABRMN, el DMPM (<http://gabrmn.uab.es/dmpm>). Este módulo se utilizó para alinear los espectros en cada voxel de la matriz de IERM referenciándolos a la resonancia de creatina total a 3,03 ppm, para cuantificar intensidades relativas de las resonancias de interés utilizando la altura de las señales en el espectro y para codificar los resultados en mapas de color de 10x10 voxels. Los espectros individuales fueron normalizados entre 0 y 4,5 ppm a *unit length* ((UL2), eq. 3.1) y exportados en un formato compatible con los *scripts* del programa R desarrollado en el GABRMN utilizado para calcular los espectros promedio de los diferentes tejidos presentes en el VOI de adquisición (figura 3.8).

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

$$I_{norm}i = \frac{I_{real}i}{\sqrt{\sum_0^{4,5} (I_{real}i)^2}} \quad \text{eq. 3.1}$$

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

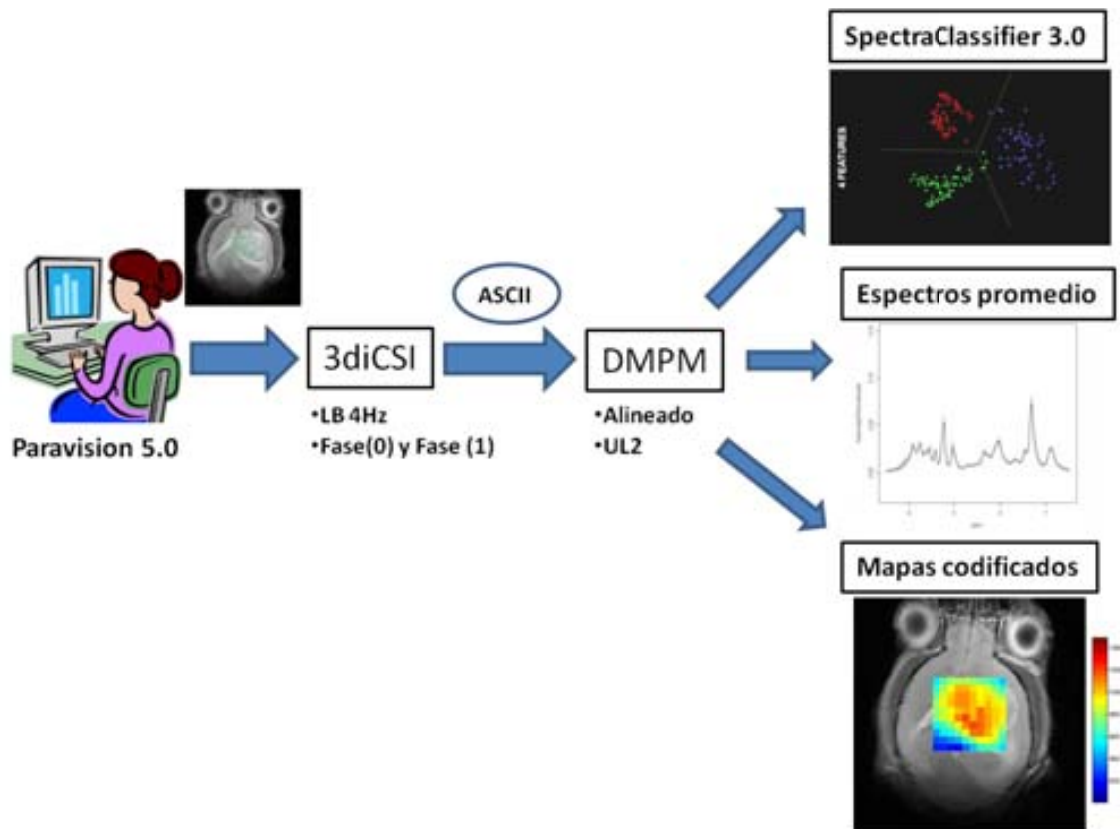


Figura 3.8: Esquema de la estrategia de post-procesamiento utilizada para generar mapas codificados en color para la intensidad de metabolitos concretos, y espectros promedio a partir de las secuencias de IERM adquiridas.

ANÁLISIS DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES

Para clasificar los tumores cerebrales, cada espectro individual de las matrices de las IERM adquiridas con perturbación por inyección de glucosa fueron normalizados a *unit lenght* (UL2) y utilizados como unidades/casos (vectores espectrales) independientes.

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

Determinados vectores espectrales normalizados (spv) fueron seleccionados y divididos en dos grupos, entrenamiento y test independiente, de la siguiente forma: Para el grupo de entrenamiento se usaron los animales GEM ya utilizados para desarrollar clasificadores anteriormente [28] y el grupo de test consistió en spv de diferente animales GEM descritos en esta tesis. El criterio de selección de los spv fue el siguiente: no procedían de voxels situados en los límites de la matriz de IERM donde el cociente señal/ruido es más bajo, ni de voxels situados en el límite entre el tumor y el tejido peritumoral, para evitar contaminaciones en el patrón espectroscópico. (Figura 3.9).

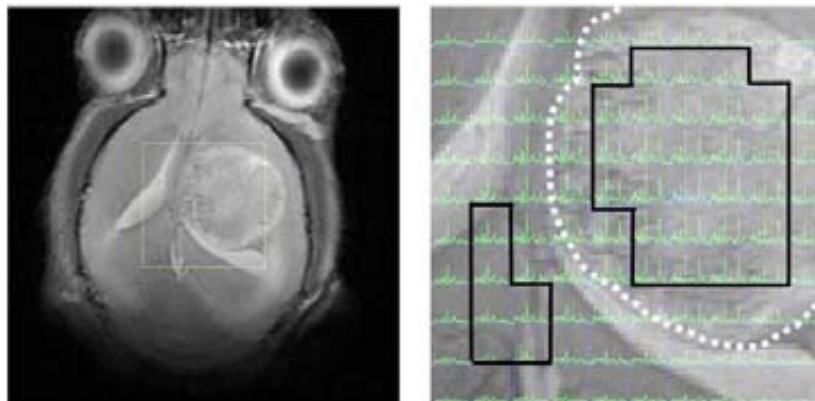


FIGURA 3.9: A la izquierda, imagen T_{2w} HR de referencia para secuencias de IERM de un tumor GL261; a la derecha ampliación del VOI a partir del cual se adquieren los espectros de interés. El borde del tumor aparece delimitado por una línea punteada blanca. Sobre el VOI se muestra un ejemplo de selección de voxels tumorales (derecha) y normales (izquierda) enmarcados con una línea negra para desarrollar clasificadores con el *Spectra Classifier* v3.0. Se excluyen los espectros de los márgenes del VOI, así como los limítrofes entre tejido normal y tumor.

Para el clasificador se seleccionaron 4 variables concretas en el grupo de entrenamiento, que eran posiciones en los spv (ppm) correspondientes a características espectrales (alturas) normalizadas de los espectros. Este proceso se llevó a cabo con el método *Sequential Forward Feature Selection* (SFFS), basado en una búsqueda *hill climbing*,

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

evaluado según lo descrito en [132] e implementado en el *Spectra Classifier v3.0*. [57] Las variables seleccionadas se utilizaron para generar clasificadores utilizando el Análisis Lineal discriminante de Fisher (LDA), creando para cada uno un espacio latente bidimensional definido por la proyección de las variables canónicas derivadas del LDA donde se observan simultáneamente los casos de entrenamiento y de test. Cada clasificador, definido por el TE, la glicemia y el número de variables seleccionadas, fue evaluado en sus características descriptivas y predictivas utilizando el método de *bootstrapping* [133] con 1000 repeticiones para el grupo de entrenamiento y el *balanced error rate* (BER) (ecuación 3.2) para grupo de test independiente, respectivamente.

$$BER = \frac{1}{3} \left[\left(\frac{\text{mal clasificados}}{\text{total}} \right)_{NT} + \left(\frac{\text{mal clasificados}}{\text{total}} \right)_{GBM} + \left(\frac{\text{mal clasificados}}{\text{total}} \right)_{ODG \text{ o } GBM} \right] \quad \text{eq. 3.2}$$

Siendo NT el número total de tumores, GBM glioblastomas y ODG oligodendrogliomas.

Las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para cada grupo de entrenamiento; es decir, las tasas de verdaderos positivos versus las de falsos positivos, fueron analizadas para cada clasificador transformadas en valores de área bajo la curva (AUC). Además, los resultados obtenidos para cada matriz de IERM fueron representados como mapas codificados en color con una estrategia de tipo nosológico [134,135] (Figura 3.10). Para ello se llevaron a cabo los siguientes pasos utilizando el *SpectraClassifier 3.0*: Un clasificador desarrollado según lo descrito anteriormente fue utilizado para predecir qué voxels de la matriz de IERM pertenecían a cada clase y la probabilidad de dicha clasificación y eso se clasificó en forma de distintos colores para cada tipo de tejido (Figura 3.10).

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

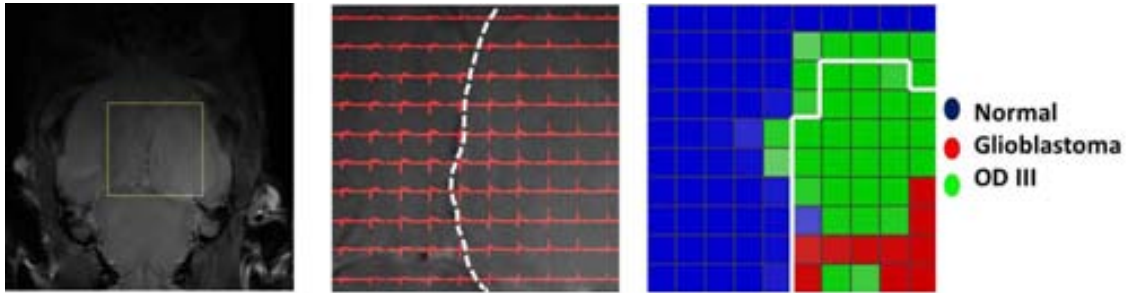


Figura 3.10: De izquierda a derecha: imagen T_{2w} HR de referencia para los estudios de IERM llevados a cabo en el animal S871 diagnosticado por histopatología como oligodendroglioma; ampliación del VOI de dichas secuencias con los límites del tumor marcados con una línea blanca discontinua y mapa nosológico de clasificación de cada *voxel* independiente extraído a partir del *Spectra Classifier* v 3.0 (la leyenda se muestra a la derecha).

Clasificadores de animales GEM, mediante IERM-PM con glucosa

A los animales que se les pudo realizar estudios de IERM-PM con glucosa mediante hiperglicemia transitoria en condiciones de hipotermia ligera ($\sim 30^{\circ}\text{C}$) [27,131], fueron clasificados mediante el *spectra classifier* V3.0. Para ello se utilizó un clasificador desarrollado dentro del grupo para este tipo de estudios [28], que únicamente permitiría discriminar parénquima cerebral normal, glioblastoma (grado IV) y oligodendroglioma (grado II).

Los clasificadores fueron obtenidos con espectros adquiridos a TEC en hiperglicemia, con cuatro variables seleccionadas mediante el sistema SFFS. Estas variables fueron: 1,28 ppm (lípidos móviles, lactato), 1,47 ppm (alanina), 2,14 ppm (glutamina/glutamato, glutatión), 3,56 ppm (mio-inositol, glicina, glucosa). Debido a que este clasificador no estaba desarrollado con tumores de grado III, pero si estaba desarrollado con OD grado II los resultados obtenidos no son tan robustos como esperábamos ya que no están diseñados para reconocer tumores de grado III por lo que las zonas tumorales

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

identificadas por histopatología como grados intermedios lo clasifica como un grado IV (figura 3.10), por lo que sería conveniente en un futuro entrenar el clasificador con tumores de grado III.

3.2.3 Estudios histopatológicos

Una vez finalizados los estudios de IRM y ERM los animales fueron sacrificados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital (200mg/Kg, disolución a 60mg/ml; Dolethal, Vetoquinol S.A. Barcelona, España). A continuación se extrajeron los encéfalos y se fijaron en una solución de formaldehído al 4%. Una vez fijados, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes seriados (5 µm de espesor), Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina así como otros marcadores inmunohistoquímicos de interés para diagnosticar el tipo y grado de los tumores, con la colaboración y supervisión del Dr. Martí Pumarola, (*Centre de Biotecnologia Animal i de Teràpia Gènica* (CBATEG-UAB)).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Identificación genotípica

Desde el establecimiento de las primeras colonias GEM en nuestro grupo en 2006, se llevó a cabo el genotipado de 2.537 animales (colonias S, R, P, N y G), distribuidos según la tabla 3.2:

CAPITULO 1:
**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
 (GEM) accesibles al GABRMN**

COLONIA	NÚMERO TOTAL DE ANIMALES	MACHOS	HEMBRAS
S	1056	57,%	42,3%
R	197	51,6%	48,4%
P	219	48,2%	51,7%
N	649	50,9%	49,5%
G	416	46,9%	53,1%

Tabla 3.2: Número total de animales genotipados en las diferentes colonias GEM estudiadas y el porcentajes de machos y hembras en cada una de ellas.

Los animales fueron genotipados como se describe en el apartado 3.2.1, con el fin de identificar los animales que habían heredado la alteración genética de interés para incluirlos en el estudio, y también con el fin de establecer nuevas parejas para cruces y mantenimiento de las colonias. En las colonias S y P se podían encontrar los siguientes genotipos: (Tg/ko+/-, /ko-/-, Tg/wt, wt/ko+/-, wt/wt). El genotipo transgénico con un porcentaje más elevado encontrado en la colonia S fue Tg/ko+/- (figura 3.11) con un total de 28,4%. En la colonia P, el genotipo transgénico predominante fue Tg/wt (figura 3.12) con un total de 36,6 %. En las colonias R, N y G solo había dos tipos de genotipos posibles: wt y Tg. Las figura 3.13, 3.14 y 3.15, ilustran la distribución de estos genotipos para las citadas colonias.

CAPITULO 1:
Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

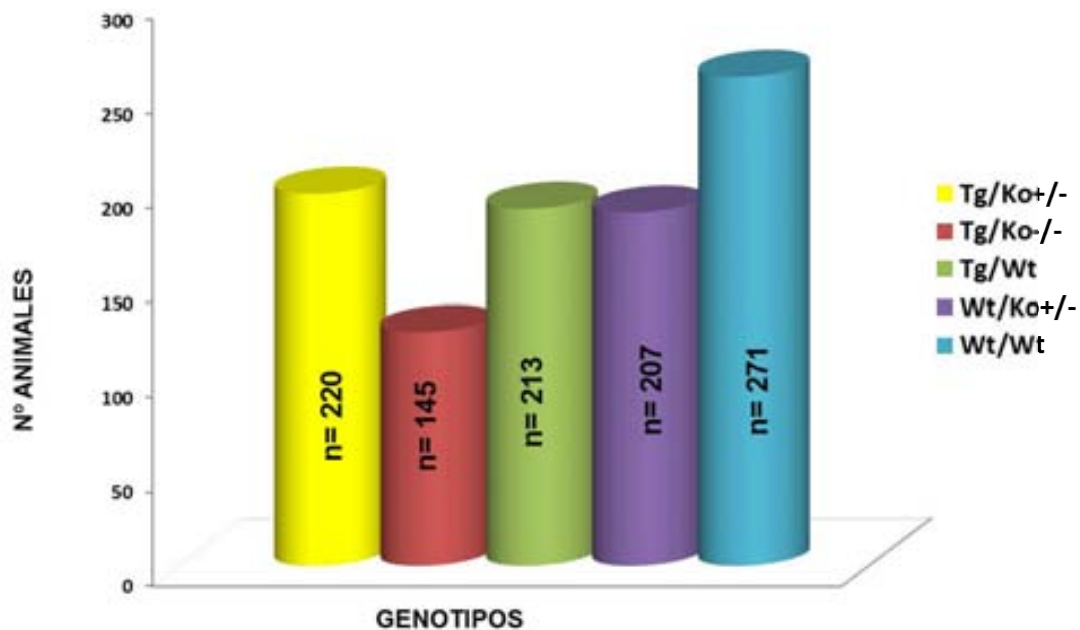


Figura 3.11: Total de animales genotipados en la colonia S, en el período entre 2006 y 2012 y su distribución genotípica.

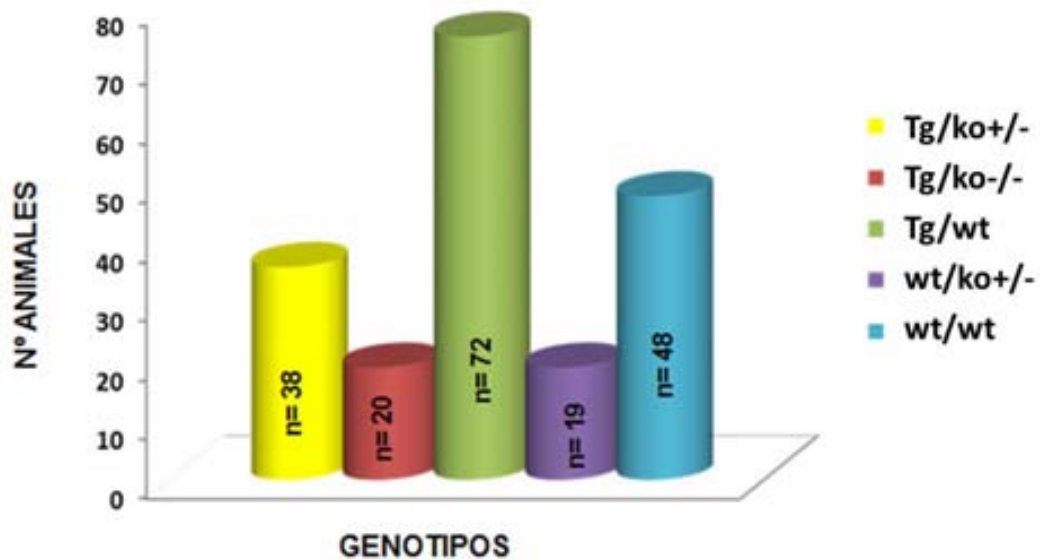


Figura 3.12: Total de genotipados en la colonia P en el período entre 2009 y 2012, y su distribución genotípica.

CAPITULO 1:
Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

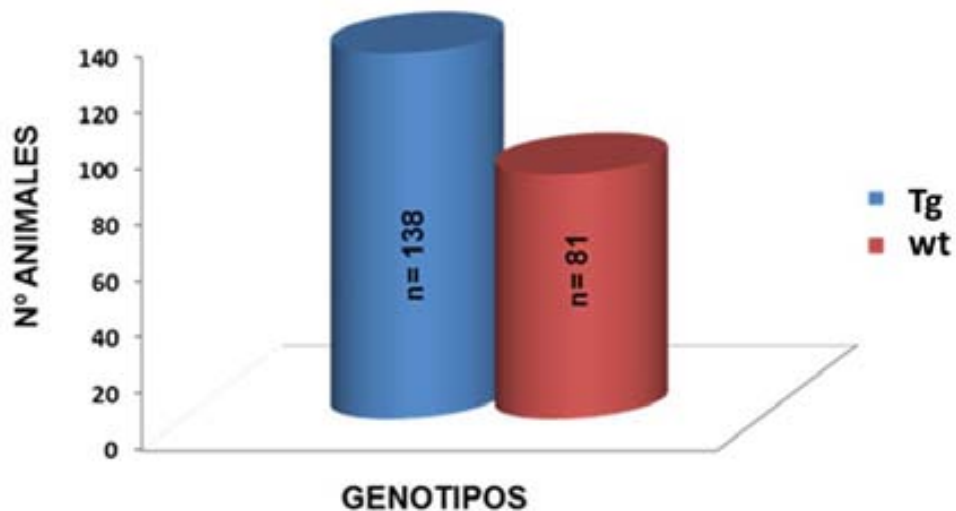


Figura 3.13: Total de animales genotipados en la colonia R en el período entre 2010 y 2012, y su distribución genotípica.

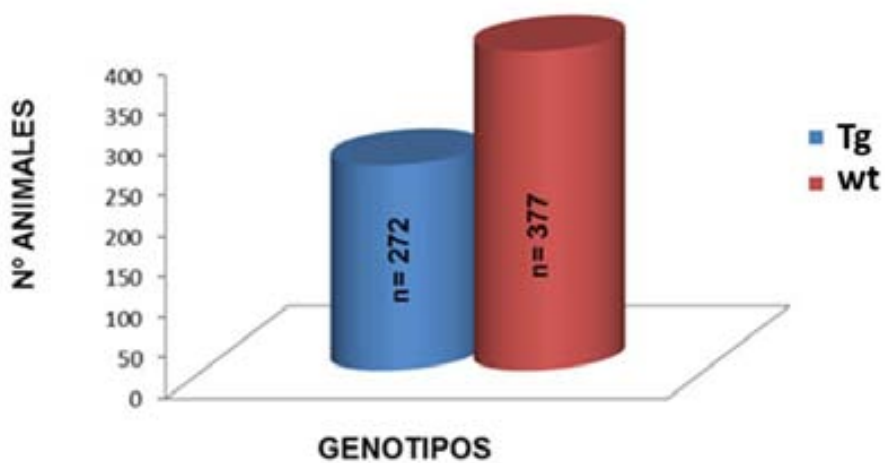


Figura 3.14: Total de animales genotipados en la colonia N en el período entre 2006 y 2009, y su distribución genotípica.

CAPITULO 1:
**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

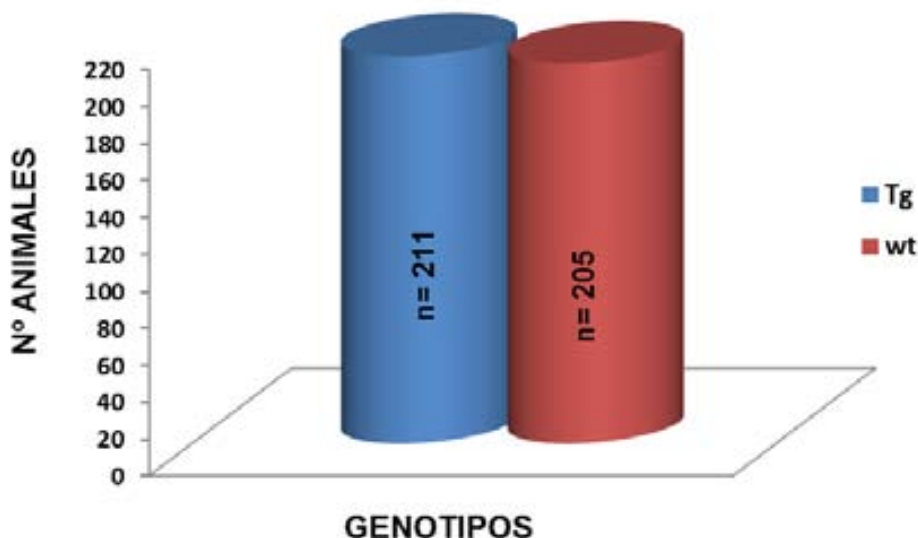


Figura 3.15: Total de genotipados en la colonia G en el período entre 2006 y 2009, y su distribución genotípica.

3.3.2 Estudios por RMN

Los primeros resultados que se muestran en este apartado son los relativos a los animales de las colonias S, N y G, que fueron las primeras colonias inicialmente disponibles en nuestro grupo de investigación.

Sorprendentemente, a pesar de tener un número alto de animales explorados (ver tabla 3.2), el porcentaje de masas anómalas detectadas por IRM dista del descrito inicialmente para la colonia S, que fue del 64% [111]. Cabe aclarar que dicho porcentaje de presencia de tumor en [111] fue encontrado mediante el análisis histopatológico de todos los animales implantados, cosa que no se llevó a cabo en nuestro caso en que solo se analizó por histopatología a los animales que fueron previamente explorados por IRM y para los que se detectó una masa anómala. Así, en nuestro caso el porcentaje de masas anómalas detectadas por IRM en la colonia S fue

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

tan solo un 12,2% del total de animales en el citado período (Tabla 3.3). Los resultados mostrados en dicha tabla corresponden únicamente a los animales diagnosticados por IRM/ERM en la primera fase del protocolo, por lo tanto no se detalla el análisis histopatológico de animales que no presentaron síntomas previos y/o no fueron explorados por IRM/ERM, cosa que no podría aumentar el porcentaje de incidencia tumoral.

COLONIA	TOTAL ANIMALES EXPLORADOS	ANIMALES CON MASAS ANOMALAS DETECTADOS POR IRM/ERM
S	90	11(12,2%)
N	17	1 (5,9%)
G	26	1 (3,8%)

Tabla 3.3: Número de animales explorados por IRM/ERM de las colonias S, N y G, y sus respectivos porcentajes de incidencia tumoral, entre los animales portadores de síntomas neurológicos.

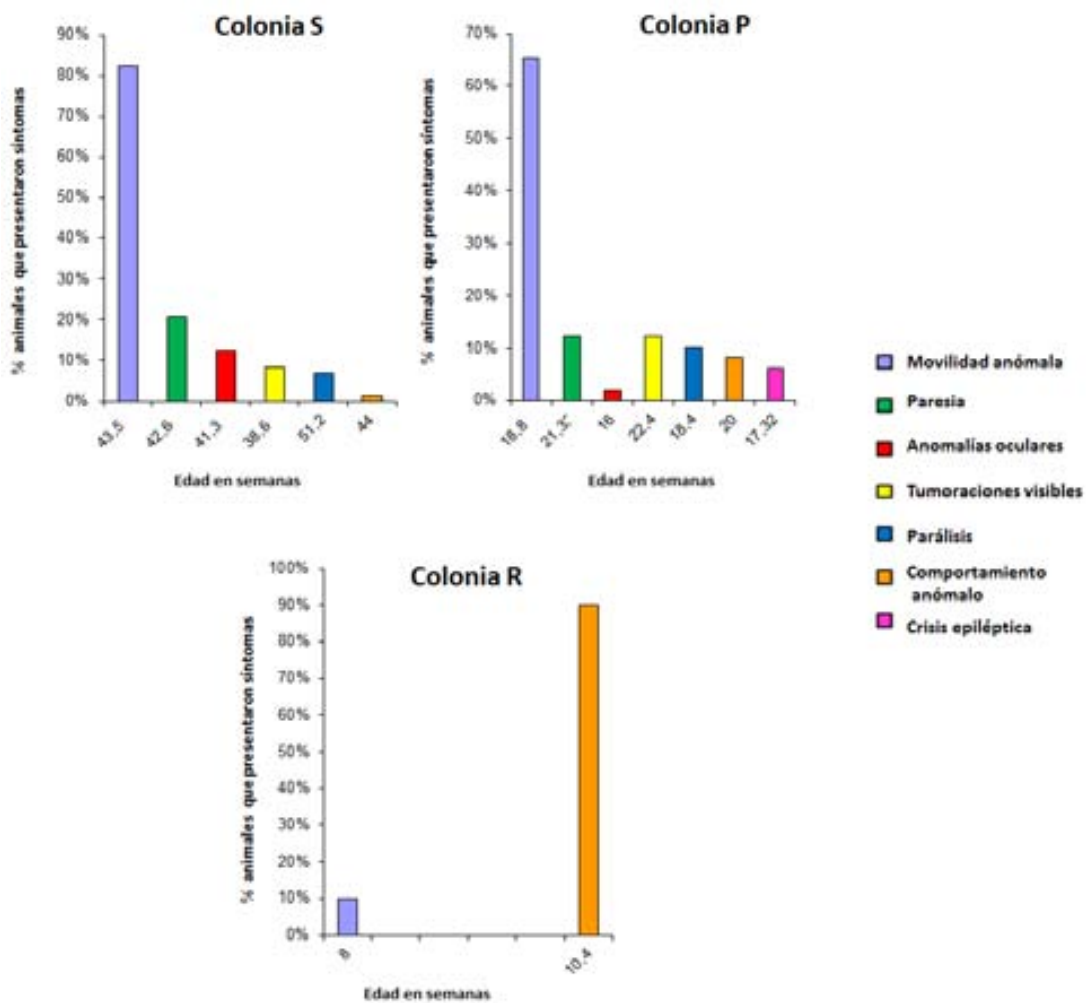
Los bajos porcentajes de incidencia tumoral obtenidos con las colonias N y G (5,9% y 3,8% de tumores confirmados) nos hizo plantear la necesidad de disponer de nuevos modelos de animales transgénicos y, a medio término, prescindir de las citadas colonias GEM como posibles modelos de investigación de progresión tumoral y respuesta a la terapia en el GABRMN.

Mediante colaboraciones científicas entre nuestro grupo y los investigadores W. Weiss y A Gupta, se tuvo acceso a dos colonias GEM adicionales, con potencial de desarrollo de tumores gliales. Las colonias P(S100B-v-erbB/p53(+/-)) y R(GFAP-V12 HA-ras B8 (RasB8)), por lo que los subsiguientes como en las colonias inicialmente estudiadas estudios fueron llevados a cabo con dichas colonias, explorando los

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

animales que presentaban síntomas neurológicos (figura 3.16). Además se incorporaron al protocolo piloto de exploración todos los animales que presentaban los genotipos transgénicos en su identificación genotípica.

Los síntomas neurológicos más frecuentes desarrollados por los animales de las colonias S, P y R fueron: movilidad anómala y paresia, seguidas en menor grado por anomalías oculares, tumoraciones en otros sitios distintos al cerebro, parálisis, comportamiento anómalo y crisis epiléptica. La colonia R tuvo predominancia de comportamiento anómalo entre los síntomas característicos. La distribución porcentual de dichos síntomas se puede apreciar en la figura 3.16.



Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

Figura 3.16: Síntomas presentados por las colonias S, P y R durante las revisiones hechas por los veterinarios del servicio de Estabulario de la UAB según sección 3.2.2. y promedio de edad (en semanas eje x) en que se observaba la aparición de dichos síntomas.

3.3.2.1 Estudios por IRM, ERM, IERM durante el protocolo piloto

A todos los animales explorados durante el protocolo piloto segunda fase (según lo descrito en la sección 3.2,2) se les realizaron exploraciones IRM con imágenes ponderadas en T_2 , con el fin de detectar la presencia de una posible masa anómala. En caso de que efectivamente se detectara dicha masa, se realizaban exploraciones periódicas (promedio 3 ± 2 días) desde el momento de la detección de la masa (asignado como día “1”) hasta el momento del sacrificio del animal, intentando obtener la máxima información posible de manera no invasiva.

Este protocolo se aplicó a las colonias S, P y R y como resultado se obtuvo un total de 174 animales explorados con la distribución observada en la tabla 3.3. En la (figura 3.17) se puede apreciar el porcentaje de los genotipos de los animales explorados en cada colonia. Si en los resultados encontramos también el genotipo wt es debido a que en algunos de los animales explorados por síntomas neurológicos no se conocía aún su genotipo, que finalmente resultó ser wt. De las tres diferentes colonias estudiadas, la colonia que presentó un mayor número de animales explorados fue la “S” con 114 animales, de los cuales sólo un 16,7% presentó una masa tumoral mediante secuencias de imagen IRM ponderadas en T_2 . En la colonia P, de un total de 23 animales explorados sólo un 4,3% presentó una masa tumoral. Finalmente, la colonia R presentó un porcentaje de 7,7% de masas tumorales (Tabla 3.4). Los resultados mostrados en esta tabla corresponden únicamente a los animales explorados por IRM/ERM en la segunda fase del protocolo.

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

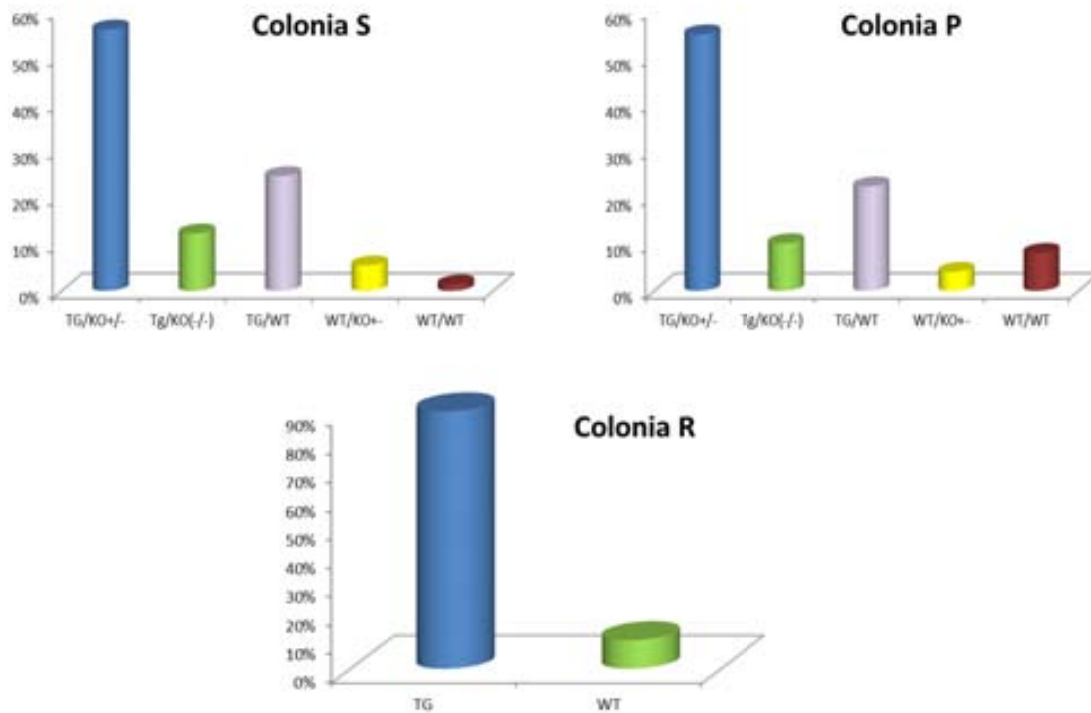


Figura 3.17: Principales genotipos de los animales explorados en las diferentes colonias, durante el protocolo piloto (en la primera y segunda fase del protocolo piloto).

COLONIA	TOTAL ANIMALES EXPLORADOS	ANIMALES CON MASAS ANOMALAS DETECTADAS POR IRM/ERM
S	114	19 (16,7%)
R	37	3 (7,7%)
P	23	1 (4,3%)

Tabla 3.4: Total de animales explorados por IRM/ERM durante la segunda fase del protocolo piloto y número total de masas tumorales detectadas en las colonias S, R y P entre los animales portadores de síntomas neurológicos.

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

Como consecuencia de las exploraciones llevadas a cabo, en algunos casos se pudo hacer un seguimiento longitudinal bastante completo de los animales que presentaban masa tumoral en las diferentes colonias GEM investigados. Así, con los datos obtenidos, se pudo tener una idea aproximada de la cinética de aumento del volumen del tumor en cuestión. Para medir el volumen de los tumores se utilizaron las secuencias de alta resolución T_2 en el plano coronal y secuencias en 3D (ver sección 4.2.5). Este dato podía aportar información sugestiva sobre el grado del tumor estudiado, dado que tumores de evolución volumétrica lenta sugieren grados tumorales bajos.

Cuando el volumen de la lesión fue lo suficientemente grande como para posicionar un voxel de $(2,5\text{mm})^3$, $(2,5 \times 2,5 \times 2,5 \text{ mm})$; $15,6 \mu\text{l}$) en su interior, estos animales fueron estudiados por ERM para analizar el patrón espectroscópico de las masas anómalas e intentar obtener información adicional sobre el tipo y grado tumoral. A todos los animales, siempre que fue posible, se les realizaron exploraciones a dos tiempos de eco TEC y TEL (12 y 136 ms) respectivamente, aunque en algunos casos concretos no se logró homogeneidad suficiente para adquirir un espectro utilizable (localización de la lesión en zonas de interfície tejido-aire, presencia de sangrado, etc.). En la figura 3.18 se muestran las resonancias principales de un tumor no GEM (glioblastoma GI261) de ratón a TEC y TEL, utilizado para poner a punto las metodologías de adquisición espectral.

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

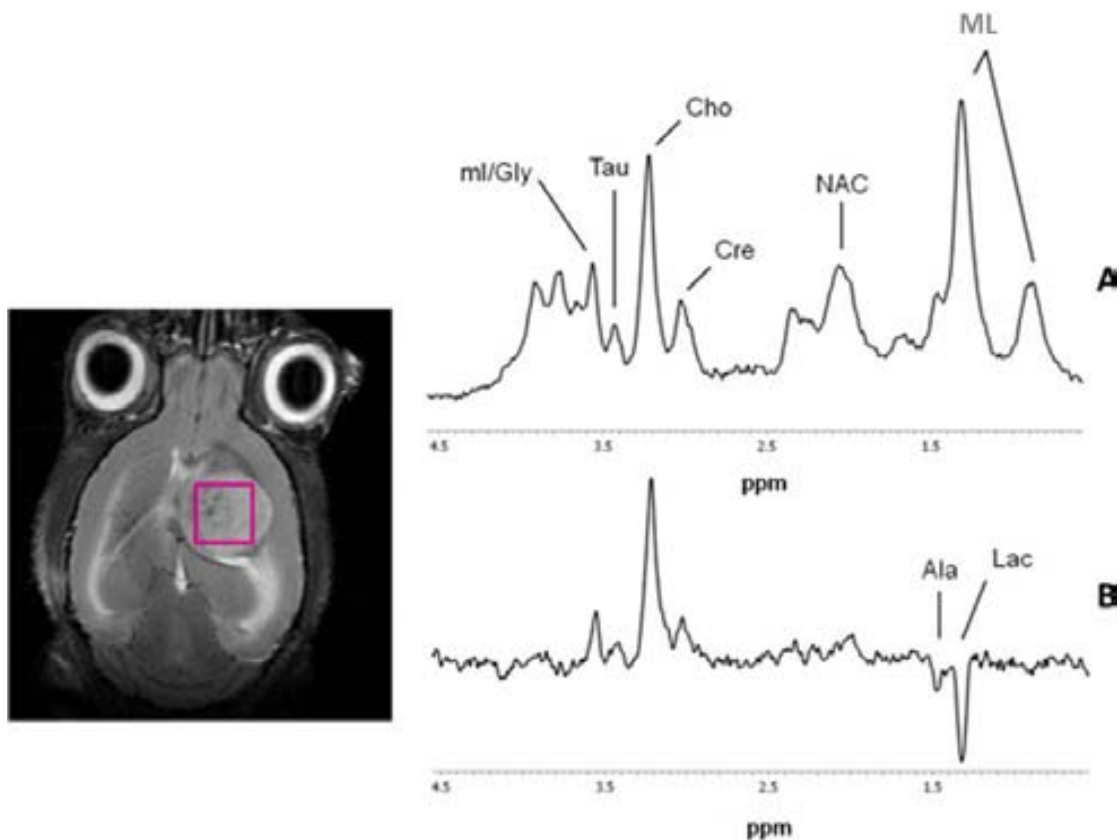


Figura 3.18: Principales resonancias encontradas en un tumor GL261 de ratón a TEC (A) y TEL (B). Significado de las abreviaturas como en la figura 3.5.

Si la localización y tamaño de la lesión lo permitían, se adquirirían además secuencias de IERM, con y sin perturbación metabólica. En estos estudios, en algunos casos los animales presentaron patrones anormales de respiración por lo que el nivel de anestesia y la monitorización de los animales tuvieron que ser estrictamente controlados a lo largo de ellos para evitar la muerte del animal durante la exploración.

A continuación, se muestran resultados obtenidos con animales representativos de las citadas colonias:

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

En cuanto a las colonias N y G, como inicialmente se mencionó, el porcentaje de masas anómalas detectadas por IRM fue muy bajo: 5,9 y 3,8% respectivamente, entre los animales que presentaron síntomas neurológicos. En el momento de realizar las exploraciones a estas colonias no estaban totalmente implementados los protocolos de IERM y por ese motivo no se dispone de datos de ese tipo para dichas colonias. Las figuras 3.19 y 3.20 ilustran resultados con animales representativos de las colonias N y G.

Colonia N:

El animal que se tomó como ejemplo representativo es el animal N34, hembra, cuyo genotipo era ko+/-, la cual tenía 31 semanas de edad en el momento de la detección de la masa anómala y los síntomas neurológicos que presentó fueron paresia y comportamiento anómalo. La masa se desarrolló en la zona del bulbo olfatorio, con características de hiperintensidad en las imágenes ponderadas en T₂. Desde el momento de la detección de la masa, cuando el tumor presentaba un volumen de 10 mm³, hasta el día que se sacrificó el animal pasaron 42 días, durante los cuales el volumen del tumor tuvo un crecimiento pseudo lineal (figura 3.19B). Los datos de ERM que se muestran en la figura 3.19 concuerdan con un cociente Cho/Cr a TEC significativamente elevado en el ratón N34 a los 36 días después de la detección inicial de la masa tumoral con respecto a lo medible en wt (0,94 +/- 0,003). Dicho cociente es sin embargo significativamente inferior al cociente en GL261 (Gbm de grado IV), 2,03 +/- -0,3.0. Además del seguimiento volumétrico del tumor, se realizaron estudios de ERM en dos diferentes tiempos de eco TEC y TEL (figura 2.14C) Los datos de ERM muestran un cociente colina/creatina elevado y aumento en la señal de NAA, en los espectros a TEL (ver tabla 3.5 y figura 3.18). Además, la ausencia de lípidos móviles a

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

TEL y su presencia moderada en el espectro a TEC sugiere un tumor de grado III más que un grado IV (ver figuras 3.18 y 3.19) [136,137], La indicación de un grado intermedio también se ve reforzada en la imagen en T₂ que ilustra la evolución volumétrica a lo largo de los días para este tumor tras su detección. No hay un periodo de estabilidad sino que se observa un crecimiento constante a lo largo de los días, hasta el sacrificio por razones éticas del animal.

GRUPO 1		WT (n=3)		GEM (n=3)		GL261 (n=3)	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD
TEC 12ms	Cho/Cr	0,94	0,03	1,82	0,33	2,03	0,30
	ML/Cr	0,41	0,03	0,96	0,61	2,39	0,71
	NAA/Cr	1,04	0,02	1,44	0,32	2,03	0,54
TEL 136 ms	Cho/Cr	1,05	0,03	2,23	1,02	3,45	1,13
	Lac/Tau	-0,44	0,11	-0,99	3,01	-5,07	1,61
	NAA/Cr	1,08	0,03	0,85	0,15	0,97	0,24

Tabla 3.5: Promedio de los cocientes de alturas de los principales metabolitos (valores absolutos) analizados en esta tesis para animales wt C57/BL6, animales GEM (pertenecientes a la colonia S) y animales implantados con células GL261 (para todos los animales n=4).

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

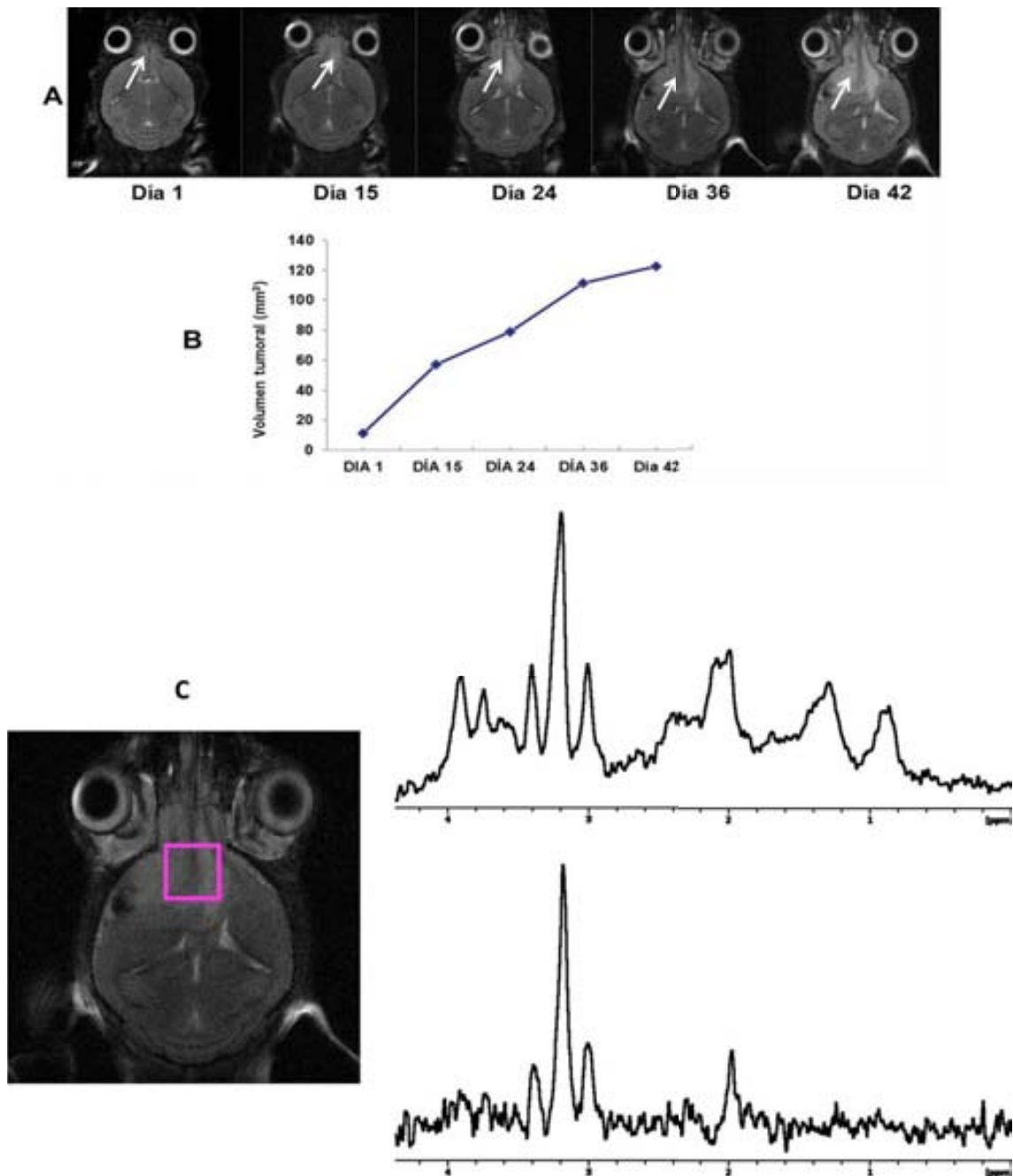


Figura 3.19: A) IRM de alta resolución ponderada en T_2 en orientación axial del cerebro del animal N34, adquirida a 7T a diferentes días (indicados bajo cada imagen) después de detectar la masa tumoral por primera vez. B) Seguimiento de la progresión volumétrica tumoral del animal N34 desde el día de la detección de la masa tumoral hasta el día de su sacrificio (volúmenes expresados en mm³). C) A la izquierda, imagen de alta resolución ponderada en T_2 del animal N34, 36 días después de la detección de la masa tumoral. El voxel utilizado en los

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

estudios ERM está representado por el recuadro rosa. A la derecha, se muestran los espectros a TEC (superior) y TEL (inferior) adquiridos a 12 y 136 ms respectivamente, en el rango de 0 a 4,5 ppm.

Colonia G:

Para esta colonia se escogió el animal G91, hembra con genotipo Tg. Presentaba síntomas neurológicos, como comportamiento anómalo y reducción de movilidad. En el momento de la aparición de dichos síntomas y la exploración por IRM tenía 32 semanas de edad y la masa anormal detectada en el hipotálamo presentó un volumen bastante reducido, de 5mm³. Dicha masa tuvo una evolución de 47 días, momento del sacrificio del animal por razones éticas, cuando la masa presentaba un volumen de 52 mm³ (figura 3.20A). Se realizaron estudios de ERM a dos tiempos de eco, 12ms (TEC) y 136 ms (TEL) (figura 3.20C). El patrón espectroscópico que presentó este animal es muy similar al encontrado en el animal de la colonia N anteriormente descrito (N34), un cociente de colina/creatina elevado (1,82 +/- 0,33) y disminución de la señal de NAC, que es todavía más evidente sobre todo a TEL (ver figura 3.20 y tabla 3.5).

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

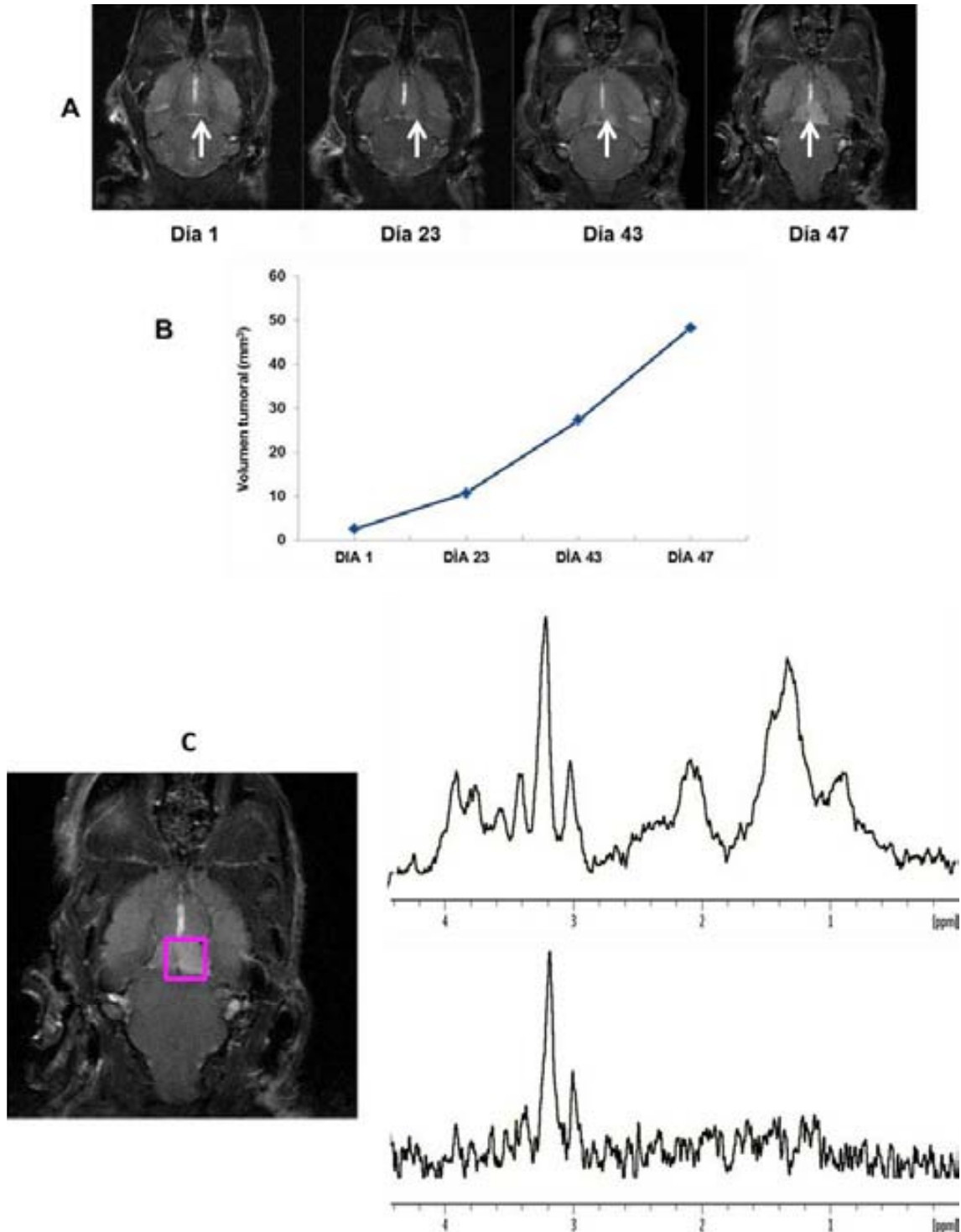


Figura 3.20: A) IRM de alta resolución ponderada en T_2 en orientación axial del cerebro del animal G91, adquirida a 7T a diferentes días (indicados bajo cada imagen) después de detectar la masa tumoral. B) Seguimiento de la progresión volumétrica tumoral del animal G desde el día de la detección de la masa tumoral hasta el día de su sacrificio (volúmenes expresados en

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

mm³). C) A la izquierda, imagen de alta resolución ponderada en T₂ del animal G91, 47 días después de la detección de la masa tumoral. El voxel utilizado en los estudios ERM está representado por el recuadro rosa. A la derecha, se muestran los espectros a TEC (superior) y TEL (inferior) adquiridos a 12 y 136 ms respectivamente, en el rango de 0 a 4,5 ppm.

Colonia R:

Para esta colonia se escogió al animal R371, hembra de genotipo Tg de 26 semanas de edad. Este animal fue llevado a exploración IRM/ERM por presentar síntomas neurológicos como paresia, convulsiones y comportamiento anómalo. Los datos de ERM no provinieron de una masa claramente delimitada como se observó en las demás colonias. El patrón espectral figura 3,21 nos indica que podría ser compatible con un tumor de bajo grado. El cociente colina/creatina (1,23 +/-0.51) fue tan solo ligeramente superior a 1, lo que apunta a una lesión con bajo potencial proliferativo. Por otro lado, la disminución de señal de NAA, cociente NAA/Cr a TEL (0,81 +/- 0,74) indica cierta afectación del tejido neuronal. La señal observada a 1,3 ppm, se confirma como lactato a TEL por la inversión característica de este metabolito (figura 3.21). Para esta colonia fue posible disponer también de exploraciones IERM (ver más adelante) con y sin perturbación metabólica (figura 3.21).

CAPITULO 1:
**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

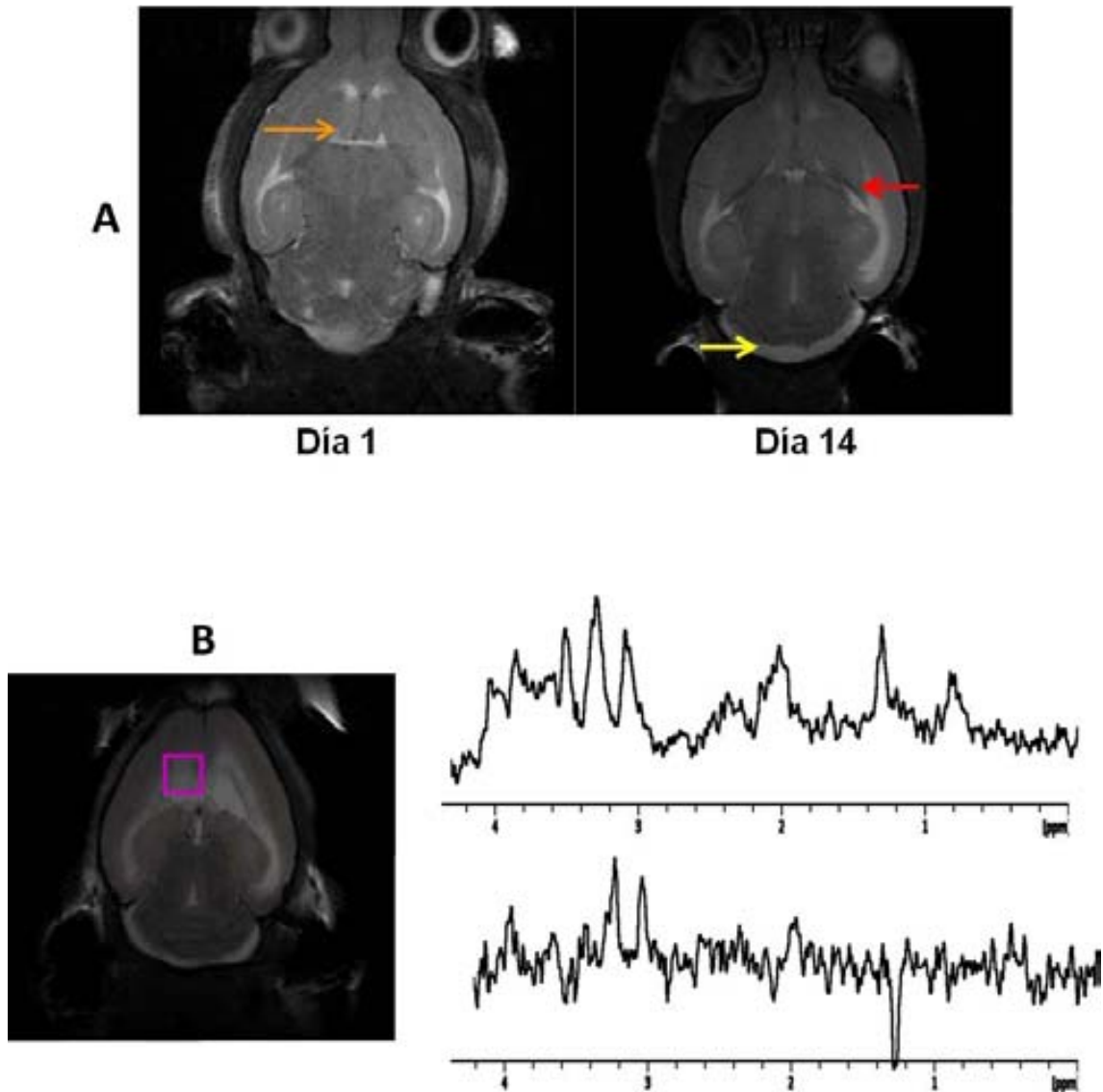


Figura 3.21: A) IRM de alta resolución ponderada en T_2 en orientación axial del cerebro del animal R371, adquirida a 7T a diferentes días (indicados bajo cada imagen) después de detectar la posible masa tumoral. La flecha naranja muestra la masa anómala a día 1, la flecha roja muestra una inflamación en los ventrículos y la flecha amarilla enseña una ligera hidrocefalia. B) A la izquierda, imagen de alta resolución ponderada en T_2 del animal R371, 14 días después de la detección del patrón anormal de IRM. El voxel utilizado en los estudios ERM esta representado por el recuadro rosa. A la derecha, se muestran los espectros a TEC (superior) y TEL (inferior) adquiridos a 12 y 136 ms respectivamente, en el rango de 0 a 4,5 ppm.

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

Para la colonia R, se esperaba un alto porcentaje de tumores astrocíticos transicionando de bajo a alto grado tal y como fue descrito por los investigadores que la desarrollaron [127]. No obstante, los resultados obtenidos durante esta tesis no fueron los esperados: muchos de los animales portadores de síntomas neurológicos, y que se exploraron en el protocolo piloto, no presentaron masas anómalas compatibles con las esperadas para tumores astrocíticos. El rasgo más común a estos animales era la presencia de hidrocefalia moderada a grave (probablemente la responsable de muchos de los síntomas neurológicos que presentaban). Como se aprecia en la (figura 3.16), la mayoría de estos síntomas tenían relación con comportamiento anormal reportado por el personal veterinario del *Servei d'Estabulari de la UAB*. Incluso a pocas semanas de edad dicho comportamiento (movilización anormal, movimientos en círculo) era evidente, siendo muchas veces concomitante con un bajo peso y desarrollo en comparación con otros componentes de la camada.

Una vez detectadas las anomalías en las exploraciones IRM/ERM, su evolución cursaba de una manera más rápida en comparación con las masas anómalas detectadas en otras colonias. En el caso del animal R371 (figura 3.21), éste murió 14 días después de la detección de la anomalía, día en el que se le realizó un estudio de IERM con perturbación con DMSO (figura 3.22). Así el animal murió durante la realización del estudio después del espectro a 88 minutos post DMSO. Los resultados observados en este estudio muestran una zona de acúmulo de DMSO, un claro “*hot spot*” en la zona de posible masa anómala. Este acumulo podría estar relacionado con la presencia de tumor [26], aunque en el momento que se realizó el estudio con DMSO la BHE no se encontrara rota. Desafortunadamente de este animal no fue posible tener un diagnóstico histopatológico que nos permitiera comprobar la presencia de un posible grado tumoral alto en la zona de acúmulo de DMSO.

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

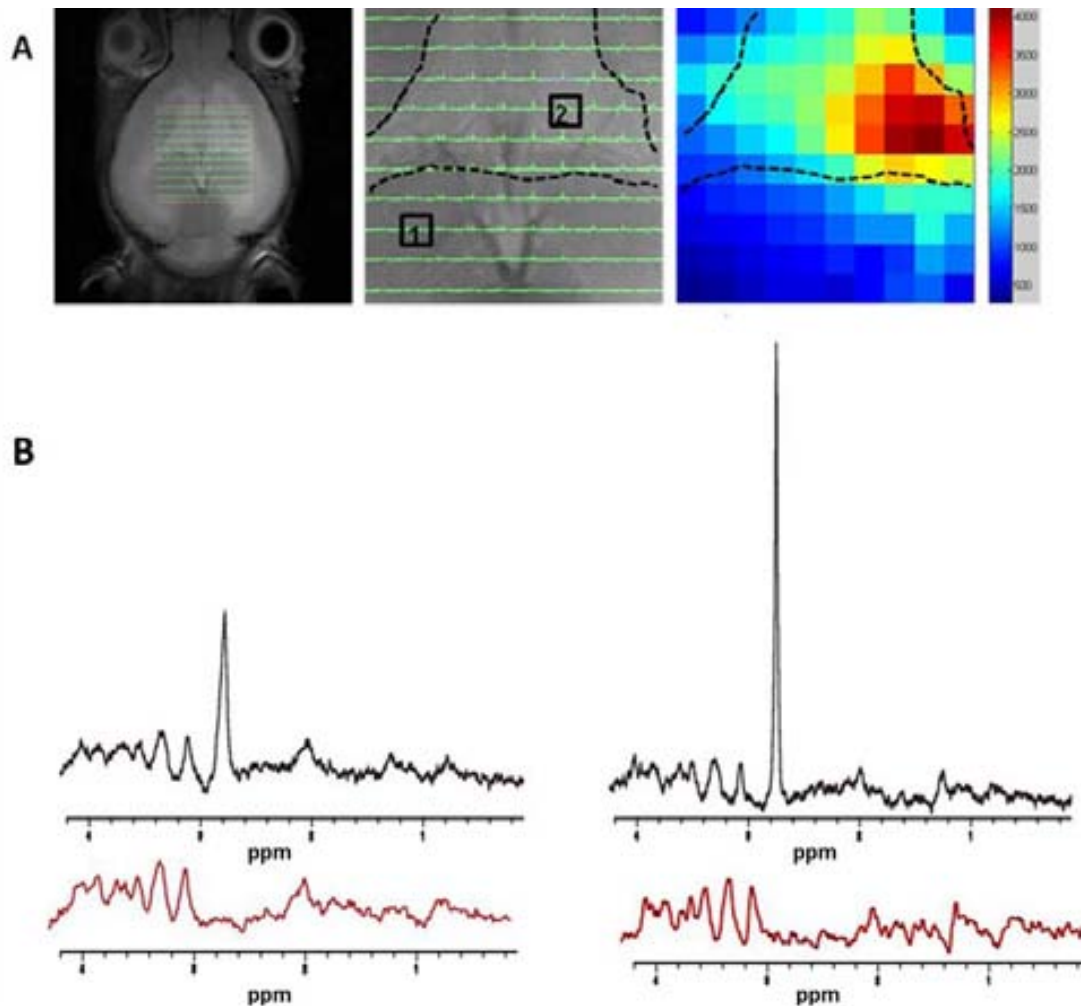


Figura 3.22: A) VOI de adquisición (cuadrado amarillo) a la izquierda para las secuencias IERM (12ms TE) superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T_{2w} HR) en el animal R371 realizado 14 días después de la detección de la masa anómala por IRM. El VOI a mayor aumento se muestra en el centro y la línea punteada negra marca el límite tentativo de la zona anómala, según la ligera hiperintensidad en la imagen T_{2w} HR. Los cuadros 1 y 2 corresponden a espectros SV extraídos de las regiones de la matriz de IERM y que se exponen en B. A la derecha, se muestra un mapa en escala de color de la intensidad de DMSO a 2,72 ppm detectada en el VOI 88 minutos tras su administración. B) Espectros de las regiones marcadas como 1 (parénquima no afectado/normal), 2 (tejido anómalo) en la matriz expuesta en A, antes (espectro rojo) y 88 minutos después (espectro en negro) de la administración de DMSO.

CAPITULO 1:
**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

Colonia P

El animal seleccionado para comentar de esta colonia fue el animal P176, hembra, que presentaba el genotipo Tg/ko+/-, el cual en el momento de detección de la masa tumoral tenía 27 semanas de edad. Este animal fue estudiado por IRM en el momento que los veterinarios de *Servei de estabulari* detectaron que presentaba los siguientes síntomas: cierto grado de parálisis (y como consecuencia disminución de actividad motora), taquipnea y delgadez del tercio posterior. La masa tumoral anómala detectada en el cerebro del animal presentaba ya un volumen de 110 mm³ (figura 3.23A). Adicionalmente se realizaron estudios de ERM a TEC y TEL (figura 3.23B), que demostraron un cociente colina/creatina elevado (1,87 +/-0,49), así como disminución importante en la señal de NAA sobre todo en TEL (0,05 +/- 0,01). No obstante, la ausencia de lípidos móviles a TEL sugería un tumor de grado III. Dicho diagnóstico fue confirmado por histopatología, ya que el ratón P176 estaba aquejado de un oligodendroglioma anaplásico (grado III).

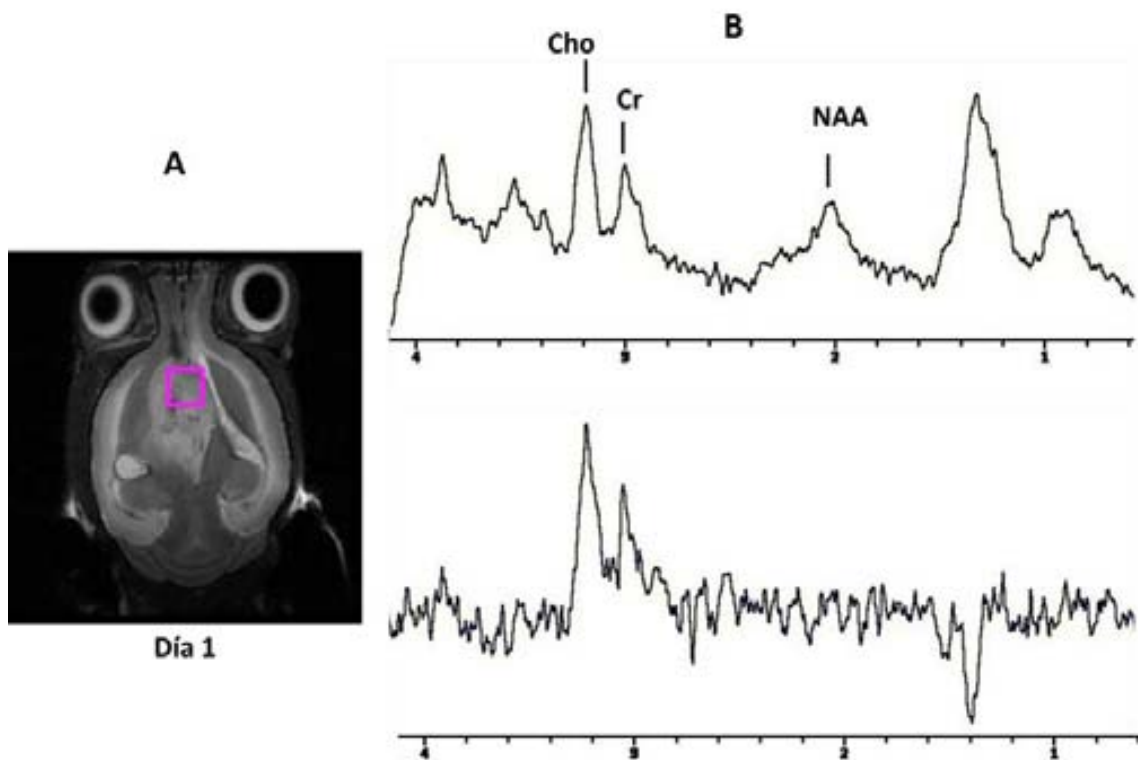


Figura 3.23: A) IRM de alta resolución ponderada en T_2 en orientación axial del cerebro del animal P176, adquirida a 7T el día de la detección de la masa tumoral (indicado bajo la imagen), El voxel utilizado en los estudios ERM está representado por el recuadro rosa. B) espectros a TEC (superior) y TEL (inferior) adquiridos a 12 y 136 ms respectivamente, en el rango de 0,5 a 4,5 ppm.

Una vez se finalizó con el estudio por ERM-SV, se realizaron estudios IERM-PM de hiperglicemia. Estos estudios no mostraron un acúmulo de glucosa claro en el interior de la masa anómala que nos pudiera confirmar la presencia de zonas tumorales de alto grado (figura 3.24). Para complementar estos resultados se comprobó mediante estudios de administración de contraste que la BHE no se encontraba comprometida. Asimismo, se aprovechó la existencia en el grupo de clasificadores para grado y tipo de tumor en estudios con protocolos de IERM-PM [28] para aplicarlo al caso P176 (ver figura 3.25), mediante la utilización del *spectra classifier v3.0* [138]. El clasificador

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

encuentra zonas de oligodendroglioma (grado 2) así como de glioblastoma lo que llevaría a proponer para el tumor el grado más alto (glioblastoma, grado IV). Sin embargo la falta de clasificadores robustos para reconocer mediante IERM-PM deja abierta la posibilidad a que las zonas reconocidas como grado IV pudieran en realidad corresponder a oligodendroglioma anaplásico (grado III). Finalmente todos estos resultados fueron confrontados con los estudios de histopatología que dieron como resultado un oligodendroglioma III, para el animal P176.

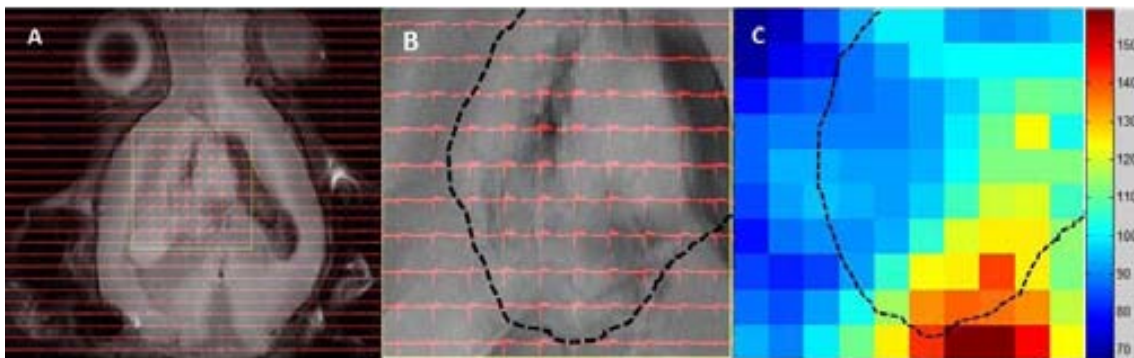


Figura 3.24: A) VOI de adquisición para la secuencia IERM (12ms TE) con perturbación por hiperglicemia transitoria superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T_{2w} .HR) en el animal P176 el día de la detección de la masa tumoral. B) VOI a mayor aumento, la línea punteada negra marca el límite de la masa anómala. C) Mapas en escala de color de la intensidad de D-Glucosa a 3,43 ppm TEC 12ms tras 88m min de la administración.

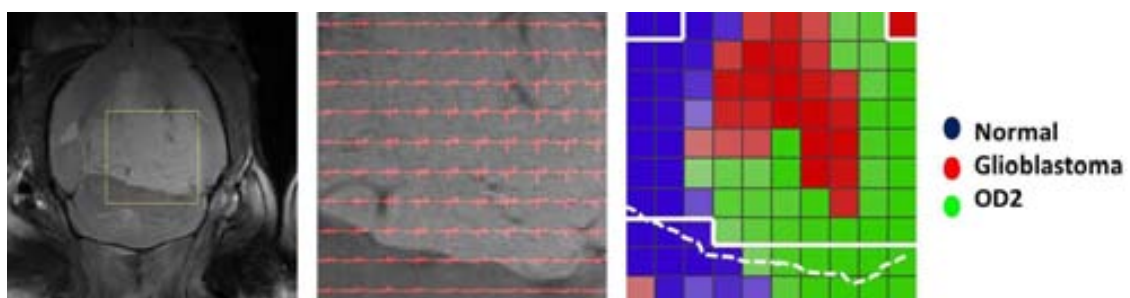


Figura 3.25: De izquierda a derecha: imagen T_{2w} HR de referencia para los estudios de IERM llevados a cabo en el animal P176; ampliación del VOI de dichas secuencias con los límites de la masa anómala tumor marcados con una línea blanca discontinua y mapa nosológico de clasificación de cada *voxel* independiente extraído a partir del *Spectra Classifier* v3.0 y

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

siguiendo lo descrito en [Simoes *et al* 2012, Integral Biolo] (la leyenda se muestra a la derecha).

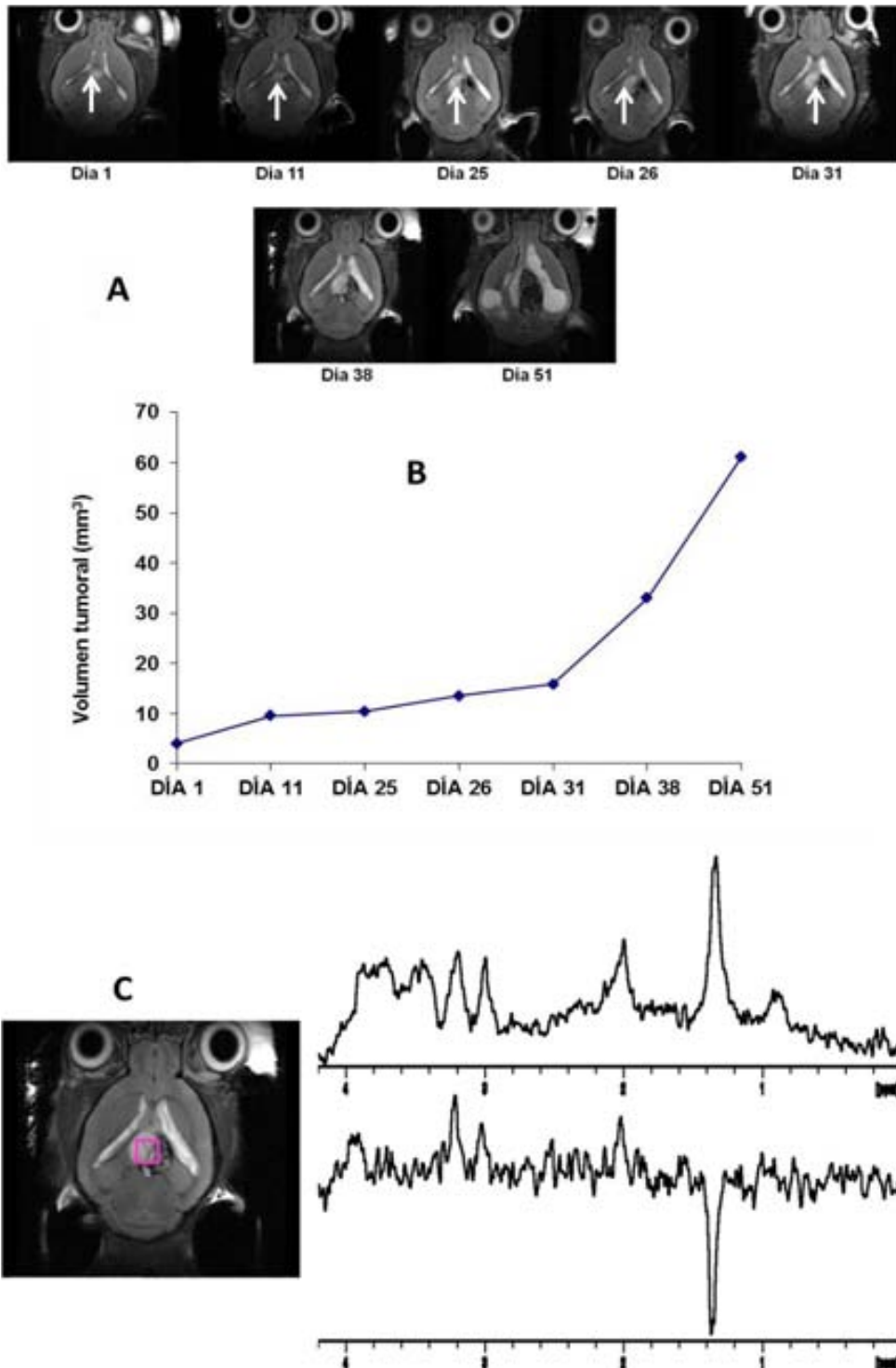
Colonia S:

La colonia S, fue la colonia con el porcentaje más alto de masas anómalas detectadas (Tablas 3.2 y 3.3). Se detalla a continuación el resultado para algunos de los animales mejor estudiados. El animal S885, macho con genotipo Tg/ko+/-, que en el momento de detectarle la masa tumoral tenía 52 semanas de edad y presentaba síntomas de comportamiento anómalo y paresia. La masa anómala tenía en ese momento inicial un tamaño de 5 mm³ y se desarrolló en el tronco encefálico.

En los estudios de IRM, se pudo hacer un seguimiento de la progresión tumoral durante 51 días desde el momento de su detección inicial, realizando también medidas volumétricas (figura 3.26A). Como se puede observar, el tamaño de la masa anómala se mantiene estable con poca variación durante el primer mes después de su detección. Después de este periodo, el aumento exponencial de tamaño llevó al sacrificio del animal. Los datos obtenidos en las secuencias de ERM indican que este animal presentó un patrón espectral, con un cociente colina/creatina bajo (NAA/Cr 0.89, +/- 0.21 a día 5). Por otra parte la disminución en la señal de NAA fue reducido aunque pudiera haber presencia de lípidos móviles y/o lactato el patrón de ERM a TEL sugeriría una contribución mayoritaria en el pico de 1,3ppm por parte del lactato debido al pico invertido a TE 136 ms (figura 3.26B). Aunque el patrón espectral de la masa tumoral a TEC sugiere más bien un grado II/III, el TEL no lo hace en la misma dirección, recordándonos el patrón espectral de la parte quística de algunos tumores humanos [139], lo que nos llevaría a pensar que la hiperintensidad en la imagen T₂ podría ser compatible con cierto componente quístico. Otra característica que

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

podríamos relacionar con un bajo grado tumoral, al menos en sus estadios iniciales de desarrollo, es el patrón volumétrico de crecimiento que se mantuvo relativamente estable durante casi un mes.



Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

Figura 3.26: A) IRM de alta resolución ponderada en T_2 en orientación axial del cerebro del animal S885, adquirida a 7T a diferentes días (indicados bajo cada imagen) después de detectar la masa tumoral (flecha blanca⁹). B) Seguimiento de la progresión volumétrica tumoral del animal S885 desde el día de la detección de la masa tumoral hasta el día de su sacrificio por razones de protocolo y ética animal (volúmenes expresados en mm^3). C) A la izquierda, imagen de alta resolución ponderada en T_2 del animal S885, 38 días después de la detección de la masa tumoral. El voxel utilizado en los estudios ERM está representado por el recuadro rosa. A la derecha, se muestran los espectros a TEC (superior) y TEL (inferior) adquiridos a 12 y 136 ms respectivamente, en el rango de 0 a 4,2 ppm.

Paralelamente a los estudios por IRM o ERM se realizaron estudios de IERM-PM con DMSO llevados a cabo los el día 31 después de la detección de la masa tumoral, y se apreció un cierto acúmulo de DMSO (figura 3.27) con una zona concreta “*hot spot*” de mayor acumulo diferencial. En los estudios con contraste presentaba la BHE rota, lo que nos podría permitir suponer un grado tumoral alto. A los 31 días después de la detección inicial se llevó a cabo un estudio de IERM-PM con hiperglicemia transitoria y los datos se analizaron mediante *spectral classifier* v 3.0 utilizando el clasificador de los Glioblastomas vs OD2 vs GEM. Los resultados sugirieron que los voxels tumorales en su mayoría correspondían a un OD2.

Para complementar estos estudios una muestra del tumor *post-mortem* a los 51 días de su detección inicial fue utilizada para análisis histopatológico y el diagnóstico fue oligodendroglioma anaplásico (grado III), lo que sugeriría que durante el mes de progresión el tumor pudo sufrir una evolución, transicionando posiblemente a un grado superior a lo largo del último mes de evolución del tumor. Finalmente la masa anómala fue clasificada mediante “*spectral classifier*” que nos clasifico el tumor dentro de los oligodendrogliomas III.

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

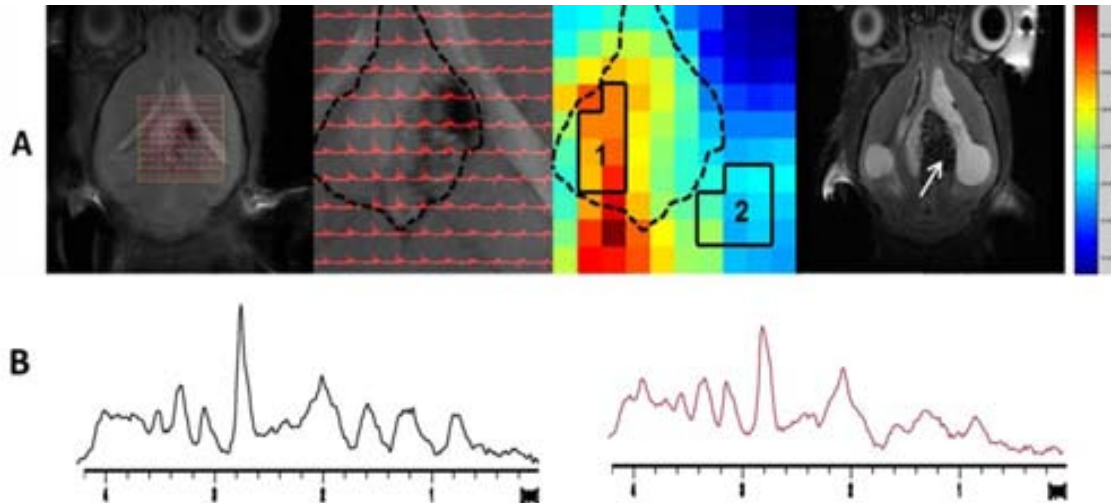


Figura 3.27: A) VOI de adquisición (cuadrado amarillo) para las secuencias IERM (12ms TE) superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T_{2w} HR) en el animal S885 a 31 días después de su detección. El VOI a mayor aumento se muestra en el centro. En el recuadro con código de colores la línea punteada negra marca el límite de la masa anómala. Las zonas enmarcadas en trazo negro continuo y numerados con 1 y 2 corresponden a espectros promedio de la zona tumoral y peritumoral normal respectivamente en un mapa en escala de color de la intensidad de DMSO detectada en el VOI 88 minutos tras su administración. Al lado a su derecha, imagen ponderada en T_2 20 días después del estudio de DMSO. La flecha blanca muestra la zona donde antes se veía un claro *hot-spot* por acumulación de DMSO. B) Promedio de espectros obtenidos de los voxels individuales del VOI delineado por la línea negra. En color negro espectros promedio de la zona tumoral (1) y en color rojo de la zona peritumoral normal (2).

Otro de los ratones investigados perteneciente a la colonia S fue el animal S910, macho con genotipo $Tg/ko+/-$. En el momento de la detección de la masa anómala por IRM tenía 34 semanas de edad y presentaba síntomas de comportamiento anómalo y paresia. La masa anómala presentó un volumen de 40mm^3 y se desarrolló en el tronco encefálico.

En los estudios de IRM, se pudo hacer un seguimiento de la progresión tumoral durante 15 días desde el momento de su detección, realizando también medidas

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

volumétricas (figura 3.28B). En el momento de la detección, la masa anómala presentaba un volumen ya elevado por lo que el animal se tuvo que sacrificar 15 días después de la detección de la masa por razones éticas. Los datos obtenidos en las secuencias de ERM indican que este animal presenta un patrón espectral, con un cociente colina/creatina bajo, además de presentar una disminución en la señal de NAC reducido y presencia de lípidos móviles y/o lactato aunque el patrón de ERM a TEL sugeriría una contribución mayoritaria en el pico de 1,3ppm por parte del lactato pico invertido a TE 136 ms (figura 3.28C).

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

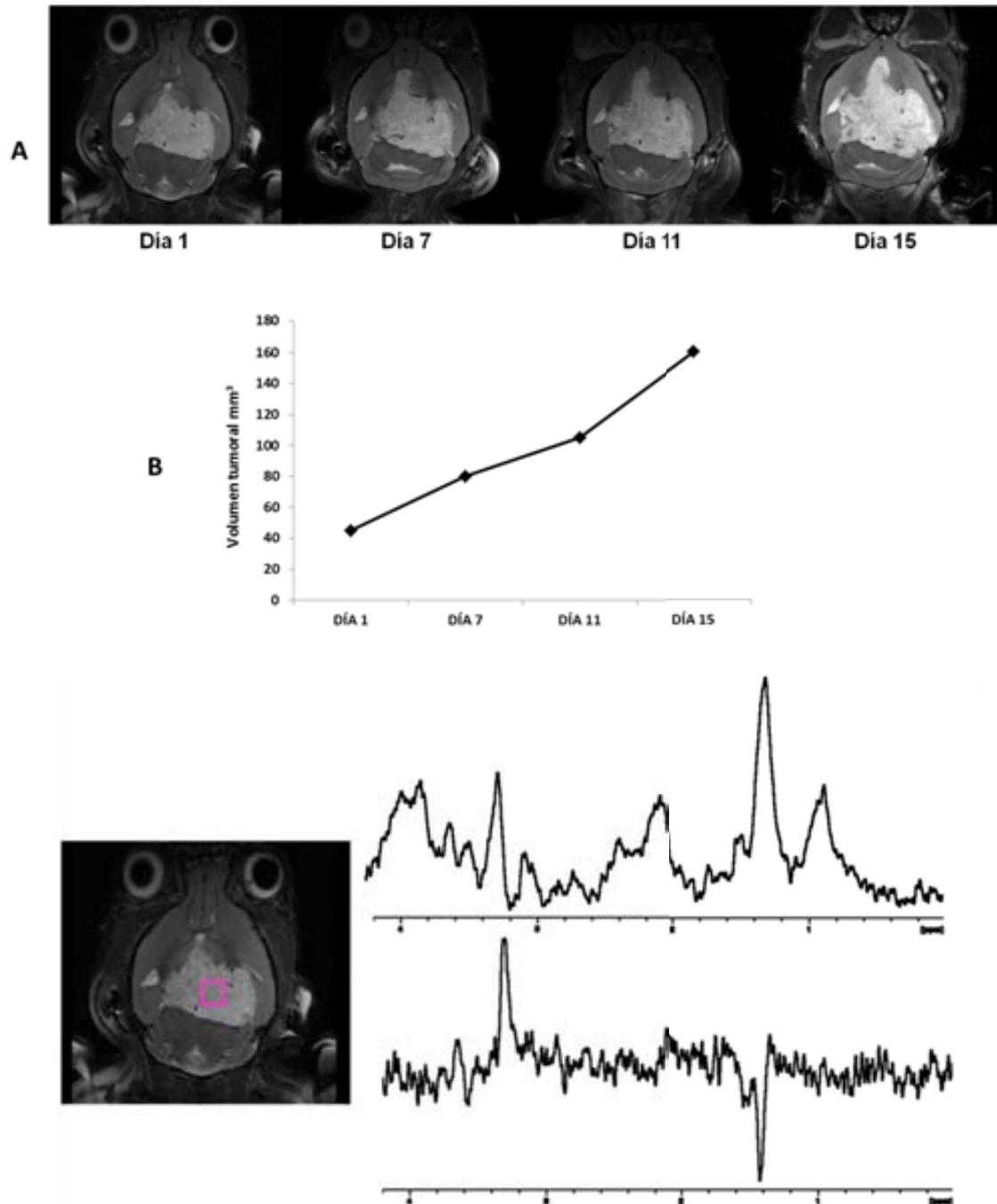


Figura 3.28: A) IRM de alta resolución ponderada en T_2 en orientación axial del cerebro del animal S910, adquirida a 7T a diferentes días después de detectar la masa tumoral (indicados bajo cada imagen). B) Seguimiento de la progresión volumétrica tumoral del animal S910 desde el día de la detección de la masa tumoral hasta el día de su sacrificio por razones de protocolo y ética animal (volúmenes expresados en mm^3). C) A la izquierda, imagen de alta resolución ponderada en T_2 del animal S910, 11 días después de la detección de la masa tumoral. El

CAPITULO 1:

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

voxel utilizado en los estudios ERM está representado por el recuadro rosa. A la derecha, se muestran los espectros a TEC (superior) y TEL (inferior) adquiridos a 12 y 136 ms respectivamente, en el rango de 0 a 4,2 ppm.

Después de 14 días de haberse detectado la masa anómala se realizaron estudios de IERM-PM donde se pudo observar un claro acúmulo de DMSO en zonas de su interior lo que sugiere un tumor heterogéneo [26] (figura 3.29). El S910 al día 11 ya presentaba ruptura de la BHE (figura 3.34). A día 14 después de la detección también se llevó a cabo un estudio de IERM-PM con glucosa, utilizándose la matriz de datos para testear mediante *spectral classifier* v 3.0 el tipo y grado de tumor predecible se usó para ello el clasificador descrito en [28] para discriminar parénquima cerebral no tumoral (normal) glioblastoma. El resultado obtenido en la imagen nosológica que se muestra en la figura 3.30 es compatible con un tumor de tipo inicial oligodendroglial con patrón heterogéneo, posiblemente progresando a un grado intermedio (oligodendroglioma anaplásico) o alto (glioblastoma), de manera parecida a lo comentado para el ratón P176 en la figura 3.35.

Una muestra del tumor post mortem fue reservada para análisis histopatológico siendo el diagnóstico final de oligodendroglioma anaplásico (grado III),

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

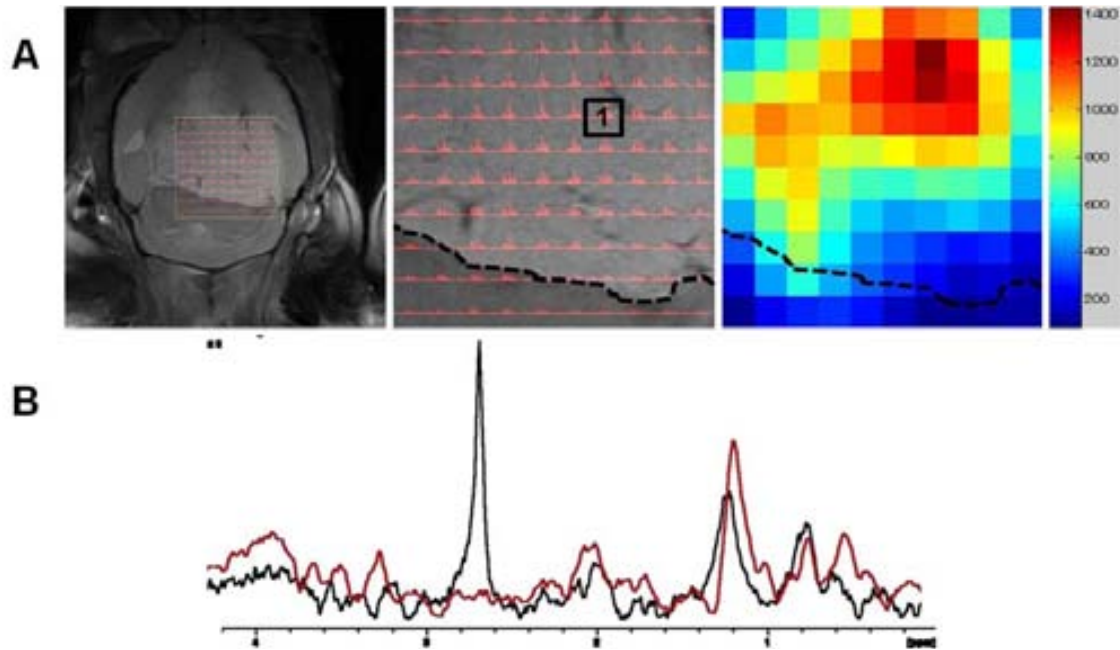


Figura 3.29: A) VOI de adquisición (cuadrado amarillo) para las secuencias IERM (12ms TE) superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T_{2w} HR) en el animal S910 a 15 días después de su detección. El VOI a mayor aumento se muestra en el centro. En el recuadro con código de colores la línea punteada negra marca el límite de la masa anómala (marcado con 1). A la derecha se muestra un mapa en escala de color de la intensidad de DMSO detectada en el VOI 88 minutos tras su administración. B) Promedio de espectros obtenidos de los voxels individuales dentro del VOI delineado por la línea negra. La línea blanca continua indica la zona de donde se tomaron los espectros.

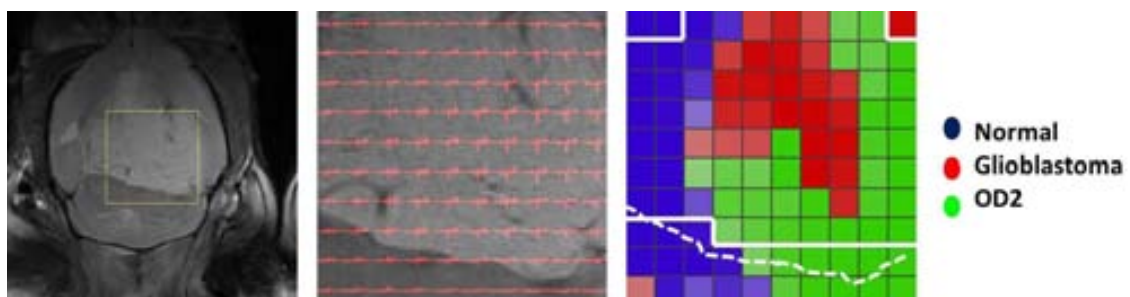


Figura 3.30: De izquierda a derecha: imagen T_{2w} HR de referencia para los estudios de IERM-PM llevados a cabo en el animal S910 a día 14 después de la detección inicial de la masa

CAPITULO 1:

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

anómala; ampliación del VOI de dichas secuencias con los límites de la masa anómala marcados con una línea blanca discontinua y mapa nosológico de clasificación de cada *voxel* independiente extraído a partir del *Spectra Classifier* v3.0 (la leyenda se muestra a la derecha).

Como el comportamiento de las masas anómalas en las colonias GEM fue tan heterogéneo e irregular, en algunos casos fue imposible realizar estudios de IERM-PM. En la Tabla 3.6 se muestra un resumen de los estudios de IERM-PM realizados en esta tesis en las diferentes colonias GEM durante los años 2019 a 2012.

COLONIAS	IERM-PM (DMSO)	IERM-PM (GLUCOSA)
Colonia R	2	1
Colonia P	1	1
Colonia S	11	6

Tabla 3.6: Número de estudios de IERM-PM realizados para las colonias P, R y S.

3.3.4. Estudios de integridad de la BHE (administración y captación de contraste)

Dentro de los estudios realizados en el protocolo piloto, se encuentran los estudios de IRM con secuencias T_{1w} -CE para comprobar la integridad de la BHE en los animales investigados. La captación de contraste en las imágenes ponderadas en T_1 implica ruptura de la BHE y, por lo tanto, sugiere un grado tumoral más elevado. Dado que los animales presentaban grados tumorales diferentes de crecimiento heterogéneo, y considerando que las masas anómalas fueron encontradas cuando presentaban volúmenes muy distintos; nuestros resultados con respecto a la integridad de la BHE reflejan esa heterogeneidad (figura 3.31). Los criterios tenidos en cuenta para definir los estadios fueron los siguientes: Estadio temprano, tumores con volúmenes

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

comprendidos entre 20-50 mm³, estadio intermedio entre 70-90 mm³ y estadio tardío entre 130-180 mm³.

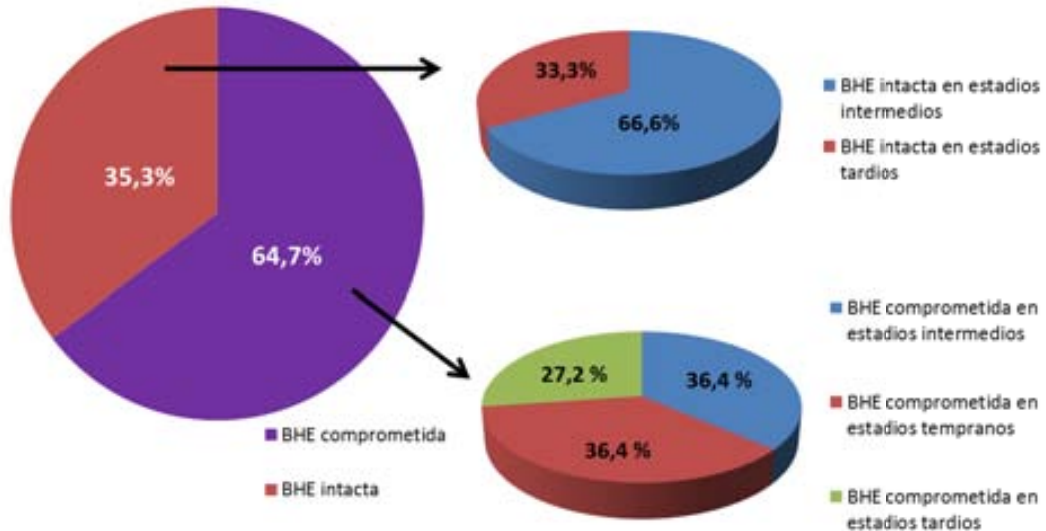


Figura 3.31: Animales GEM totales estudiados por T_{1W}-CE (n=16) que presentan ruptura de la BHE según el estadio de progresión tumoral, según un criterio arbitrario basado en el volumen de la masa anómala detectada.

Las imágenes de T_{1W}-CE después de la administración de contraste (en este caso Gadolinio-DTPA), en caso de ruptura de la BHE, evidencian la capacidad del agente de alcanzar el tumor por captación a partir de la corriente sanguínea. Esto se refleja en un aumento de la intensidad aparente en la imagen en la zona de la masa anómala (figuras 3.32 y 3.34). Estos experimentos se realizaron sobre todo con animales que participaban del experimento piloto, motivo por el cual los resultados mostrados se centran en las colonias S, R y P, de las que a continuación se proporcionan algunos ejemplos característicos.

R279

Este animal, perteneciente a la colonia R, era un macho que presentaba el genotipo Tg, y tenía 12 semanas de edad en el momento de la detección de la masa anómala por IRM. La masa se hallaba localizada en la zona del córtex, muy próximo al hueso craneal y cómo podemos comprobar en la (figura 3.32), presenta rotura la BHE 6 días después de la detección inicial de la masa anómala.

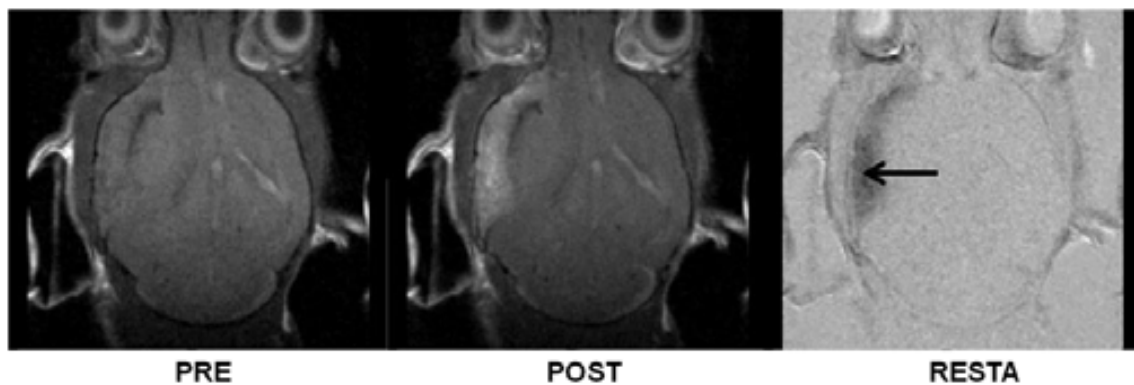


Figura 3.32: IRM ponderada en T_{1w} (pre- y post- administración de agente de contraste, así como la substracción de dichas imágenes “resta”, en orientación axial del cerebro del animal R279, adquirida a 7T y 6 días después de la detección inicial de la masa anómala (volumen de 95 mm^3). La flecha señala el punto donde se observa clara captación de contraste por parte de la masa anómala.

S885

Este animal, perteneciente a la colonia S, era un macho que presentaba el genotipo Tg/ko-/-, tenía 52 semanas de edad en el momento de la detección de la masa anómala. El diagnóstico final mediante histopatología después de 31 días de progresión desde la detención inicial por IRM fue oligodendroglioma anaplásico grado III/IV. Dicho diagnóstico “IV” sería equivalente a un glioblastoma, y sugiere que áreas concretas de éste tumor ya no contenían elementos compatibles con un grado III, sino

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

que habrían progresado a grado IV siendo heterogéneo por tanto en su composición. Sin embargo no se detectó captación aparente de contraste en la exploración llevada a cabo 25 días después de la detección inicial de la masa anómala, 6 días antes del sacrificio del ratón.

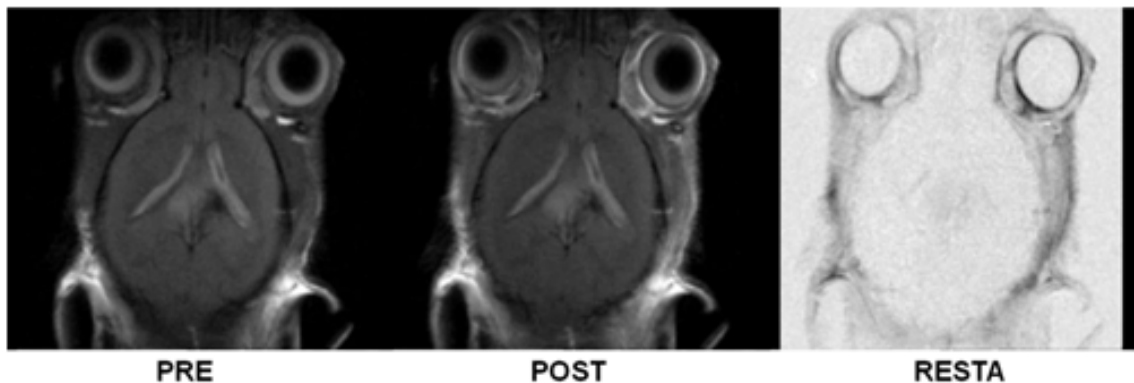


Figura 3.33: IRM ponderada en T_{1w} (pre- y post- administración de agente de contraste, así como la substracción de dichas imágenes, “resta”, en orientación axial del cerebro del animal S885, adquirida a 7T a 25 días después de la detección inicial de la masa anómala.

S910

Este animal, perteneciente a la colonia S, era un macho que presentaba el genotipo Tg/ko+/-, tenía 36 semanas de edad en el momento de la detección de la masa anómala y el diagnóstico final después de 15 días de progresión desde la detección inicial por IRM mediante histopatología fue de oligodendroglioma anaplásico (grado III). Aunque su diagnóstico final guarda cierta similitud con el caso anterior (S885), cabe resaltar que en éste caso la captación tumoral y afectación de la BHE es clara (figura 3.34) contrariamente a lo visto previamente con el S885.

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

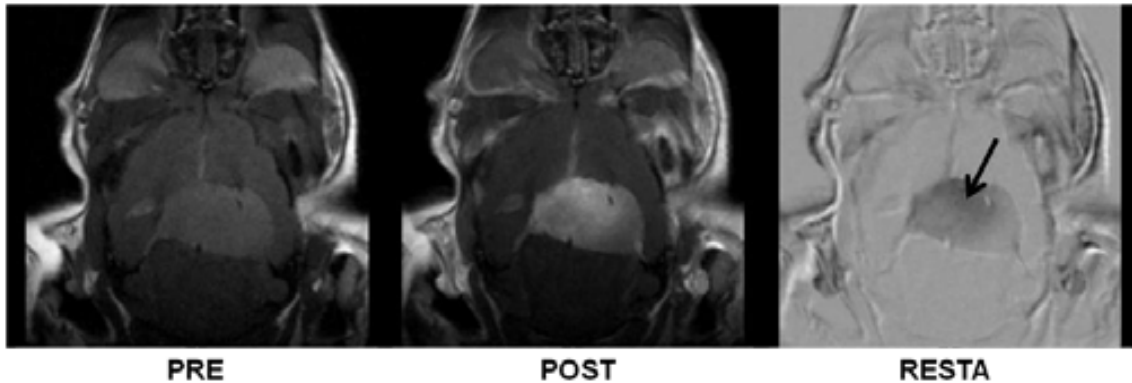


Figura 3.34: IRM ponderada en T_{1w} (pre- y post- administración de agente de contraste, así como la substracción de dichas imágenes, “resta”, en orientación axial del cerebro del animal S910, adquirida a 7T y 11 días después de la detección inicial de la masa anómala. La flecha señala la zona donde se observa clara captación de contraste por la masa.

S851

Este animal, perteneciente a la colonia S, era un macho que presentaba el genotipo Tg/wt , tenía 96 semanas de edad en el momento de la detección de la masa anómala que se localizaba en el bulbo olfatorio, y el diagnóstico final después de 32 días de progresión desde la detección inicial por IRM por histopatología fue de oligodendroglioma grado II. En este estudio no hay captación aparente de contraste, Lo que sería compatible con el grado detectado por histopatología (figura 3.35).

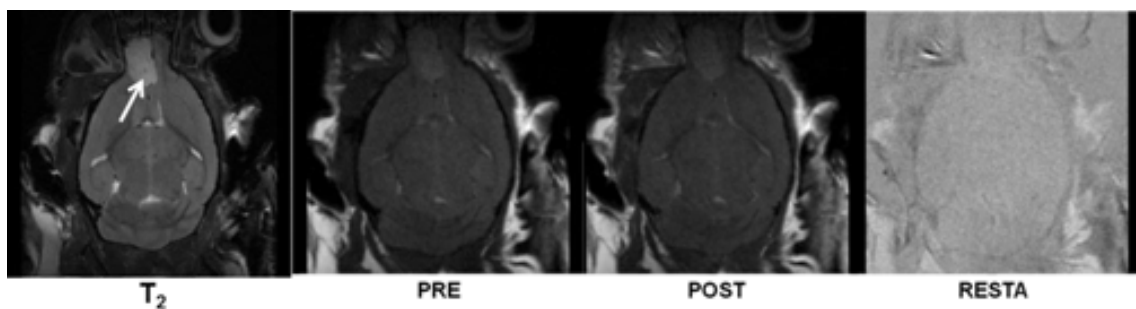


Figura 3.35: De izquierda a derecha IRM ponderada en T_2 , IRM ponderada en T_1 (pre- y post- administración de agente contraste, así como la substracción de dichas imágenes, (“resta”), en orientación axial, del cerebro del animal S851, adquirida a 7T el día de la detección de la masa

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

anómala. En este estudio no parece haber captación de contraste. La flecha señala la masa anómala.

3.3.5 Resumen de los Estudios histopatológicos

Los estudios histopatológicos se llevaron a cabo con muestras de los todos los animales que murieron o se sacrificaron después de indicios de masa tumoral anómala. Con este estudio, se buscaba una caracterización de la distribución de tumores en las colonias GEM y además comprobar posibles diferencias entre la incidencia global de tumores y la incidencia de masas cerebrales anómalas detectadas por IRM, ya que tumores en estadio muy temprano de evolución podrían ser detectados histopatológicamente, pero quizás no por IRM.

Colonias N y G:

De un total de 190 animales estudiados por histopatología en la colonia N y 230 estudiados en la colonia G, se puede observar (figura 3.36) que en un alto porcentaje de ellos (superior a 80% en ambos casos) no se detectó presencia de tejido compatible con tumores cerebrales. Entre el bajo porcentaje de los animales que sí presentaban lesión, cabe destacar la considerable contribución de sarcomas en la colonia G, que en este caso se trataba de sarcomas detectados en diversas partes del cuerpo (tumores no cerebrales) (figura 3.36A).

En la colonia G, la lesión más frecuentemente detectada fue “astrocitocis displásica”, que es un estadio que podría preceder la evolución a un tumor astrocítico pero que en esta colonia no se llegó a producir en la mayoría de los casos.

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

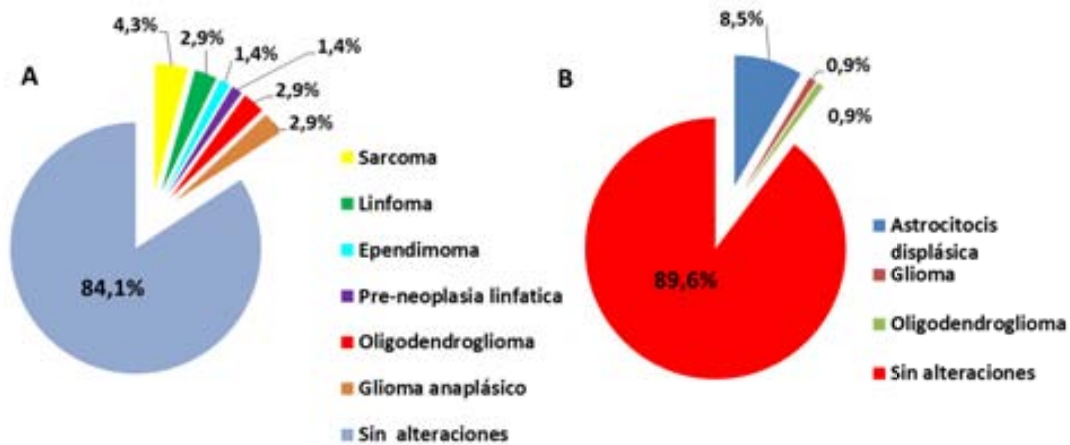


Figura 3.36: Distribución de los diagnósticos encontrados en los estudios histopatológicos. A) Colonia N y B) Colonia G.

Colonias P y R:

De un total de muestras de 21 animales estudiados por histopatología para la colonia P, casi la mitad (43%) no presentaban alteraciones compatibles con tumor cerebral (figura 3.37). Dentro de los animales que sí presentaban anomalías, la patología más frecuente fue oligodendroglioma anaplásico (grado III) con un 24% del total de las muestras estudiadas. Las siguientes patologías más frecuentes fueron oligodendroglioma de grado II con un 14% y glioblastoma con un 9% (figura 3.37A). Las muestras clasificadas como “no evaluable”, se debieron a que en el momento de fijar el cerebro para los análisis de histopatología, el animal ya llevaba algún tiempo muerto en el estabulario (entre 8-15 horas) y el tejido a evaluar presentaba ya cierto grado de alteración morfológica y citológica en su estructura incompatible con su evaluación histopatológica.

En la colonia R se estudiaron por histopatología muestras de un total de 13 animales. Un 38% de dichas muestras no presentó ninguna alteración, y un porcentaje similar

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

presentó displasia neuronal lo que también, como en la colonia G, sugiere un estadio de progresión anterior a las alteraciones tumorales. Los animales que sí presentaban lesiones compatibles con tumores, evidenciaron glioblastoma difuso y tumor glial sin permitir especificación de tipo o grado a porcentajes iguales (figura 3.37B).

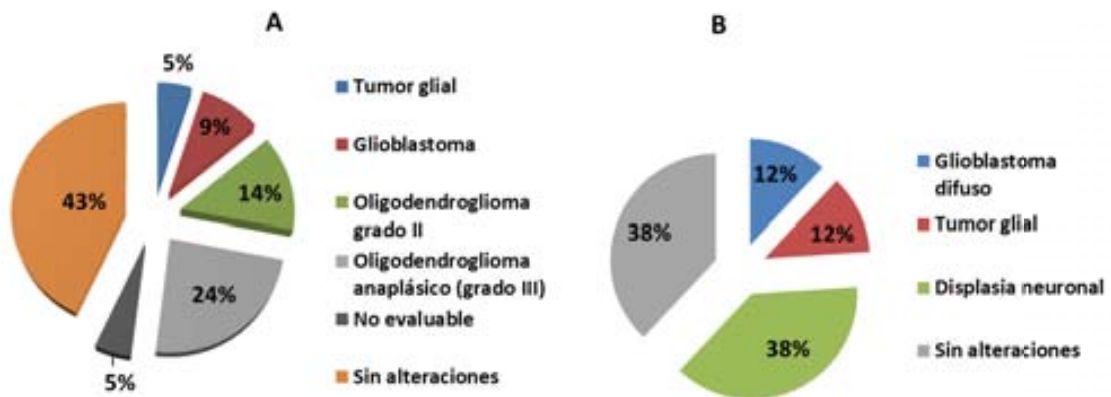


Figura 3.37: Distribución de las diferentes patologías encontradas en los estudios histopatológicos. A) Colonia P y B) Colonia R.

Colonia S:

De la colonia S se estudiaron por histopatología un total de 64 animales. Un porcentaje relativamente alto (63,8%) no presentó ninguna alteración compatible con tumor cerebral. Dentro de los 36,2% que sí presentaron algún tipo de lesión, el diagnóstico con el porcentaje más elevado fue el de oligodendroglioma grado II con un 61% seguido por los oligodendrogliomas anaplásicos grado III, con un 19% (figura 3.38).

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

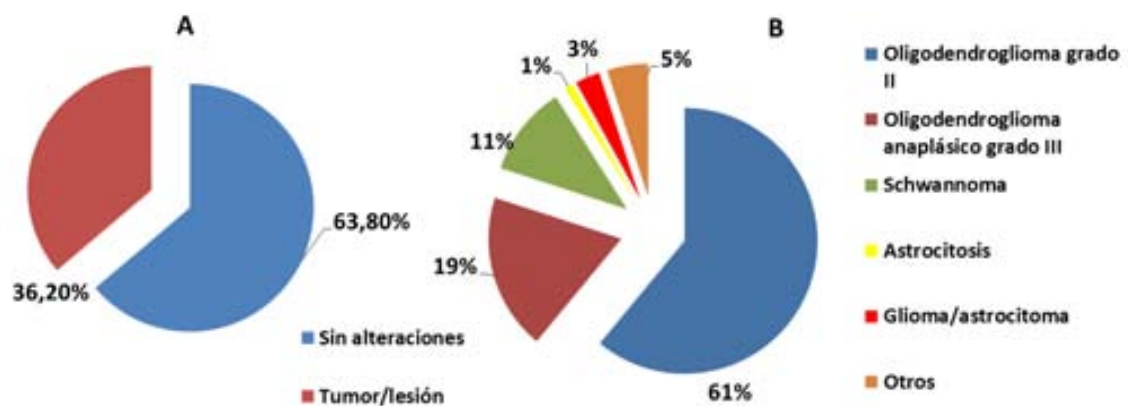


Figura 3.38: A) Total de animales que presentaron tumor o lesión. B) Distribución de las diferentes patologías encontradas en los estudios histopatológicos en la colonia S.

3.4 DISCUSIÓN

La caracterización inicial de las colonias GEM se llevó a cabo con un análisis genotípico, cuya distribución en la población estabulada se optimizó al máximo escogiendo consecuentemente los progenitores en los subsiguientes cruces. Dicha caracterización genotípica se llevó a cabo como había sido descrito por los proveedores de los distintos modelos [111,124,140], excepto en el caso de la colonia R, para la cual fue necesario llevar a cabo un exhaustivo procedimiento de puesta a punto para asegurar el correcto genotipado de dicha colonia [141]. Los resultados obtenidos en el cruce y mantenimiento de las colonias se correspondieron a lo esperado, tanto en relación a la distribución de sexo de los animales, como la distribución de los genotipos, una vez escogidos de manera razonada los cruces. Aparte del dato de genotipo y edad (para animales en cruce, la edad máxima establecida fue de 16-24 semanas), también se orientó a repetir los cruces en los cuales la camada daba lugar a animales que realmente presentaban masas anómalas

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

confirmadas como tumores cerebrales, en un intento de optimizar la penetrancia del fenotipo tumoral.

Los análisis histopatológicos llevados a cabo por el Dr. Martí Pumarola del *Centre de Biotecnologia animal i de terapia Génica (CBATEG)*, demostraron considerable similitud entre las características morfológicas observadas en nuestros modelos preclínicos y las características histológicas observadas en tumores humanos, por ejemplo oligodendrogliomas [142]. En ambos casos, tumores preclínicos evaluados durante esta tesis y tumores humanos descritos en la literatura, se observó proliferación neoplásica de células tipo glial, con células de forma redonda o poligonal, núcleos grandes, cromatina laxa y uno o más núcleos.

En nuestros resultados, hemos observado una penetrancia en el desarrollo de tumores cerebrales que no concordaba con lo descrito en la bibliografía por los desarrolladores de los distintos modelos [111,124,140]. Por ejemplo, en el caso de la colonia “N”, Reilly *et al* [140] afirmaban que el fenotipo de desarrollo de tumor cerebral (astrocitomas de grado bajo o intermedio) alcanzaba valores de 92% del total de los animales a los 6 meses de edad, mientras en nuestro caso, en la muestra de animales estudiados entre 2 y 16 meses de edad, dicho porcentaje no sobrepasó el 15% (considerando los análisis histopatológicos llevados a cabo entre 2006 y 2009, lo que refleja una penetrancia claramente más baja que la descrita previamente para ésta colonia GEM). La presencia de otros tipos de tumores, como sarcomas (descritos por Reilly *et al*) [140] puede complicar y acortar el tiempo de vida de los animales, aunque en nuestro caso el porcentaje de tipos de diagnóstico no relacionados con tumores cerebrales, alcanzó solo un total de 7,2 %.

En la colonia “G”, tal y como fue efectivamente descrito por Weisseberger *et al* [124], la mayoría de los casos tenía un componente importante de astrogliosis,

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

probablemente por la presencia del inserto v-src. Ésta colonia ya se había descrito con una penetrancia relativamente baja 35% en el fenotipo tumoral de astrocitomas, pero en nuestro caso no se pudo superar el 3,8% de incidencia dentro de los animales portadores del genotipo transgénico.

Con la colonia “S”, para el genotipo con mayor penetrancia, que fue el Tg/ko+/-, en un estudio longitudinal a lo largo de un año, Weiss *et al.* [111] observaron que, aproximadamente, 90% de los animales murieron a causa de oligodendrogliomas. En nuestro análisis, llevado a cabo durante los años 2005 a 2012, la colonia S presentó una incidencia de tumores de tan solo un 36,2%, porcentaje que se obtuvo únicamente de los datos obtenidos por histopatología. Lo que si se cumplía era la predominancia de diagnóstico histopatológico observado que fue la de oligodendroglioma, tal como fue descrito por los desarrolladores iniciales. Para la colonia P se alcanzaron valores más altos de penetrancia de hasta 52% (teniendo en cuenta solamente los análisis histopatológicos) de los animales, con un claro predominio de los oligodendrogliomas de alto grado sobre otros diagnósticos histopatológicos. No obstante, uno de los inconvenientes relacionados con esta colonia es que sus animales presentaban un patrón bastante agresivo de formación y desarrollo de tumores muy tempranos, como se puede ver en la gráfica 3.16 de aparición de los síntomas neurológicos (19 semanas). Éste hecho dificulta un estudio de la evolución de dichos tumores, así como su utilización en posibles experimentos de análisis de patrón tumoral, o estudio de nuevas estrategias terapéuticas o de agentes de contraste. Además, después de la detección de los síntomas, en un periodo corto (aproximadamente 10 días) sobrevinía la muerte del animal. Esto, a efectos del estudio que se pretendía llevar a cabo en esta tesis, era un elemento distorsionador dado que no permitía evaluar y estudiar la evolución del tumor hacia grados más altos, muchas veces ni tan solo siquiera permitiendo la ejecución de las técnicas básicas de diagnóstico por la gravedad del

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

estado sanitario de los animales, cuando el estabulario informaba de los primeros síntomas neurológicos.

Finalmente, para la colonia “R”, los desarrolladores [127,143,144] describen una alta incidencia de hiperplasia glial, aunque el aumento de la edad de los animales debería llevar a un aumento descrito de hasta 95% en la incidencia de la formación de astrocitomas de bajo y alto grado, lo que dista del porcentaje (24%) obtenido en nuestras condiciones experimentales.

Las diferencias entre los valores observados de penetrancia entre los datos descritos en la literatura y los observados en esta tesis podrían deberse a factores ambientales como el estrés, tal y como fue descrito por Giraldi, *et al* [145] para un modelo de metástasis, aunque posibles cambios en la dieta o el status microbiológico que pudiesen afectar el sistema inmunológico natural del animal, también podrían ser determinantes en modulaciones de la penetrancia del fenotipo tumoral. Es importante remarcar también que el análisis de penetrancia descrito por los desarrolladores se suele realizar teniendo en cuenta las distribuciones de patología con estudios histopatológicos de punto final de un determinado grupo de animales al completo, cosa que no se llevó a cabo en nuestro caso, ya que se priorizaron estudios no invasivos de las posibles masas intracerebrales anómalas por IRM/ERM/IERM. Debido, a eso, no todos los animales que murieron en los años de evolución de las colonias GEM que contempla esta tesis fueron analizados por histopatología si no presentaron síntomas evidentes o se detectó una masa anómala por IRM. Por ello la penetrancia encontrada por nosotros podría haber sido artefactualmente menor que la descrita por los autores iniciales.

Por ello, sería ideal que los animales desarrollaran síntomas de la enfermedad en sus estadíos iniciales para permitir la correcta monitorización de su evolución y análisis de

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

patrones metabólicos con y sin perturbación espectral durante la progresión tumoral. Siguiendo ésta línea de razonamiento, los análisis iniciales de caracterización de la colonia GEM por IRM/ERM/IERM incluían solamente animales que presentaran síntomas neurológicos posiblemente indicativos de la presencia de una masa anómala. Juntamente con el personal veterinario del *Servei d'Estabulari* de la UAB, se estableció un criterio de evaluación semanal de los animales, en los cuales se nos entregaba una lista de los posibles animales de interés que presentaban síntomas sospechosos de una masa anómala en estadios tempranos. Entre los síntomas más recurrentes en estos animales se encontraron movilidad anómala, paresia y pérdida de peso. Dichos síntomas se encuentran también presentes en los animales que desarrollan tumores de tipo glial descritos en el estudio realizado por Jason *et al* [146] por lo que sería de suponer que estos animales presentaran masas anómalas que podrían ser compatibles con tumores cerebrales, en general de tipo glial.

El número de animales que desarrollaron síntomas indicativos de enfermedad en las colonias S, P y R no fue muy elevado y, dentro de ese número, solo un porcentaje menor desarrolló masas anómalas que realmente se confirman como tumores cerebrales.

Los resultados preliminares, sobre todo en relación a las colonias “N” y “G” no lograron dar respuesta a nuestra necesidad de contar con un modelo GEM de tumor espontáneo y de preferencia de bajo grado, con lo que se optó por seguir evaluando con mayor detalle la colonia “S” y, además, intentar reproducir en nuestras condiciones experimentales la incidencia descrita para las colonias “P” y “R” que se obtuvieron en colaboración con sus desarrolladores. La colonia que más se acercaba al tipo de tumor espontáneo adecuado a los estudios de nuestro grupo (aunque con una penetrancia más baja de la descrita) era la colonia “S”, seguida de la “R” esta última por el gran interés en disponer de un modelo de progresión tumoral astrocítica.

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

Teniendo en cuenta los resultados ya descritos, de una baja incidencia de detección tumoral cuando se exploraban de manera rutinaria solamente los animales con síntomas neurológicos indicativos de una masa anómala, se hipotetizó que una búsqueda sistemática de tumores, analizando todos los animales portadores del genotipo de interés (el llamado “estudio piloto”), nos acabaría llevando a encontrar un porcentaje de masas anómalas que se acercara más a lo descrito por la literatura [111,124,127], porque se detectarían también los animales que no llegaban a desarrollar síntomas evidentes de patología. Los resultados que se muestran en la Tabla 3.4 contradicen esa hipótesis, dado que el porcentaje de tumores encontrados en las distintas colonias siguió siendo bajo (16,7% % para colonia S, 7,7% para colonia P y 4,3% para colonia R) (teniendo en cuenta los estudios por IRM/ERM).

Por los resultados descritos hasta aquí, por un lado quedan evidentes las diferencias de penetrancia si se comparan los casos resultantes de análisis histopatológicos en una población significativa de la colonia, y los casos resultantes de una población analizada por IRM/ERM seguidos de confirmación histopatológica, siendo éstos últimos mucho menos numerosos. Por otro lado, y para la mayoría de las colonias, la incidencia general de tumores queda alejada de la incidencia reportada en la bibliografía. Esto se tradujo en una gran dificultad de poder contar con un modelo estable, reproducible y accesible de tumor cerebral preclínico de bajo grado, aparte del gran esfuerzo económico y de recursos humanos que supuso mantener activas una serie de colonias de animales transgénicos.

El interés en disponer de un modelo preclínico de bajo grado, asociada a la baja penetrancia del fenotipo de tumor cerebral en nuestras colonias GEM fue un factor limitante que nos llevó a plantear la posibilidad de generar una línea de tumor transplantable a partir de uno de estos tumores espontáneos GEM. Para ello, deberíamos maximizar nuestros métodos de detección no invasiva del grado tumoral,

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

de manera de detectar lo más tempranamente posible una masa anómala compatible con tumor de bajo grado, para llevar a cabo los primeros intentos de modelo transplantable. Ello llevó a la colaboración de la autora de esta tesis con otros miembros del GABRMN para mejorar las estrategias de imagen molecular para diagnóstico y generación no invasiva de tumores cerebrales preclínicos GEM [26,28]. Dicho trabajo colaborativo pudo llevarse a cabo en parte gracias a los ratones GEM que el mantenimiento de las colonias descritas en este capítulo produjo.

Entre las masas anómalas detectadas en las exploraciones IRM, para algunas colonias GEM se encontraban casos que eran claramente compatibles tanto con tumores cerebrales de alto como de bajo grado (colonia S, colonia P). Se trataba de lesiones circunscritas, con evidente afectación en las imágenes ponderadas en T₂, localizadas predominantemente en uno de los hemisferios o en el mesencéfalo, presentando patrones variables de captación de contraste según el estadio tumoral, y tiempos de evolución variable hasta la muerte del animal dependiendo de la presión ejercida en centros vitales del cerebro. La colonia P, como previamente se ha mencionado, tenía un desarrollo muy rápido y de lesiones bastante agresivas que en seguida mostraban captación de contraste, por lo que nos impedía encontrar el animal GEM que presentase las características ideales de bajo grado y evolución del tumor lenta para nuestro objetivo de tumor transplantable. Por otra parte, la colonia R presentaba repetidamente un patrón de lesión bastante difuso, poco circunscrito y poco claro, con una gran afectación ventricular. Esto daba lugar a lesiones que no resultaban muy adecuadas a los estudios IRM/ERM/IERM, por la gran dificultad de situar el volumen de interés en una zona claramente anómala sin contribución del tejido adyacente. Los estudios de la integridad de BHE mostraron gran dispersión en el comportamiento tumoral, aunque en líneas generales seguía siendo válida la

CAPITULO 1:

**Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

extrapolación de que la captación de contraste es un indicio muy fiable de la presencia de grado tumoral elevado.

Dentro de la evolución de los tumores y su volumen relativo, este no parece ser tampoco un determinante en la captación de contraste. Más del 70% de los casos (figura 3.31) presenta ya captación de contraste en estadios tempranos e intermedios de su volumen tumoral. El 27% restante lo presenta al final a volúmenes, lo que sería compatible con una evolución hacia grados más elevados debido a una progresión tumoral en los GEM investigados.

Estos datos experimentales iniciales nos indicaban que la colonia más adecuada para ofrecer un candidato de tumor para generar una línea transplantable de tumor de bajo grado era la “S”. No obstante como es bien sabido (y así corroboran nuestros datos experimentales), a veces los criterios anatómicos y de captación de contraste reflejan con cierta inexactitud el grado del tumor [42,147] por lo que fue necesario refinar al máximo las técnicas de determinación de tipo y grado tumoral de manera no invasiva, utilizando herramientas tanto de ERM como IERM, con y sin perturbación del patrón espectral para evaluarlo. Esto se hizo necesario porque naturalmente, si se sacrifica el animal para obtener confirmación histopatológica, ya no se puede disponer de esa misma porción de muestra para el intento de establecimiento de la línea transplantable de bajo grado.

Los estudios de IERM-PM llevados a cabo tuvieron como finalidad, la determinación del grado tumoral de la manera más exacta posible de una manera no invasiva. Un ejemplo de esto lo podemos ver con la perturbación metabólica con glucosa que nos permite analizar un caso con un clasificador optimizado, donde se obtiene mejores resultados, utilizando los datos de IERM-PM con hiperglicemia a 12ms [131,28], ya que incrementa el rango dinámico de las diferencias entre tumores de distintos grados

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

que responden de manera distinta a las perturbaciones metabólicas, porque sus células no tienen los mismo elementos metabólicos cerebrales. Además los cambios bioquímicos deberían preceder a los cambios histopatológicos o morfológicos. Esto nos podría ayudar a determinar mejor el grado tumoral en cuestión y decidir si sería adecuado para el desarrollo de una la línea transplantable o no. Finalmente, el uso del DMSO en experimentos IERM-PM parece indicar de alguna manera la presencia de proliferación activa, que se detecta como “zonas de acúmulo o *“hot spots”*”, a veces dentro y a veces fuera del tumor, siendo distintas también por ejemplo en casos que responden a la terapia y casos que recidivan [148], lo que puede apoyar la idea de un marcaje indirecto de la fase de proliferación tumoral parte de retención diferencia de DMSO. Aunque hay distintas hipótesis para lo que realmente está “marcando” el DMSO (por ejemplo macrófagos peritumorales), aún no hay suficiente evidencia para corroborar o rechazar dicha hipótesis. Nuestro grupo sigue trabajando en la dirección de clarificar las diferencias entre la retención de DMSO en los distintos tejidos cerebrales normales y patológicos y evaluar como esto puede ser de utilidad para diagnóstico y pronóstico de las masas anómalas cerebrales.

3.5 Conclusiones relativas al estudio y caracterización de las colonias GEM

1. Se han mantenido, cruzado y caracterizado genotípica y fenotípicamente 5 colonias distintas de animales GEM para la obtención y estudio de tumores cerebrales espontáneos con un total de 2537 animales evaluados a lo largo del periodo 2006-2012.
2. No ha sido posible, en ninguna de las 5 colonias, reproducir el resultado de penetrancia descrito en la literatura por los generadores iniciales de dichas colonias, en parte por la diferencia de técnicas usadas en la detección y

Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse” (GEM) accesibles al GABRMN

- caracterización (histopatología de punto final vs. técnicas de resonancia magnética, seguidos de histopatología).
3. Aunque con una penetrancia inferior (3,8% -16,7%) a la descrita en la literatura (64%-80%), todas las colonias que se mantuvieron produjeron tumores cerebrales espontáneos (4+/-3) del tipo glial y oligodendrogial, con distribución diagnóstica y grados variables dependiendo de alteraciones genéticas, esencialmente de acuerdo con lo descrito por sus generadores iniciales.
 4. No todas las masas anómalas desarrolladas por la colonia pudieron ser utilizadas para los estudios de MRI/MRS/MRSI, dado que localizaciones en zonas de difícil ajuste de la homogeneidad del campo magnético impidieron la correcta adquisición e interpretación de este tipo de datos.
 5. El estudio piloto llevado a cabo con las colonias S, R y P mejoró de manera substancial la detección de tumores, obteniéndose una penetrancia mayor (10%), pero aun así alejada de la descrita en la bibliografía, y esto a su vez llevó al planteamiento del desarrollo de una línea transplantable de bajo grado (ver capítulo 2).
 6. De todas las colonias GEM estudiadas, la más adecuada para el desarrollo de masas anómalas compatibles y utilizables para los estudios de MRI/MRS/MRSI fue la “S s100 β -v-erbB / inK4a-Arf (+/-).”, por su mejor penetrancia (16,7%), por el desarrollo de lesiones bien delimitadas y de evolución a medio término, con predominancia de grados bajos. En consonancia con estos resultados, ésta fue la colonia escogida para intentar el desarrollo de una la línea transplantable de bajo grado.
 7. Los estudios con IERM-PM desarrollados en el grupo y llevados a cabo en el experimento piloto (con un total de 307 ratones GEM evaluados por varios investigadores) ayudaron sensiblemente a mejorar y complementar la detección no invasiva de tumores de grado bajo e intermedio en las colonias

**CAPITULO 1:
Descripción y caracterización de las colonias de “enetically engineered mouse”
(GEM) accesibles al GABRMN**

GEM, dado que los estudios DCE con administración de contraste no siempre ofrecieron una información fiable sobre el grado tumoral investigado.

**CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral**

4. CAPITULO 2: INTENTO DE GENERACIÓN DE UN MODELO TRANSPLANTABLE DE TUMOR CEREBRAL MURINO DE GRADO BAJO.

4.1 OBJETIVO

El objetivo de este capítulo fue la generación de una línea transplantable a partir de un tumor glial de grado bajo o intermedio desarrollado por ratones GEM, debido a la baja penetrancia observada en los tumores espontáneos desarrollados por dichas colonias (ver capítulo 1). Ello nos proporcionaría un modelo adecuado para el estudio de patrones espectrales a lo largo de la progresión tumoral y también un modelo adicional para el estudio de nanopartículas como potenciales agentes de contraste (ver capítulo 3).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Cultivos celulares-células GL261

Las células de la línea GL261 de glioma murino fueron obtenidas del *Tumor Bank Repository*, situado en el *National Cancer Institute-Frederick* (NCI) en Frederick, USA. Esta línea fue seleccionada como modelo para la puesta a punto de protocolos de disgregación y trasplante de tumores por haber sido previamente caracterizada en el grupo en relación al patrón espectral de los tumores murinos generados con ella [27,131] y por tener un comportamiento altamente reproducible en la generación de gliomas de grado alto (grado IV) en modelos animales murinos [107].

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Condiciones estándar de cultivo

Las células se cultivaron en frascos de 75 cm² (Nunc, LabClinics SA, Barcelona) utilizando medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma, Madrid) suplementado con 2,0 g/l de Bicarbonato de sodio, 0,285 g/l de Glutamina, un 10% de Suero Fetal Bovino y un 1% de penicilina-estreptomicina. Todos los suplementos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, Madrid, excepto el suero, que procedía de Gibco, Invitrogen Corporation, Reino Unido. El período de tiempo necesario para alcanzar la fase de confluencia (75-85% de la superficie del frasco cubierta de células) era de 7 días a partir del momento del subcultivo, antes de llegar a confluencia. El cambio de medio se estableció en los días 3 y 5 de cultivo. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera estéril con un 5% de CO₂ y humedad del 95% en un incubador (HeraCell, 150i, Thermo Scientific). En el momento del subcultivo, el medio era eliminado por aspiración con una bomba de vacío y las células se lavaban con 10ml de PBS estéril. A continuación, después de eliminar el PBS, se añadían 2ml de tripsina-EDTA (0,5 g/L y 0,2 g/L respectivamente) (Sigma, Madrid) para desprenderlas de las paredes del frasco (durante 2 minutos) y se resuspendían en 8 ml de medio RPMI (10ml de volumen total de resuspensión). Dos gotas de esta resuspensión (7×10^5 células aproximadamente) eran sembradas en los nuevos frascos. Las células fueron adquiridas del NCI en viales en pase diez de cultivo y se subcultivaron sucesivamente hasta el pase cuarenta, momento en el cual se descartaban para evitar posibles alteraciones en la capacidad de reproducir adecuadamente el modelo ortotópico de GBM utilizado en este trabajo y descrito en el apartado 4.2.3.

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Curva de crecimiento

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

$$Cf = M \times d \times Vc \times Vr \quad \text{eq. 4.1}$$

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

Los datos obtenidos se ajustaron a una curva exponencial con el programa Sigma Plot v8.0.

4.2.2 Ratones C57BL/6

Los animales fueron obtenidos de los laboratorios Charles River (Charles River Laboratories International, L'Arbresle, France). Para los experimentos llevados a cabo a

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

lo largo de esta tesis se emplearon hembras de 18-20 semanas de edad con pesos comprendidos entre los 20-25 gramos. A lo largo de los diferentes estudios, los animales permanecieron alojados en las instalaciones del *Servei d'Estabulari* de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB). Los estudios realizados con dichos animales fueron regulados según los protocolos experimentales previamente aprobados por el comité de ética de la UAB de acuerdo con la legislación local y estatal (DMAH (*Departament de Medi Ambient i Habitatge*) - 4600; CEEAH (*Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana*) – 1176-1178).

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

4.2.3 Modelo ortotópico de GBM murino

Las células de glioma GL261 fueron recolectadas del frasco de cultivo según el procedimiento descrito para el subcultivo en el apartado 4.2.1 Una pequeña alícuota se reservó para efectuar el recuento, también según lo descrito anteriormente. La suspensión de células se trasladó a un tubo Falcon de 15 ml (DeltaLab S.L.U., Barcelona, España) y se centrifugó 1,5 minutos a 1400 g (Centrífuga Selecta S-240, ALCO, Terrassa, España), para retirar el sobrenadante y reservar el sedimento de células. Posteriormente se añadió el volumen adecuado de medio RPMI al sedimento para tener una concentración de 10^5 células en 4 μ l según la ecuación:

$$V_f = \frac{(V_i \times C_f)}{10^5} \quad \text{eq. 4.2}$$

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

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

Quince minutos antes de comenzar el proceso de inyección estereotáctica, se administró analgesia a los animales (hembras C57BL/6) por inyección subcutánea: Meloxicam (Boehringer Ingelheim España, S.A.), (1,0 mg/Kg). A continuación los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (Parke-Davis S.L., Madrid) y xilazina (Carlier, Barcelona España) (80 y 10 mg/Kg, respectivamente) administrada intraperitonealmente, e inmovilizados en un sistema estereotáctico (Kopf Instruments, Tujunga/CA, USA) como se muestra en la figura 4.1. Después de exponer el cráneo se realizó una perforación de 1 mm de diámetro con un microtaladro (Fine Science Tools, Heidelberg, Alemania) 0,1 mm posterior a Bregma (en sentido caudal) y 2,32 mm lateral a la línea media (derecha), en la zona correspondiente al estriado. A continuación, se inyectaron 4 μ l de la suspensión celular (10^5 células) mediante una jeringa Hamilton de 26G (Sigma-Aldrich, Madrid, España), utilizando un inyector digital (Harvard Apparatus, Holliston/MA, USA) a una velocidad de 2 μ l por minuto, a una profundidad de 3,35 mm desde la superficie del cráneo. Una vez finalizada la inyección, se esperaron 2 minutos antes de extraer suavemente la Hamilton, para evitar que las células fuesen arrastradas al exterior. Los animales fueron suturados con seda del calibre 5/0 (Braun, Barcelona, España) y permanecieron a una temperatura aproximada de unos 25°C bajo una lámpara de infrarrojos durante su recuperación de la anestesia. Una vez despiertos, se les administró Buprenorfina (Buprex, Schering-Plough, Madrid, España) (0,05 mg/kg) por vía subcutánea y durante 2 días tras la operación se les administró Meloxicam cada 24h (1,0 mg/Kg) como analgésicos.

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

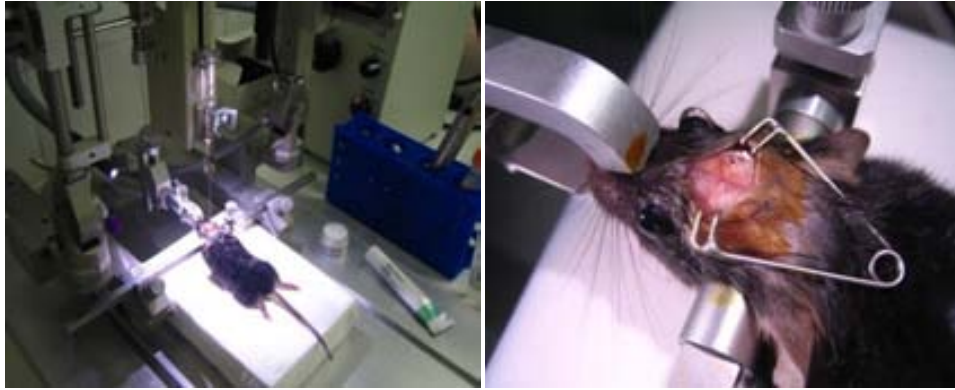


Figura 4.1: A la izquierda se muestra una imagen general del sistema de inyección estereotáctico utilizado para inocular células GL261 en el estriado de los ratones C57BL/6. A la derecha puede verse una ampliación del cráneo de un animal durante el proceso de implantación.

4.2.4 Puesta a punto del modelo: Generación de tumores cerebrales a partir de gliosferas obtenidas a partir de tumores GL261

4.2.4.1 Gliosferas producidas a partir de tumores GL261 en fresco

Generación y seguimiento del tumor GL261

Una vez generados los tumores con células GL261, tal y como se describió en el apartado 4.2.3, se realizó un seguimiento de la progresión tumoral mediante exploraciones por IRM. Se llevaron a cabo secuencias de alta resolución ponderadas en T₂ en los planos axial y coronal, calculando el volumen mediante secuencias para volumetría hasta que el tumor presentó un tamaño aproximado de $140 \pm 20 \text{ mm}^3$ (alrededor de 18 ± 2 días de evolución). El cálculo del volumen tumoral se realizó como se explica en el apartado 4.2.5. Cuando el tumor alcanzó el tamaño prescrito los animales fueron llevados al *Grup de cèl.lules mare i medicina regenerativa de la*

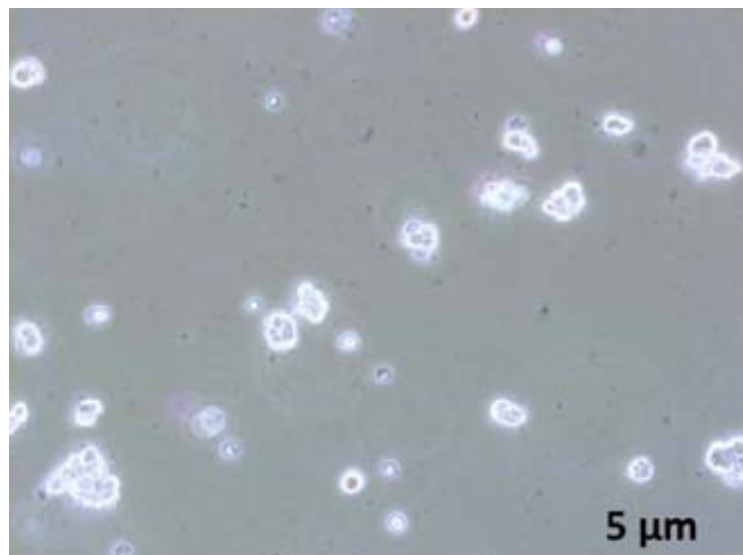
CAPITULO 2:

Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Universidad de Barcelona ya que la disgregación y posterior generación de gliosferas se llevaron en colaboración con este grupo, dirigido por el Dr. Josep M^a Canals.

4.2.4.1.1 Disgregación del tumor y generación de gliosferas

Un total de 6 animales portadores de tumor GL261, con las características de volumen descritas en el apartado anterior, fueron transportados al laboratorio del Dr. Josep M^a Canals para su sacrificio y posterior extracción del tumor. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Una vez sacrificados, se procedió a la extracción del tumor limpiándolo de tejido circundante no tumoral. A partir de estas muestras se llevó a cabo la disgregación del tejido y generación de gliosferas mediante el protocolo, "Generación de gliosferas a partir de tejido" (Anexo 4) realizado en colaboración con Cristina Herranz. En la figura 4.2 podemos ver una imagen de las gliosferas en estadio "P0" primera generación de gliosferas a partir del tumor del animal S912.



CAPITULO 2:

Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Figura 4.2: Imagen de microscopia óptica de gliosferas generadas a partir de tumores GL261 en fase 1. Observada en un microscopio confocal a 100x.

Una vez generadas, éstas gliosferas fueron traspasadas a placas tipo P24 y transportadas al GABRMN. Cada pocillo de la placa P24 contenía aproximadamente 10^5 células en forma de gliosferas, que se usaron para la implantación en ratones C57BL/6 tal como se describe en el apartado 4.2.4.1.3.

4.2.4.1.2 Gliosferas producidas a partir de tumores GL261 congelados.

Cuando los tumores GL261 creciendo en ratones C57BL/6 alcanzaron el tamaño de $140 \pm 20 \text{ mm}^3$, los animales fueron sacrificados por el método de dislocación cervical y se extrajo el tumor, intentando minimizar la cantidad de tejido normal circundante adherido. Al final, se obtuvieron entre 2 y 3 piezas de tumor de volumen $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}$ de alrededor de 10mg (cada una) las cuales se mantuvieron en atmósfera de nitrógeno (N_2) gas durante 1h. Después de este tiempo fueron almacenadas en N_2 líquido hasta el momento de su uso. En el momento de su utilización, estas muestras fueron transportadas en un recipiente con N_2 líquido al laboratorio del Dr. Josep M^a Canals. Las muestras se descongelaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, se procedió a la generación de gliosferas tal y como esta descrito en el apartado 4.2.4.1.

4.2.4.1.3 Implantación de gliosferas en animales C57BL/6

CAPITULO 2:

Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Antes de proceder a la implantación, se disgregaron las gliosferas mediante el siguiente procedimiento: se extrajo la totalidad del medio y gliosferas contenido de cada uno de los pocillos de la placa P24 con ayuda de una pipeta automática, reuniéndolos en un tubo de 25 ml. A continuación, se centrifugó el tubo durante 5 minutos a 1000 g y se eliminó el sobrenadante por aspiración con una bomba de vacío. Finalmente, se le agregó al sedimento de las gliosferas 96 μ l de medio RPMI 1640 y se pipeteo 8-10 veces. Una vez finalizado este procedimiento, se procedió a la implantación de los animales C57BL/6 (n=6) tal y como se describe en el apartado 4.2.3. El seguimiento de la formación y crecimiento de estos tumores fue realizado mediante los estudios de RMN, como se recoge en el apartado 4.2.5.

4.2.4.2 Generación de una línea de tumores transplantables a partir de gliosferas generadas a partir de un tumor GEM de bajo grado.

Como siguiente paso en la consecución del objetivo de este capítulo, se procedió a repetir el proceso de generación de gliosferas, esta vez a partir de un tumor detectado en un animal GEM de la colonia "S" (s100 β -v-erbB / inK4a-Arf (+/-)).

El animal escogido fue el S912, hembra, de 17 semanas en el momento de la detección de la lesión, presentando el genotipo Tg/ko+/- . Se le realizó un seguimiento mediante exploraciones de IRM/ERM/IERM descritas en el apartado 3.2.2.1. Las características de dicha masa anómala eran compatibles con grado tumoral intermedio.

Cuando la masa tumoral llegó al volumen de 90 mm³, se optó por transportar el ratón al laboratorio de Josep M^a Canals para su sacrificio y posterior extracción del tumor,

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

como se describe en 4.2.4.1.1. Aunque era más pequeño que los tumores GL261 usados para la puesta a punto del método se intentaba evitar la posible progresión del tumor a grados más altos y por lo tanto se optó por utilizarlo en este preciso punto. Un fragmento del tumor fue congelado y posteriormente se realizó el análisis histopatológico descrito en la sección 4.2.6, mientras lo restante fue utilizado para la generación de gliosferas.

Un total de 30 animales fueron implantados con las gliosferas generadas durante 3 días consecutivos, n=10 animales cada día. El seguimiento de la progresión de las masas tumorales, en todos los casos, se llevó a cabo mediante los estudios descritos en el apartado 4.2.5.

4.2.5 Estudios por IRM/ERM/IERM

Para los estudios de RMN se utilizaron las mismas secuencias descritas en el apartado 3.2.2.1. Los puntos temporales para las exploraciones de los animales fueron cada 3 ± 2 días después de la detección inicial de la masa anómala, dependiendo del desarrollo de la masa tumoral. Los animales que no desarrollaban masas tumorales fueron explorados cada 15 días durante un periodo máximo de 12 meses.

Para medir el volumen de los tumores se utilizaron las secuencias de alta resolución T_2 en el plano coronal y secuencias en 3D. Los parámetros de las secuencias en 3D fueron los siguientes: Secuencia RARE, *echo train length*, 16; FOV, 20 x 20 x 15 mm; MTX, 128 x 128 x 64 (156 x 156 x 234 $\mu\text{m}/\text{pixel}$); NS, 1; ST, 15 mm; TR/TE, 1000/42,5 ms; NA, 1; TAT, 8 min y 32 s.

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

En el caso de las imágenes T_{2w} -HR, la fórmula empleada para aproximar el volumen tumoral fue (ver también figura 4.3):

$$VT(mm^3) = [[AS_1 \times GS] + [[AS_2 + (\dots) + AS_{10}] \times (GS + DE)]] \times 0,075^2 \quad \text{eq. 4.3}$$

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

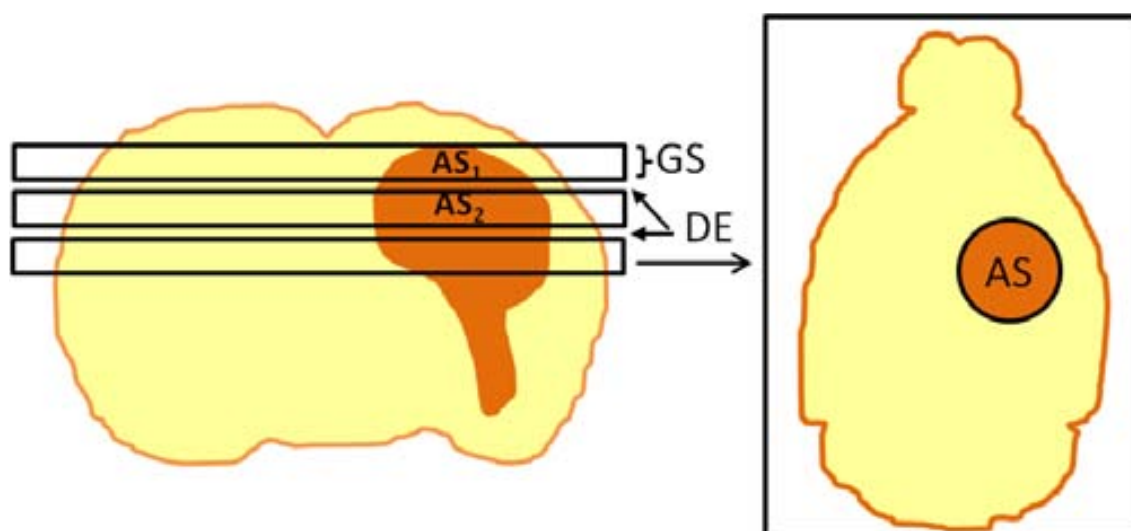


Figura 4.3: Esquema del cálculo del volumen tumoral en las imágenes T_{2w} -HR. A la izquierda se muestra un corte axial de cerebro de ratón con una masa tumoral en el hemisferio derecho. Las tres barras horizontales representan tres secciones adquiridas por IRM, siendo el grosor de cada una GS . La distancia entre secciones queda señalada como DE . A la derecha se muestra el esquema de una imagen con orientación coronal, adquirida a partir de una de las secciones representadas a la izquierda en el corte axial. AS es el área tumoral medida en píxeles en cada imagen. Como ejemplo se muestran dos AS diferentes a la izquierda; AS_1 y AS_2 . Puede observarse que para medir el volumen tumoral total hay que tener en cuenta el DE en todos los AS excepto en AS_1 (ver eq. 4.3).

El área de cada corte del tumor (AS) se midió mediante un sistema automático de generación de regiones de interés (ROIs) accesible desde el programa Paravisión 5.0

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

(Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania). Dicho programa calcula el área de las ROIs en pixels. En el caso de las secuencias T_{2w} -HR, el volumen de tumor que no quedó registrado en imagen por estar en el espacio entre secciones se estimó sumando este espacio (DE) al grosor de la sección correspondiente (Eq. 4.3).

En las secuencias 3D este parámetro no se utilizó porque todo el volumen tumoral quedó registrado en imagen. Las secuencias 3D aparecen al visualizarlas como una sucesión de imágenes coronales contiguas cuyo grosor es el equivalente al grosor de los pixels que las componen. Entre dichas imágenes se seleccionaron aquellas en las que podía detectarse presencia de masa tumoral (regiones de anomalía en T_2) y se trazaron ROIs de la misma manera que en las imágenes T_{2w} -HR rodeando las lesiones (figura 4.3). Para calcular el volumen tumoral se multiplicó la suma de las áreas de todas las ROIs por el grosor total (número de imágenes con tumor por el grosor de un pixel (0,234mm):

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

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

4.2.6 Estudios histopatológicos

Una vez finalizados los estudios de IRM y ERM, los animales fueron sacrificados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital (200mg/Kg, 60mg/ml; Dolethal, Vetoquinol S.A. Barcelona, España). Se extrajeron los encéfalos y se fijaron en una solución de formaldehído al 4%.

Un total de 11 muestras de tumores producidos a partir de las gliosferas generadas por el tumor GEM S912 fueron enviadas para su análisis histopatológico con el fin de

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

tener un diagnóstico, además de un fragmento de la muestra original del animal S912 a partir de la cual se generaron estos tumores.

Una vez fijados, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes seriados (5 μ m). Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina, para diagnosticar el tipo y grado de los tumores. Este trabajo fue llevado a cabo en colaboración con el Dr. Martí Pumarola, CBATEG.

Se realizaron además tinciones inmunohistoquímicas para confirmar la estirpe oligodendroglial y de GFAP del tumor original y de los tumores de nueva generación obtenidos a partir de gliosferas.

Para la identificación genotípica, aunque eran tejidos distintos, se usaron los mismos métodos utilizados que en la sección 3.2.1.

4.3. RESULTADOS

4.3.1 Cultivos celulares: curva de crecimiento de las células GL261

Cultivos celulares: Curva de crecimiento de las células GL261:

La curva de crecimiento de las células GL261 en condiciones estándar de cultivo se muestra en la figura 4.4. Las células alcanzaron la fase exponencial de crecimiento a las 120 horas (día 5) de cultivo. La fase de confluencia (aproximadamente el 80% de la superficie del frasco cubierta por células) se situaría entre los días siete y ocho (168-192 horas) según el ajuste sigmoideo de la curva. A día ocho, sin embargo, se observaban células que empezaban a formar cúmulos de tipo gliosfera que se desprendían al añadir PBS en el proceso de subcultivo (ver materiales y métodos punto 4.2.1), por lo que el día

CAPITULO 2:

Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

de subcultivo se estableció en el día siete. Entre los días nueve y once, en caso de no llevar a cabo el subcultivo, el cultivo alcanzaba la fase de post-confluencia.

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

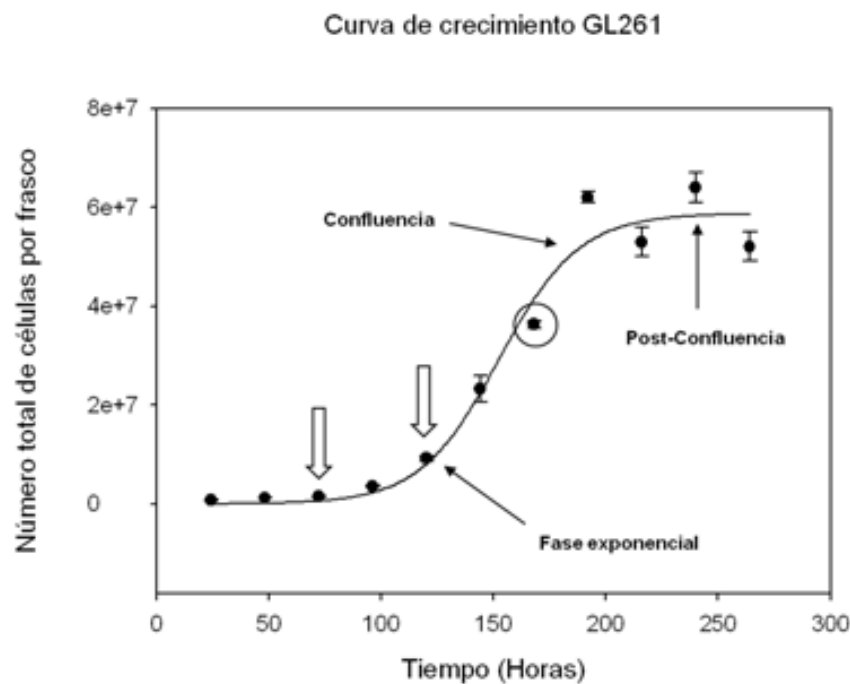


Figura 4.4: Curva de crecimiento de las células GL261. Los puntos del gráfico representan la media del número de células totales por frasco en cada punto temporal ($n=3$ frascos y $n=3$ contajes por frasco) y las barras verticales muestran la desviación estándar para cada punto (en algunos casos no es visible por ser más pequeña que el símbolo). Las flechas verticales vacías indican los cambios de medio en el protocolo de cultivo estándar (ver también 4.2.1) y el círculo rodea el día de subcultivo establecido.

4.3.2 Generación de tumores a partir de células GL261

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Las células GL261 fueron inoculadas en el estriado de 6 ratones C57BL/6 (ver materiales y métodos, 4.2.3). Este grupo fue utilizado para la puesta a punto de la primera generación de gliosferas en fresco. Además se utilizaron para comprobar que se ajustaban a la curva de crecimiento estándar de los tumores GL261. La evolución de los tumores se controló por IRM desde el sexto día post-implantación hasta la fecha de sacrificio (ejemplo en la figura 4.5). Se calculó el volumen tumoral utilizando imágenes ponderadas en T_2 de alta resolución (como lo descrito en 4.2.5) y a partir de estos datos se elaboró la curva de crecimiento de volumen para los tumores GL261 con un total de seis animales (figura 4.6). Los animales se sacrificaron después de la última exploración.

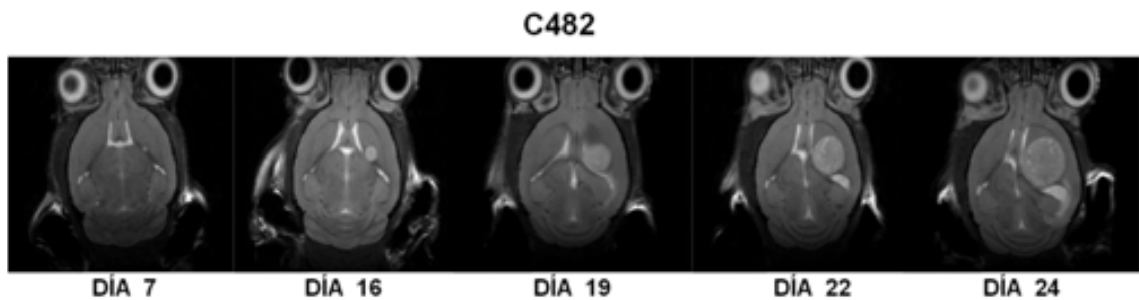


Figura 4.5: IRM ponderada en T_2 (T_{2w} –HR) en orientación axial del cerebro del animal C482, adquirida a 7T a distintos días post-implantación (indicados bajo cada imagen). Seguimiento de la progresión tumoral.

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

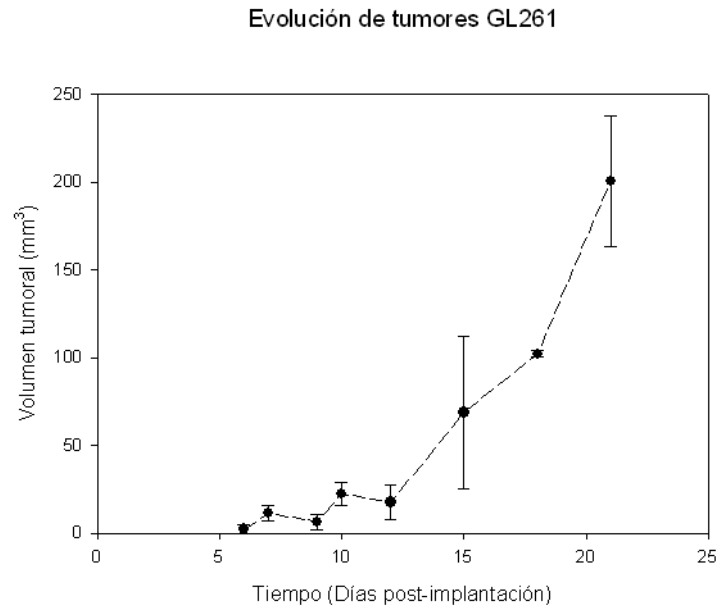


Figura 4.6: Curva de evolución del crecimiento de tumores GL261 en 6 animales. Los puntos del gráfico representan la media del volumen de los tumores en cada punto temporal de seguimiento (cada tres días a partir del día 6 post-implantación), y las barras verticales muestran la desviación estándar. El seguimiento terminó con el sacrificio de los animales por razones éticas y la última medida que pudo realizarse fue el día 24 post-implantación.

4.3.3 Generación de tumores a partir de gliosferas obtenidas de tumores GL261

Gliosferas generadas a partir de la disgregación de tumores en fresco:

Los tumores generados a partir de las gliosferas obtenidas de tumores GL261 en fresco presentaron un desarrollo similar a los tumores de origen (ver ejemplos de seguimiento en la figura 4.7, a comparar con los de la figura 4.5) aunque la mayoría de días presentaron crecimientos volumétricos algo menores con diferencias estadísticamente significativas. $p=0,005$. Con respecto a la curva de crecimiento estándar para GL261, sin embargo los animales tuvieron una supervivencia muy

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

parecida a los animales implantados con células GL261 15 días vs 20 días (figura 4.8B).

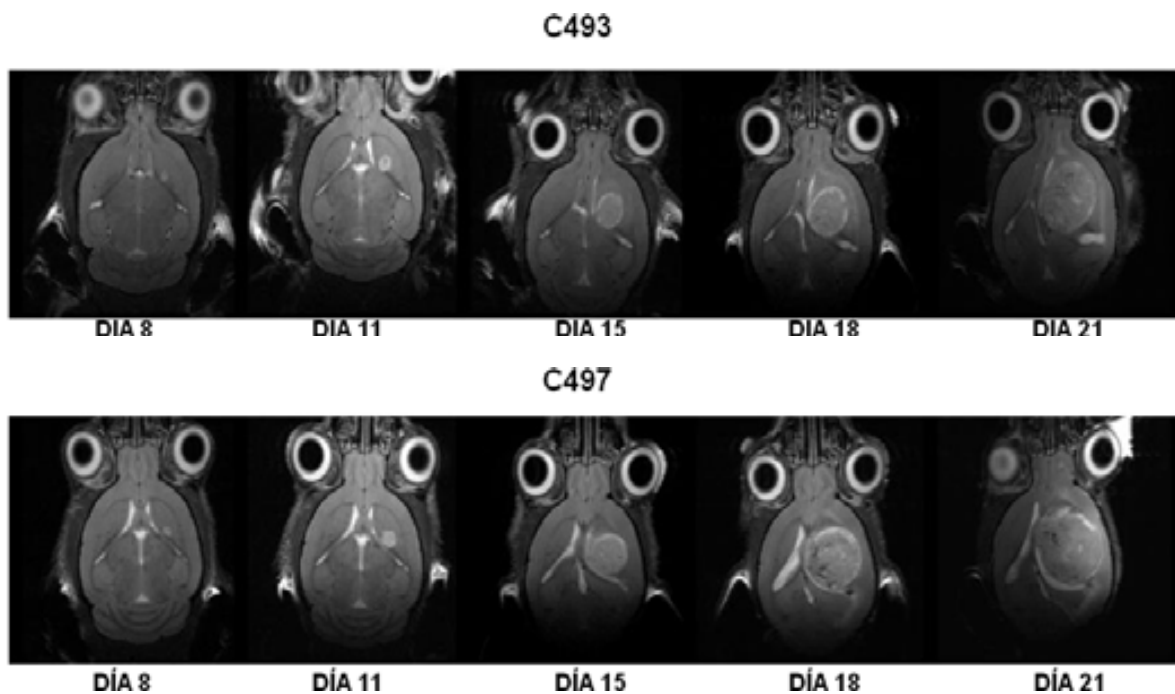


Figura 4.7: IRM ponderada en T_2 de alta resolución en orientación axial del cerebro de los animales C453 y C497, adquirida a 7T a distintos días post-implantación (indicados bajo cada imagen). Seguimiento de la progresión tumoral.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

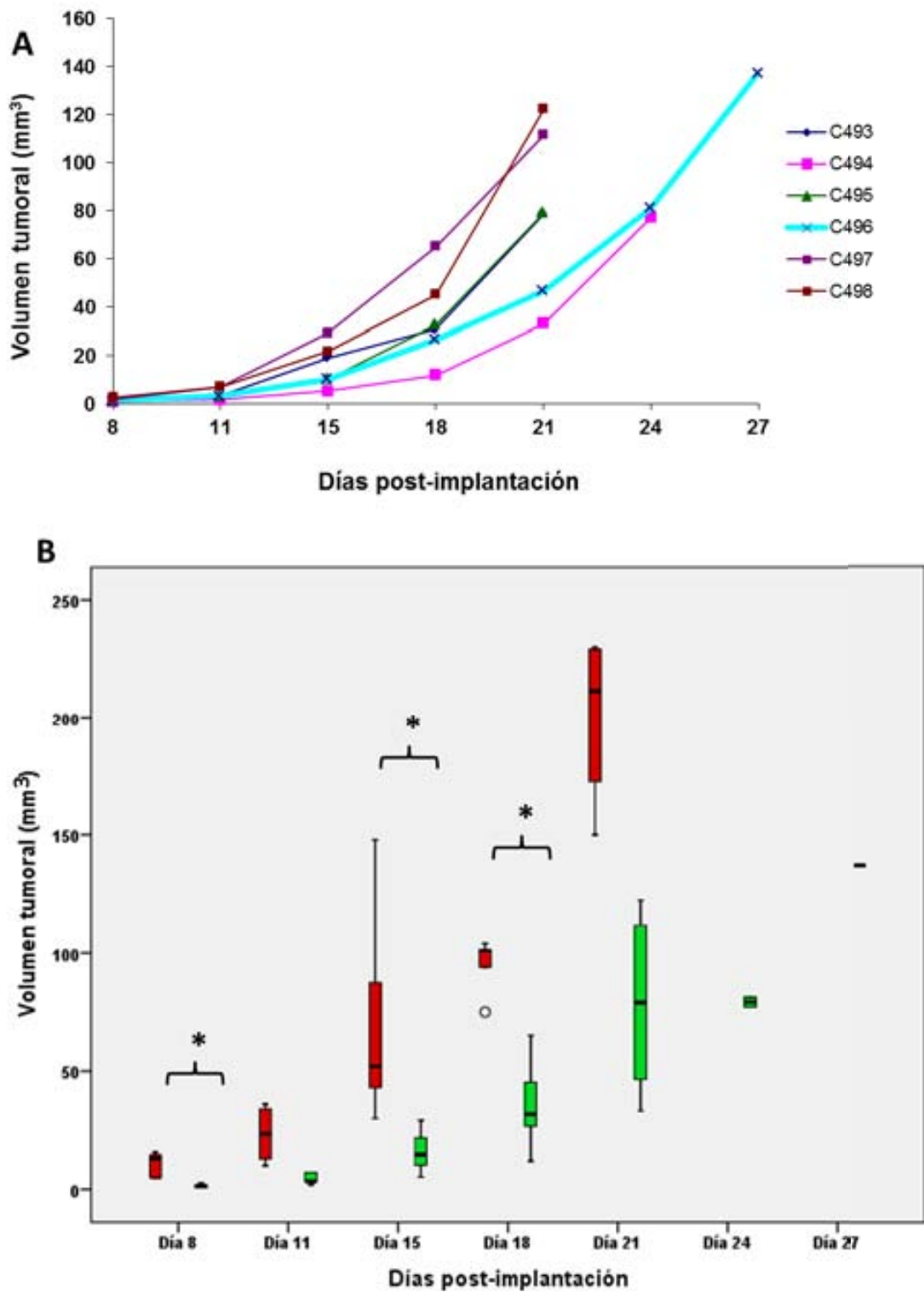


Figura 4.8: A) Seguimiento de la progresión en tumores generados a partir de gliosferas de tumores GL261 disgregadas en fresco a diferentes días post-implantación (volúmenes

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

expresados en mm^3). B) *Boxplot* de la comparación de la evolución del crecimiento de tumores generados a partir de células GL261 (box rojo) y gliosferas de tumores GL261 en fresco (box verde). La línea horizontal en medio de las cajas representa la media. Las diferencias significativas ($p < 0,005$) están marcadas con un asterisco. El símbolo o representa los outliers. Se comparan los volúmenes para cada punto temporal de las dos curvas de progresión.

4.3.3.1 Generación de tumores a partir de gliosferas de tumores congelados GL261

En los 7 animales implantados con gliosferas obtenidas de los tumores GL261 congelados, se observó un patrón de crecimiento ligeramente distinto a los GL261 considerados en las secciones anteriores. El primer día de detección de masa anómala fue el día 10 post-implantación, en comparación con el día 8 del grupo de disgregación en fresco, aunque luego tuvieron una evolución bastante similar (ver ejemplos en la figura 4.9).

La figura 4.10 muestra las curvas volumétricas de todos los animales estudiados, y los *boxplots* en la figura 4.10B muestran la comparación relativa de los volúmenes tumorales obtenidos en los tumores GL261 estándar y en los obtenidos con la generación de gliosferas, con o sin congelación previa de los tumores GL261.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

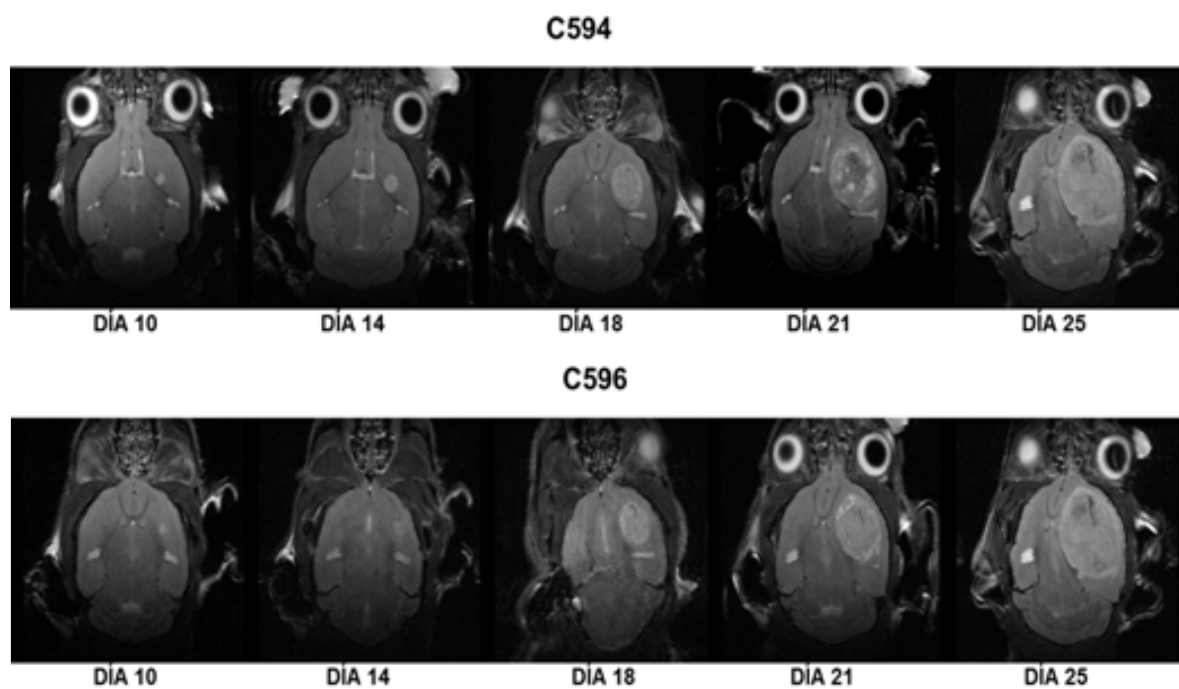
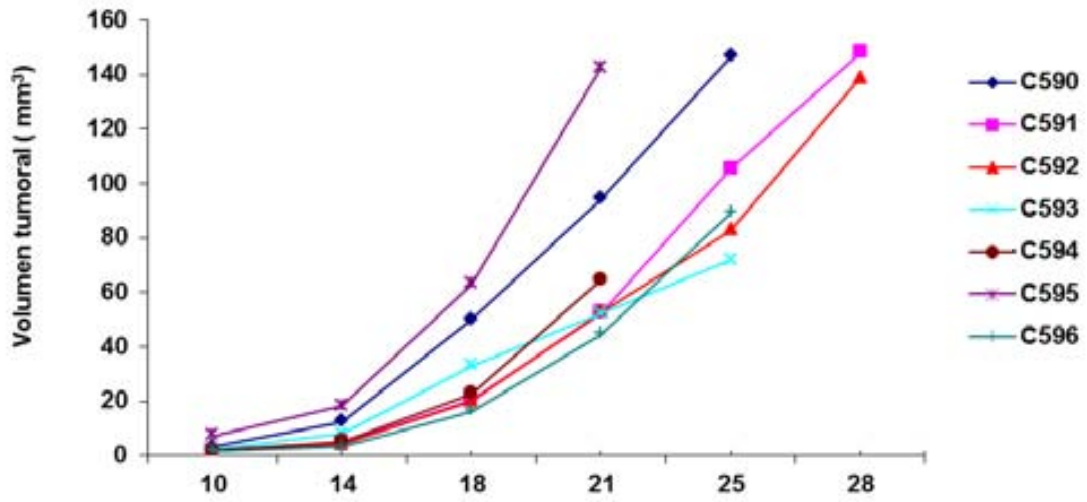


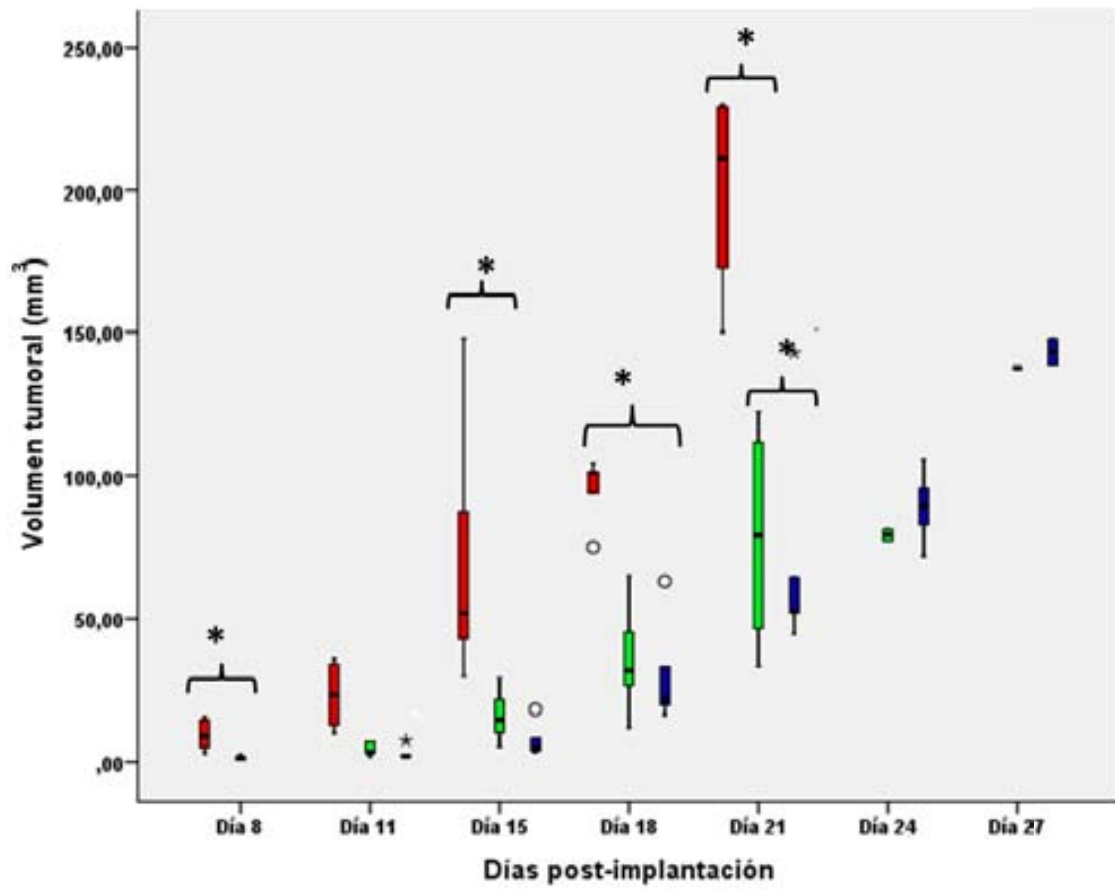
Figura 4.9: IRM ponderada en T_2 de alta resolución en orientación axial del cerebro de los animales C594 y C596, adquirida a 7T a distintos días post-implantación (indicados bajo cada imagen). Seguimiento de la progresión tumoral.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

A



B



CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Figura 4.10: A) Seguimiento de la progresión en tumores generados a partir de gliosferas de tumores GL261 congeladas, a diferentes días post-implantación (volúmenes expresados en mm^3). B) *Bloxplot* de la comparación de la evolución del crecimiento de tumores generados a partir de células GL261 (box rojo), gliosferas de tumores GL261 en fresco (box verdes) y gliosferas de tumores GL261 congelados (box azul). Las diferencias significativas ($p < 0,005$) están marcadas con un asterisco.

4.3.3.2 Producción de tumores transplantables a partir de gliosferas generadas con el tumor GEM S912

4.3.3.2.1. Detección de masa tumoral anómala en el animal S912

Durante el protocolo piloto descrito en el capítulo 1 (apartado 3.2.2), se detectó una masa tumoral anómala en el animal S912 perteneciente a la colonia S y con un genotipo $S100\beta$ -v-erbB /inK4a-Arf (+/-). Dicha masa y su seguimiento por imágenes ponderadas en T_2 se pueden apreciar en la figura 4.11.

Se trataba de una masa circunscrita, con características de hiperintensidad en T_2 y localizada en el hipotálamo.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

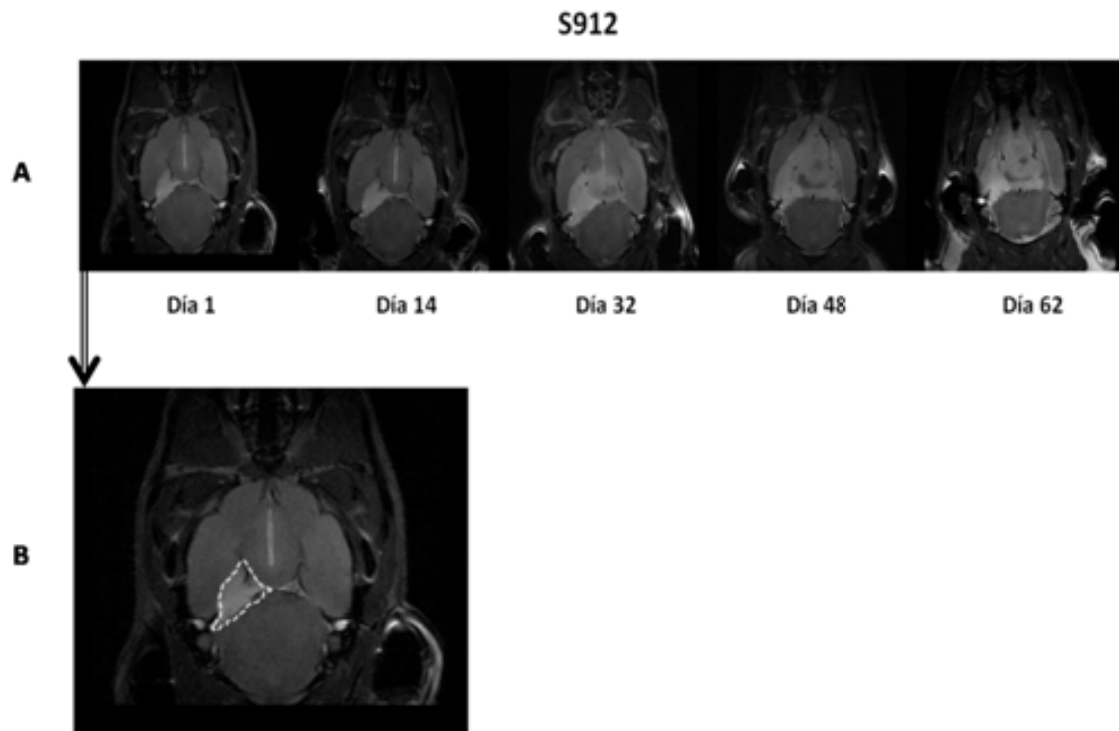


Figura 4.11: A) Seguimiento por IRM de la progresión tumoral del animal S912 a diferentes días (incluidos bajo la imagen) desde la detección de la masa hasta el sacrificio del animal, 62 días después de detectar la masa tumoral. B) Imagen ponderada en T₂ de alta resolución en orientación axial del animal S912 en el momento de la detección inicial (día 1) de la masa tumoral anómala. La masa anómala con característica hiperintensa estaba localizada en el hipotálamo y está delimitada en la figura por una línea discontinua blanca.

Paralelamente a las exploraciones T₂ se realizó un seguimiento de la progresión volumétrica de la masa tumoral que, a diferencia de los tumores generados tanto con células GL261 como con gliosferas, presentó un crecimiento mucho más lento (figura 4.12).

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

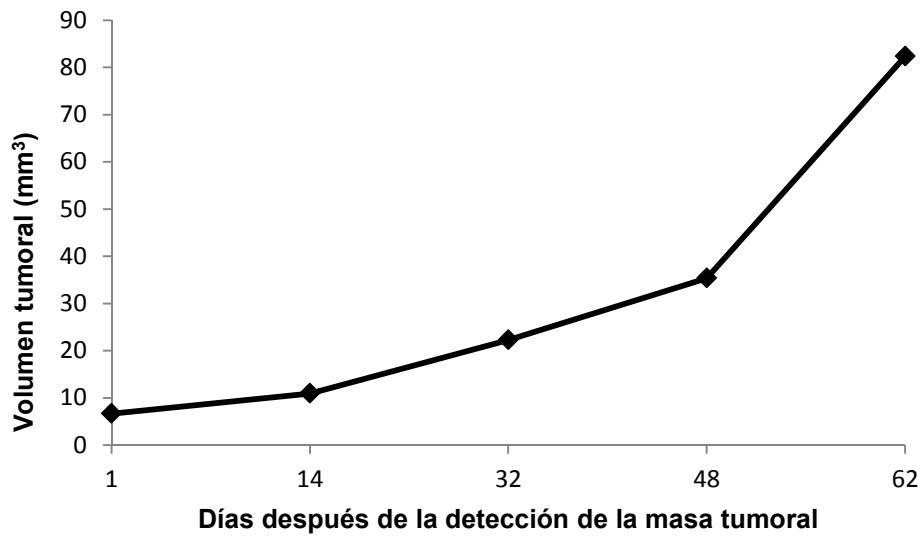
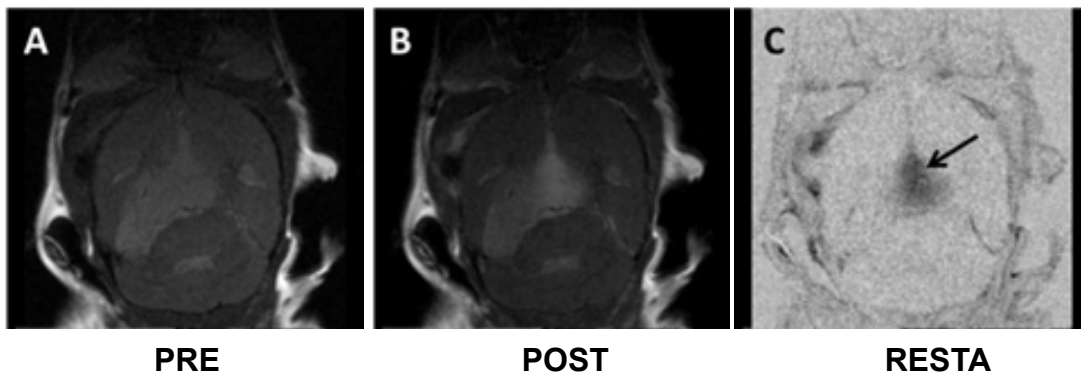


Figura 4.12: Seguimiento de la progresión volumétrica tumoral del animal S912 desde el día de la detección de la masa tumoral hasta el día de sacrificio del animal, alrededor de 62 días de evolución (volúmenes expresados en mm³).

La captación de contraste observada en las imágenes ponderadas en T₁ con administración de contraste indicaba ruptura parcial de la BHE (no homogénea en toda la masa). El hecho de que la captación de contraste se limite a una sola parte del tumor indica un comportamiento heterogéneo en éste, presentado posiblemente áreas de transición entre grado alto y bajo-intermedio (figura 4.13).



CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Figura 4.13: IRM ponderada en T_1 , (pre- y post- administración de contraste, así como la sustracción de dichas imágenes “resta”) en orientación axial del cerebro del animal S912, adquirida a 7T y 32 días después de la detección del tumor. La flecha negra señala la zona de captación de contraste. Comparar con la masa anómala total visible en imágenes ponderadas en T_2 en la figura 4.11.

Con relación a los análisis de IERM-PM, los mapas de color generados a partir del procesamiento de dichos estudios con DMSO (figura 4.14C) evidenciaron la presencia de un “*hot spot*” de acumulación tras 88 minutos desde su administración. Este *hot spot* estaba localizado fuera de la zona aparente de anomalía T_2 para la masa tumoral el mismo día de progresión (figura 4.14A). Observando la figura 4.11 de la evolución tumoral a lo largo de los días, se puede comprobar que, en efecto, la masa tumoral se expandió en la dirección inicialmente señalada por el *hot spot*. Además la (figura 4.13), del estudio de integridad de la BHE 32 días después de la detección de la masa tumoral, apunta a una superposición del *hot spot* observado en el estudio IERM-PM con DMSO y la zona donde se empezó a ver ruptura de la BHE.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

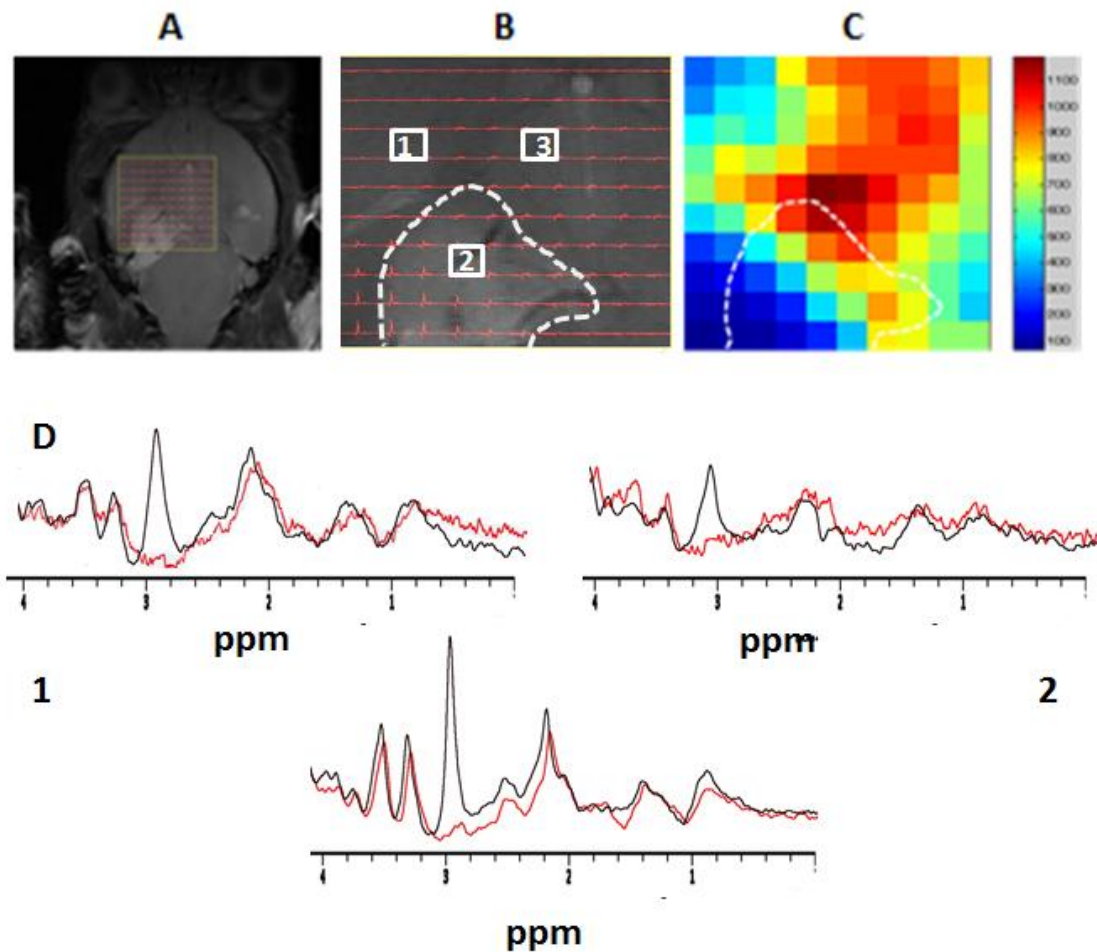


Figura 4.14: A) VOI de adquisición (cuadrado amarillo) para las secuencias IERM (12ms TE) superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T_{2w} HR) en el animal S912, 30 días después de la detección del tumor B) VOI a mayor aumento, la línea punteada blanca marca el límite de la masa anómala y los cuadros 1, 2 y 3 corresponden a los espectros SV extraídos de las regiones de la matriz de IERM y que se exponen en D. C) Mapa en escala de color codificando la diferencia [ver Delgado *et al* 2013] relativa en relación al patrón pre-perturbación de la señal de DMSO detectada en el VOI 88 minutos tras la administración. D) Espectros de las regiones marcadas como 1 (parénquima peritumoral/normal), 2 (tejido tumoral) y 3 (parénquima peritumoral) de la matriz expuesta en B, antes (espectro rojo) y 88 minutos después de la administración de DMSO (espectro en negro). Debido a inhomogeneidades intrínsecas del tejido, los espectros “2” presentan una calidad muy inferior respecto a los demás.

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Los estudios de IERM-PM con glucosa, se realizaron con el fin de conocer el comportamiento de las diferentes zonas del tumor y a efectos de comparación con espectros similares realizados a tumores de bajo y alto grado en nuestro grupo. Los mapas de color generados a partir del procesamiento de los espectros IERM-PM con glucosa (figura 4.15C) evidencian tan solo una discreta acumulación de glucosa en la región superior del tumor de manera parecida pero más reducida, a lo que se apreciaba en otros tumores investigados en trabajos previos del grupo [28]. Esta acumulación de glucosa se comprobó ser básicamente extracelular en estudios previos de nuestro grupo [131]. Se puede especular que la hipotermia disminuye la actividad de las proteínas y enzimas responsables de los procesos relativos al transporte de glucosa, su fosforilación y su consumo por la vía glucolítica, causando por este motivo el acumulo de glucosa fuera de las células tumorales. Un trozo de tumor fue llevado para análisis histopatológico y el diagnóstico fue oligastrocitoma anaplásico (grado III).

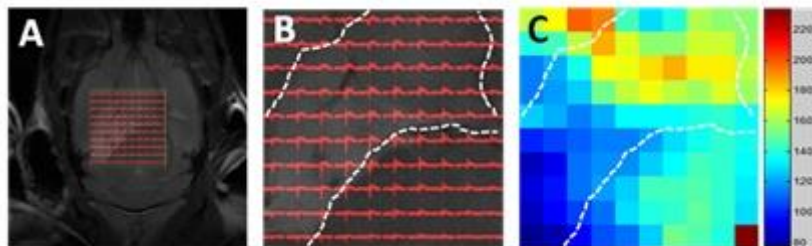


Figura 4.15: A) VOI de adquisición para la secuencia IERM (12ms TE) superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T_{2W} HR) en el animal S912, 32 días después de la detección de la masa anómala. B) VOI a mayor aumento, la línea punteada blanca marca el límite del tumor según la zona de anomalía T_2 . C). Mapa en escala de color de la intensidad de D-Glucosa a 3,4 ppm con TEC (12ms) tras 88 min de la administración de ésta.

CAPITULO 2:

Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

4.3.3.2.2 Tumores generados a partir de gliosferas obtenidas con el tumor GEM

S912

La exploración rutinaria de los 30 animales implantados con gliosferas dejó en evidencia la heterogeneidad del grupo en relación a la latencia del desarrollo tumoral. Ello nos llevó a plantear la división de este grupo en 3 subgrupos como se recoge en la tabla 4.1. Esta subdivisión se hizo teniendo en cuenta el momento de detección inicial por IRM de masa anómala de volumen igual o superior a 5 mm³. Así cuando ello se produjo día 10 se consideró un “crecimiento normal” mientras que cuando ello se dio a día 20 se consideró una “latencia larga”.

Grupo	Numero de animales
1. Crecimiento normal	9
2. Latencia larga	7
3. Sin tumor	14

Tabla 4.1: Número de animales asignados a cada subgrupo de crecimiento, en el grupo de animales implantados con gliosferas obtenidas del tumor GEM S912.

Grupo 1: “Crecimiento normal”

De los 30 animales implantados solo 9 animales presentaban una masa detectable por IRM ponderada en T₂ en la primera exploración a día 10 p.i (coincidentalmente todos los animales pertenecían al grupo que se implantó en el segundo día de los 3 de generación del modelo). Esta primera exploración se realizó el día 9 post-implantación, siendo el último día de exploración variable en función de la supervivencia de los animales (figuras 4.16 y 4.17). Las exploraciones se llevaron a cabo cada 3 días. Estos animales fueron clasificados dentro del grupo 1 de “crecimiento normal” (presentan una evolución temporal similar al tumor de origen, siendo la detección de la

CAPITULO 2:

Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

masa anómala inicial 9-10 días después de la inyección estereotáctica). La evolución de la masa tumoral y sus características por IRM se puede observar en la figura 4.16.

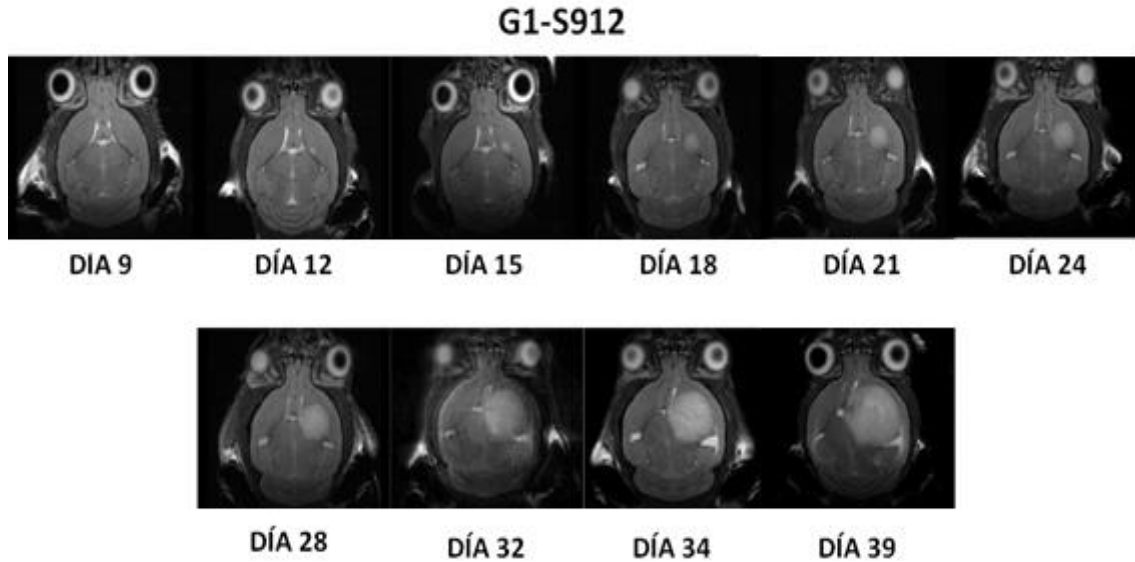


Figura 4.16: Seguimiento de la progresión volumétrica tumoral en el animal G1-S912¹ perteneciente al grupo 1 “Crecimiento normal”. IRM ponderada en T₂ en orientación axial adquirida a 7T a distintos días post-implantación (indicado bajo cada imagen).

¹ Nomenclatura acordada para la primera generación de tumores derivados de gliosferas. G1 identifica el número de referencia del animal de la serie de disgregación y S912, el animal que dio origen a esta serie.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

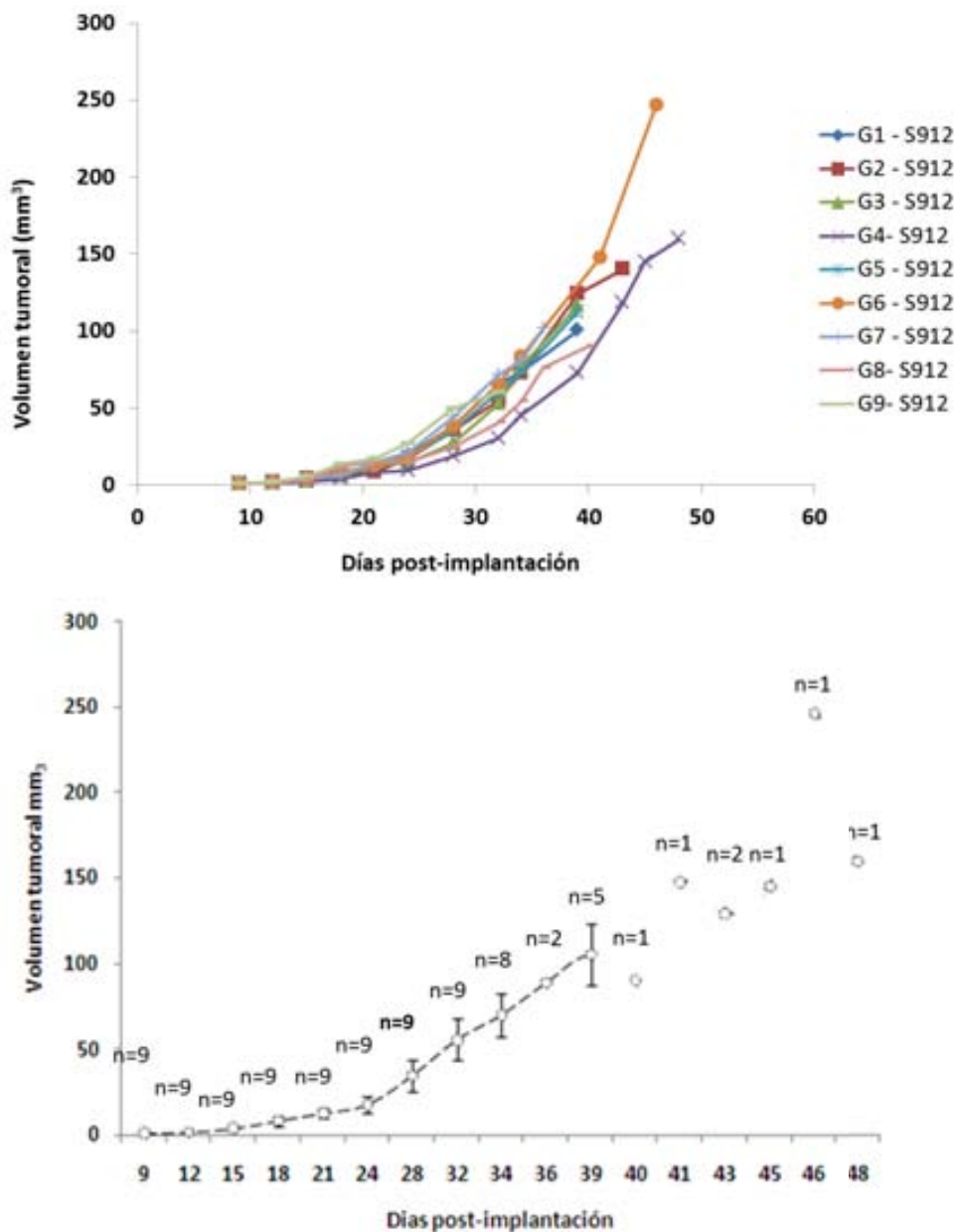


Figura 4.17: A) Seguimiento de la progresión tumoral volumétrica a diferentes días post-implantación de las gliosferas (volúmenes expresados en mm³ para animales del grupo 1, “crecimiento normal”). La última exploración corresponde al día de sacrificio del animal. B) Curva de evolución conjunta del crecimiento de tumores generados a partir de gliosferas obtenidas a partir del tumor GEM S912 (grupo 1), en 9 animales. Los puntos del gráfico representan la media del volumen de los tumores en cada punto temporal del seguimiento, y las barras verticales muestran la desviación estándar de dichos animales. El seguimiento terminó con el sacrificio de los animales según protocolo detallado en el anexo 2. Algunos

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

puntos temporales no presentan barras de SD dado que el número de animales explorados era inferior a 3. La n representa el número de animales explorados en cada punto temporal.

Grupo 2 “latencia larga”

Del grupo de animales que se exploraba con regularidad cada 3 días, un segundo subgrupo de 5 animales presentó masa tumoral a partir de los 18 ± 3 días post-implantación. Este grupo de animales presentó un crecimiento distinto al del grupo 1 mencionado anteriormente, presentando un crecimiento pseudo-bimodal, lento al comienzo del desarrollo de la masa tumoral, pero, a partir de cierto punto temporal dicho crecimiento se aceleró. La figura 4.18 presenta un ejemplo de evolución del crecimiento de la masa anómala en el animal G10-S912 a distintos días post-implantación. En la figura 4.19A se muestra el seguimiento del volumen tumoral en los animales del grupo 2, y en la figura 4.19B podemos observar la evolución volumétrica promedio del grupo 2.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

G10-S912

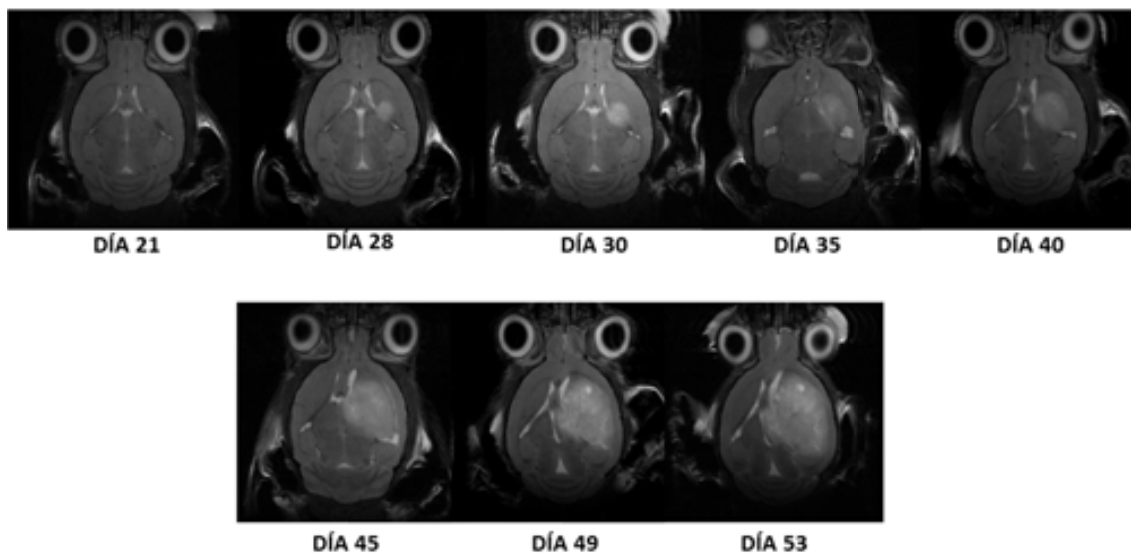


Figura 4.18: Seguimiento de la progresión volumétrica tumoral en el animal G10-S912 perteneciente al grupo 2 (“latencia larga”). IRM ponderada en T_2 en orientación axial adquirida a 7T a distintos días post-implantación (indicados bajo cada imagen).

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

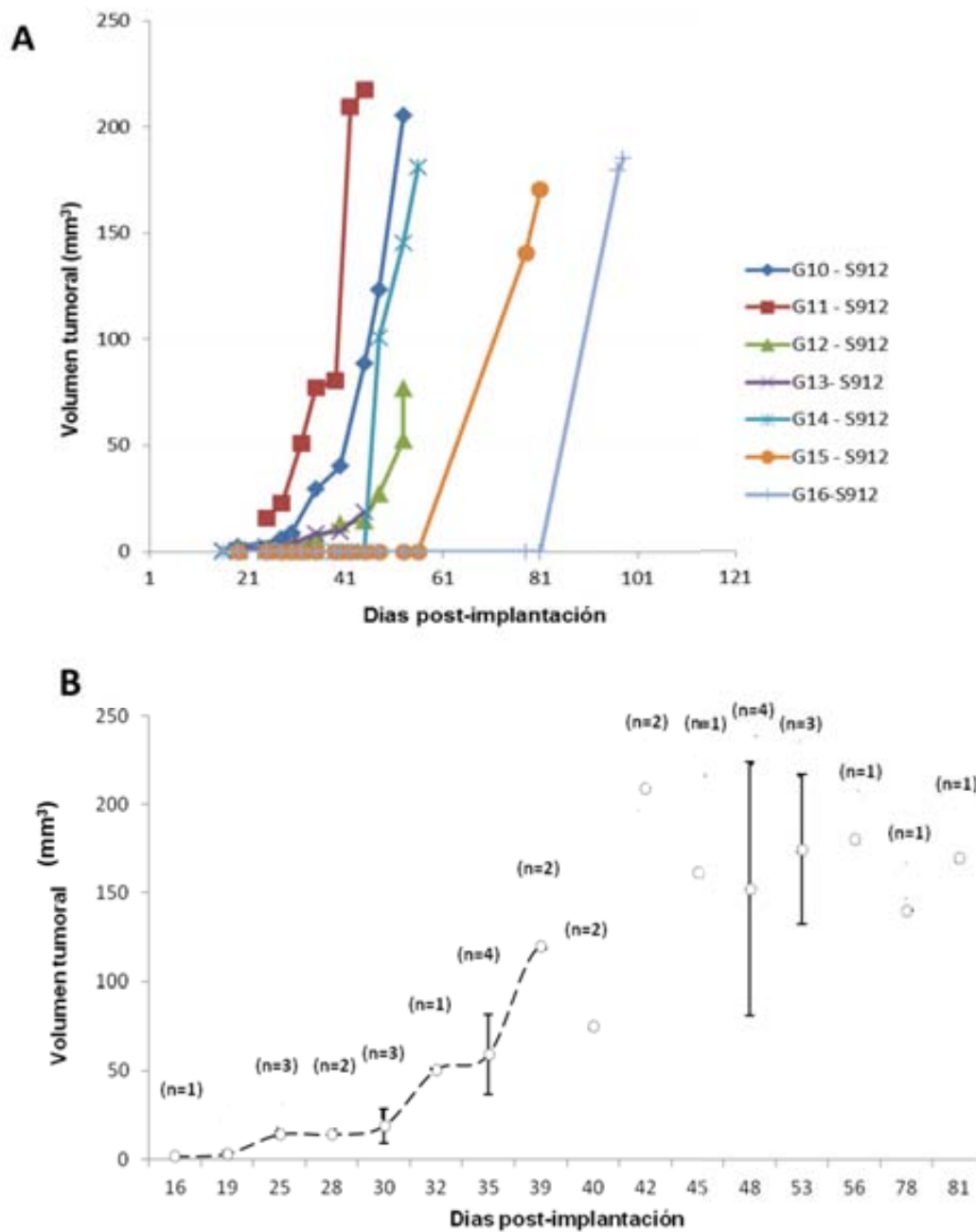


Figura 4.19: A) Seguimiento de la progresión tumoral volumétrica (valores individuales expresados en mm^3) a diferentes días post-implantación, para animales del grupo 2. La última exploración corresponde al día de sacrificio del animal. B) Curva de evolución conjunta del crecimiento de tumores generados a partir de gliosferas obtenidas a partir del tumor GEM S912 (grupo 2), en 7 animales. Los puntos del gráfico representan la media del volumen de los tumores en cada punto temporal del seguimiento, y las barras verticales muestran la desviación estándar de dichos animales. El seguimiento terminó con el sacrificio de los animales. Algunos

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

puntos temporales no presentan barras de SD dado que el número de animales explorados era inferior a 3. Entre paréntesis, se recoge el número de animales explorados en cada punto temporal.

Por otra parte, la figura 4.20 presenta conjuntamente la evolución de los tumores del grupo 1 + grupo 2, teniendo en cuenta como el día de inicio de la cinética el primer día de la detección de la masa anómala por IRM.

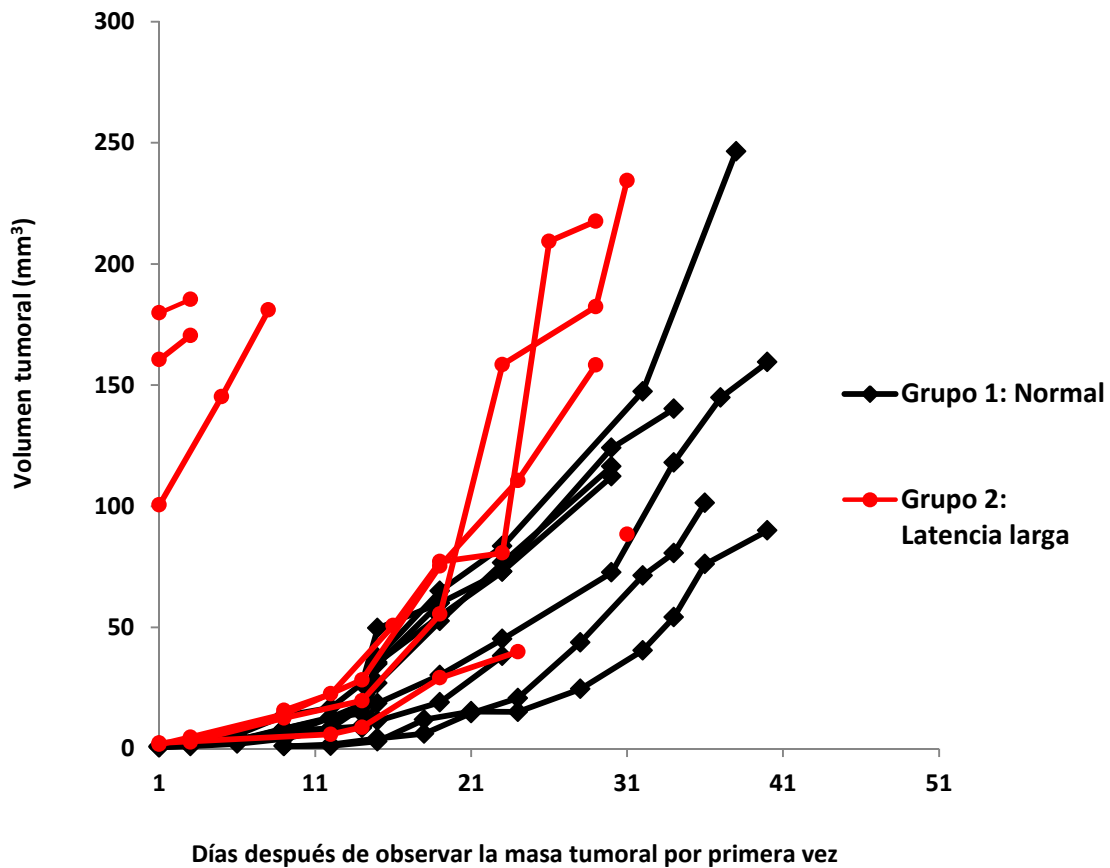


Figura 4.20: Evolución tumoral volumétrica a partir del día en que se observa la masa tumoral por primera vez (volúmenes expresados en mm^3) para animales del grupo 1 (en negro) y el grupo 2 (en rojo) derivados del S912. El día "1" representa la primera vez que se observa una masa tumoral, que ha sido variable en los distintos grupos de animales (ver figuras. 4.17 y 4.19).

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Grupo 3: Animales que no presentan aún masa tumoral:

El grupo restante de 14 animales que no desarrollaron masa tumoral, se exploró cada 15 días durante 6 meses sin detección de ninguna masa anómala en la exploración por IRM. Dichos animales seguirán siendo evaluados por nuestro grupo durante un periodo máximo de 12 meses, período en el que aún podrían aparecer tumores como se describe en [149].

Finalmente se realizó una comparación de la supervivencia promedio de los diferentes estudios realizados en este capítulo. Y encontramos que no había diferencias significativas de supervivencia promedio según las curvas entre los distintos grupos, excepto por el grupo de latencia larga que presento diferencias significativas ($p= 0,02$) con respecto a los otros grupos. Figura 4.21.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

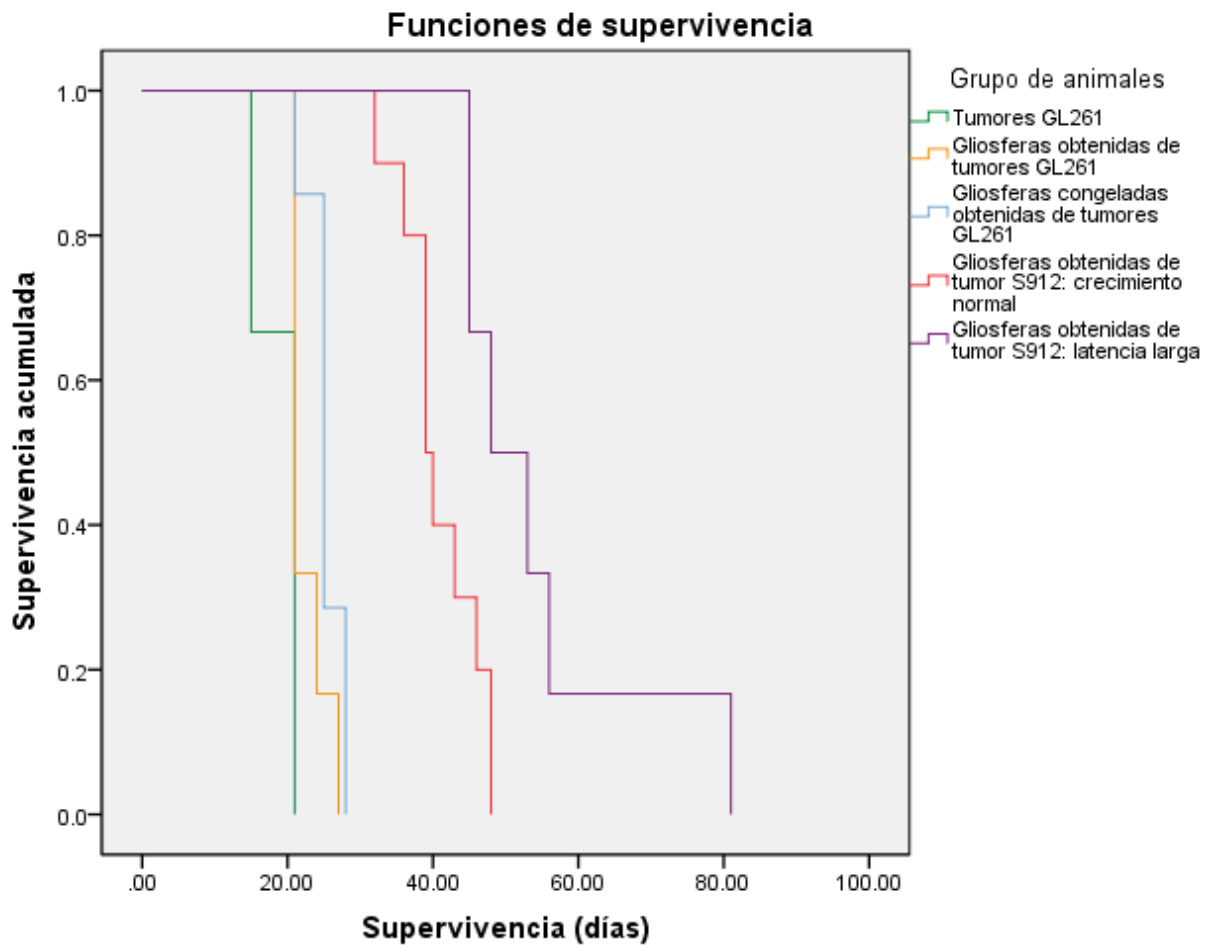


Figura 4.21: Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia promedio para los diferentes estudios realizados en este capítulo.

4.3.4 Estudios de integridad de la BHE (administración de contraste)

Entre los estudios IRM realizados con los grupos 1 y 2 de tumores derivados del GEM S912, se encuentran los estudios de IRM con secuencias T_{1W} -CE tras administración de contraste para comprobar la integridad de la BHE. La captación de contraste en las imágenes ponderadas en T_1 implica ruptura de la BHE y por lo tanto sugiere presencia de grado tumoral más elevado. Un alto porcentaje de animales en este estudio conservó la BHE intacta hasta que el tumor presentó un volumen entre 70 y 80 mm³.

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

No obstante, después de superar este volumen la mayoría de animales presentaron la BHE rota como se puede observar en las figuras 4.22 y 4.23.

Se decidió, entonces, estratificar aleatoriamente las fases de evolución tumoral en 3 estadios:

- A) Estadio temprano con un volumen $< 50\text{mm}^3$
- B) Estadios intermedios cuando el tumor presentara un volumen entre $50\text{-}80\text{mm}^3$
- C) Estadio tardío que presentaba un volumen $> 80\text{mm}^3$

Como se puede observar en la figura 4.22, en los estadios tempranos solo un 23% de los tumores analizados presentan comprometimiento de la BHE. Esto es un cambio relevante en relación con el tumor GEM que le dio origen, dado que éste no presentaba captación de contraste en sus estadios tempranos. Cabe recordar que la disgregación se realizó con el tumor S912 al día 62 en que la BHE ya estaba rota (ver figura 4.13). El crecimiento y avance de la progresión tumoral cambia radicalmente el panorama y en el estadio intermedio, en otros casi 70% de los animales se evidencia captación de contraste en la exploración correspondiente. Si lo sumamos al 23% que inicialmente ya presentaba captación de contraste, son 93% de los animales en total. Solo un 7% de los animales permanece con la BHE intacta en un estadio tardío de desarrollo.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

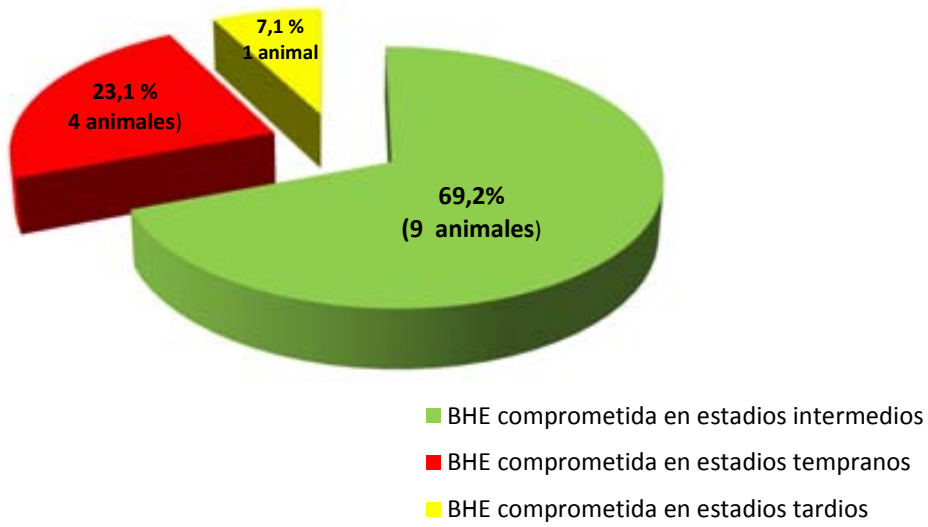
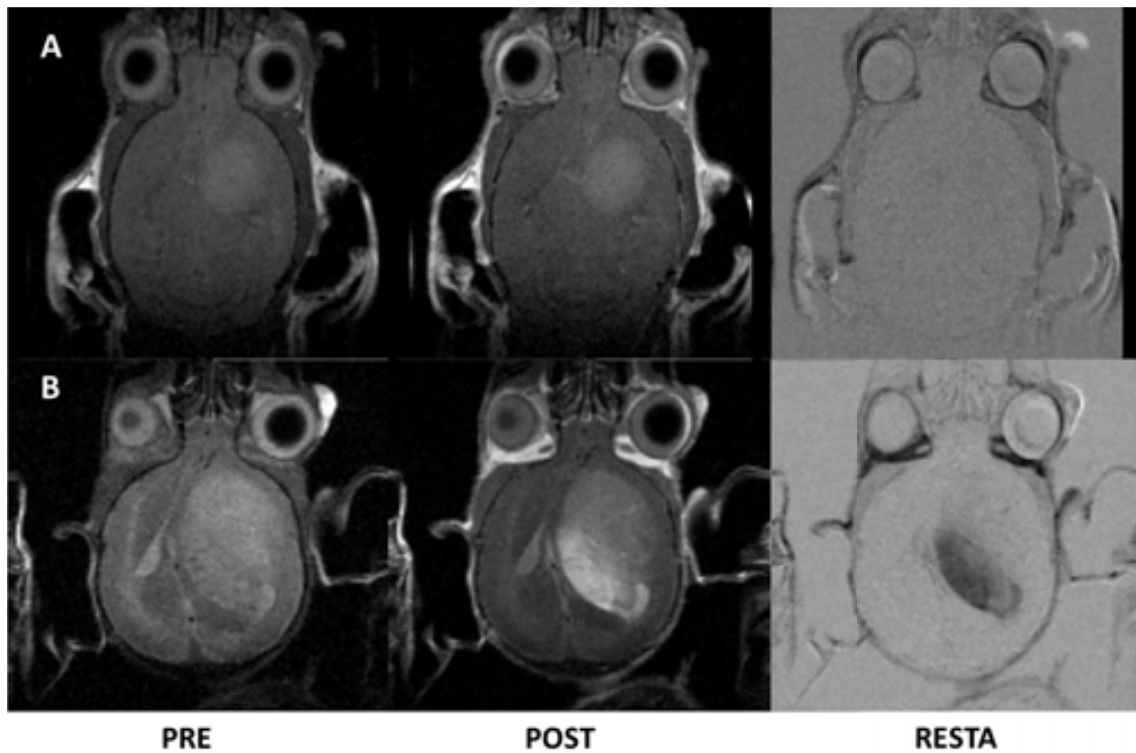


Figura 4.22: Porcentaje de animales con la BHE comprometida observada a lo largo de las exploraciones IRM, combinando los grupos 1 (n=9) y 2 (n=6), en distintos estadios de progresión volumétrica según se detalla en el texto.



CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Figura 4.23: IRM ponderada en T_1 (pre- y post- administración de contraste, así como la substracción de dichas imágenes “resta”), en orientación axial del cerebro del animal G2-S912, adquirida a 7T A) a día 28 post-implantación, cuando el tumor presentaba un volumen tumoral de $39,6\text{mm}^3$, B) a día 43 post-implantación, cuando el tumor presentaba un volumen tumoral de $141,2\text{mm}^3$. Observar el cambio evidente en la captación de contraste en B con la progresión de la masa tumoral.

La penetrancia total del desarrollo de los tumores fue de un 55,2%. De los 29 animales (uno murió durante la implantación y no sabemos si hubiera pertenecido al grupo de los animales que generaban tumor) implantados con gliosferas generadas a partir del tumor GEM S912, 16 de ellos desarrollaron masa tumoral (figura 4.24).

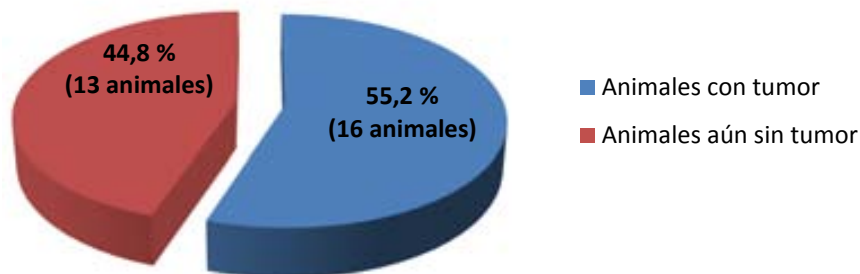


Figura 4.24: Porcentaje de desarrollo de tumores en los 30 animales implantados con gliosferas generadas a partir del tumor GEM S912.

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

4.3.4 Estudios por ERM

Cuando las masas tumorales estudiadas alcanzaban el tamaño aproximado de $2 \times 2 \times 2$ (mm)³ se realizaron estudios por ERM SV, para analizar el patrón espectroscópico de las masas tumorales y tener indicación sobre el posible grado de los tumores. Las figuras 4.25 y 4.26 presentan exploraciones ERM en uno de los animales que presentaron tumor (G1-S912, perteneciente al grupo 1), en dos momentos distintos de su progresión (18 y 39 días post-detección de la masa anómala). Aparte del cambio evidente volumétrico observado en las imágenes ponderadas en T₂, se observa un cierto cambio del patrón metabólico debido a la evolución del tumor.

Así, los espectros del día 39 (en comparación con los del día 18) presentan un aumento del cociente Cho/Cr, un aumento de las señales de lípidos móviles a TEC y un aumento de la señal de lactato (observada con su característico patrón de inversión a 136ms), ver también tabla 4.2. La señal a 2,02 ppm (NAC y macromoléculas señalado como "NAC" en las figuras 4.25 y 4.26) también sufre cambios: a día 18 mantiene su cociente en relación a la creatina, además de identificarse con claridad en el espectro a 136ms indicando que gran parte de la señal observada se debía a NAC debido a su relativamente largo T₂. Por otro lado, a día 39 esta característica cambia, y la señal a 2,02 ppm se ve atenuada en su casi totalidad a 136ms, sugiriendo que gran parte de esta señal ahora se debe a macromoléculas y/o lípidos móviles que poseen un T₂ muy corto y el NAC prácticamente no se encuentra presente.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

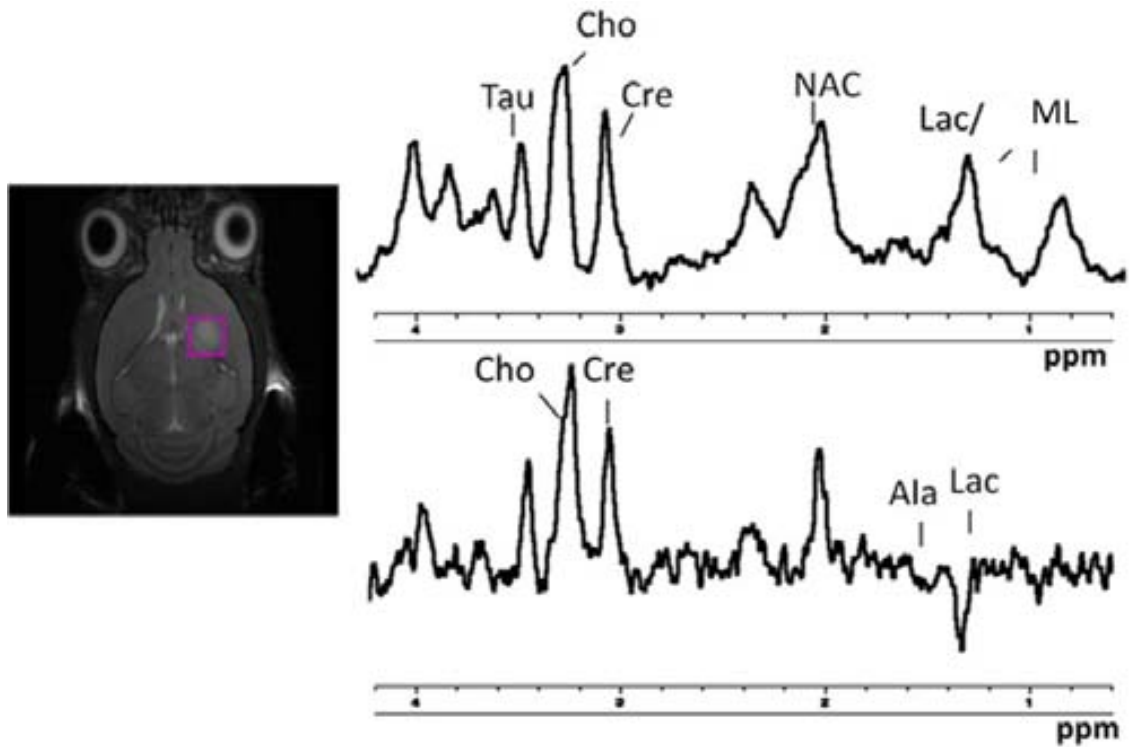


Figura 4.25: Izquierda, imagen de alta resolución ponderada en T_2 del animal G1-S912, a 18 días post implantación. El voxel utilizado en los estudios ERM se representa en el recuadro rosa. A la derecha, se muestran los espectros A) TEC adquirido a 12 ms, B) TEL adquirido a 136 ms, en el rango de 0 a 4,2 ppm con los metabolitos más representativos marcados con las abreviaturas usadas en esta tesis.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

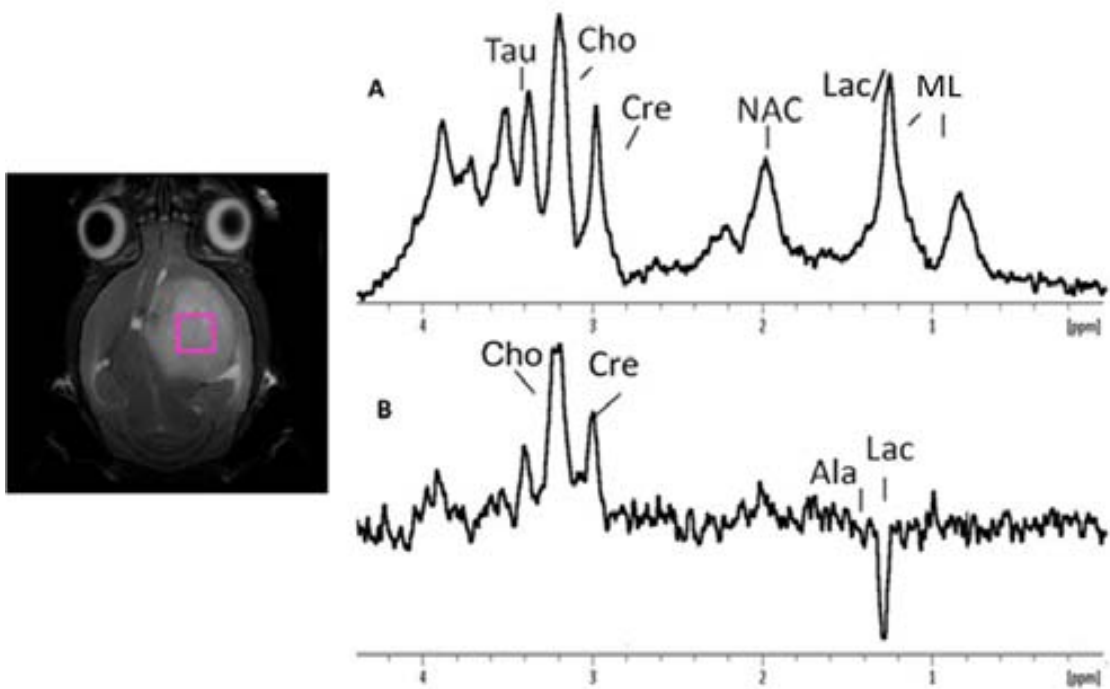


Figura 4.216: Izquierda, imagen de alta resolución ponderada en T_2 del animal G1-S912, a 39 días post implantación. El voxel utilizado en los estudios ERM se representa con el recuadro rosa. A la derecha, se muestran los espectros A) TEC adquirido a 12 ms, B) TEL adquirido a 136 ms, en el rango de 0 a 4,5 ppm con los metabolitos más representativos marcados con las abreviaturas usadas en esta tesis.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

GRUPO 1		Día 18 (n=8)		Día 21(n=8)		Día 40 (n=8)		GL261 (n=8)	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
TEC	Cho/Cr	1,38	0,33	1,65	0,12	1,90	0,11	2,03	0,30
	ML/Cr	0,34	0,09	0,62	0,08	0,24	0,00	2,39	0,71
	NAA/Cr	0,63	0,08	0,95	0,10	1,86	0,08	2,03	0,54
TEL	Cho/Cr	1,55	0,20	1,82	0,30	4,39	3,29	3,45	1,13
	Lac/Tau	-0,49	0,26	-0,18	0,04	-0,01	0,01	-5,07	1,61
	NAA/Cr	0,68	0,75	0,74	0,08	0,85	0,02	0,97	0,24

GRUPO 2		Día 35-42 (n= 7)	
		Media	SD
TEC	Cho/Cr	1,06	0,52
	ML/Cr	0,16	0,27
	NAA/Cr	1,75	1,04
TEL	Cho/Cr	0,88	1,45
	Lac/Tau	-0,21	1,40
	NAA/Cr	0,87	0,47

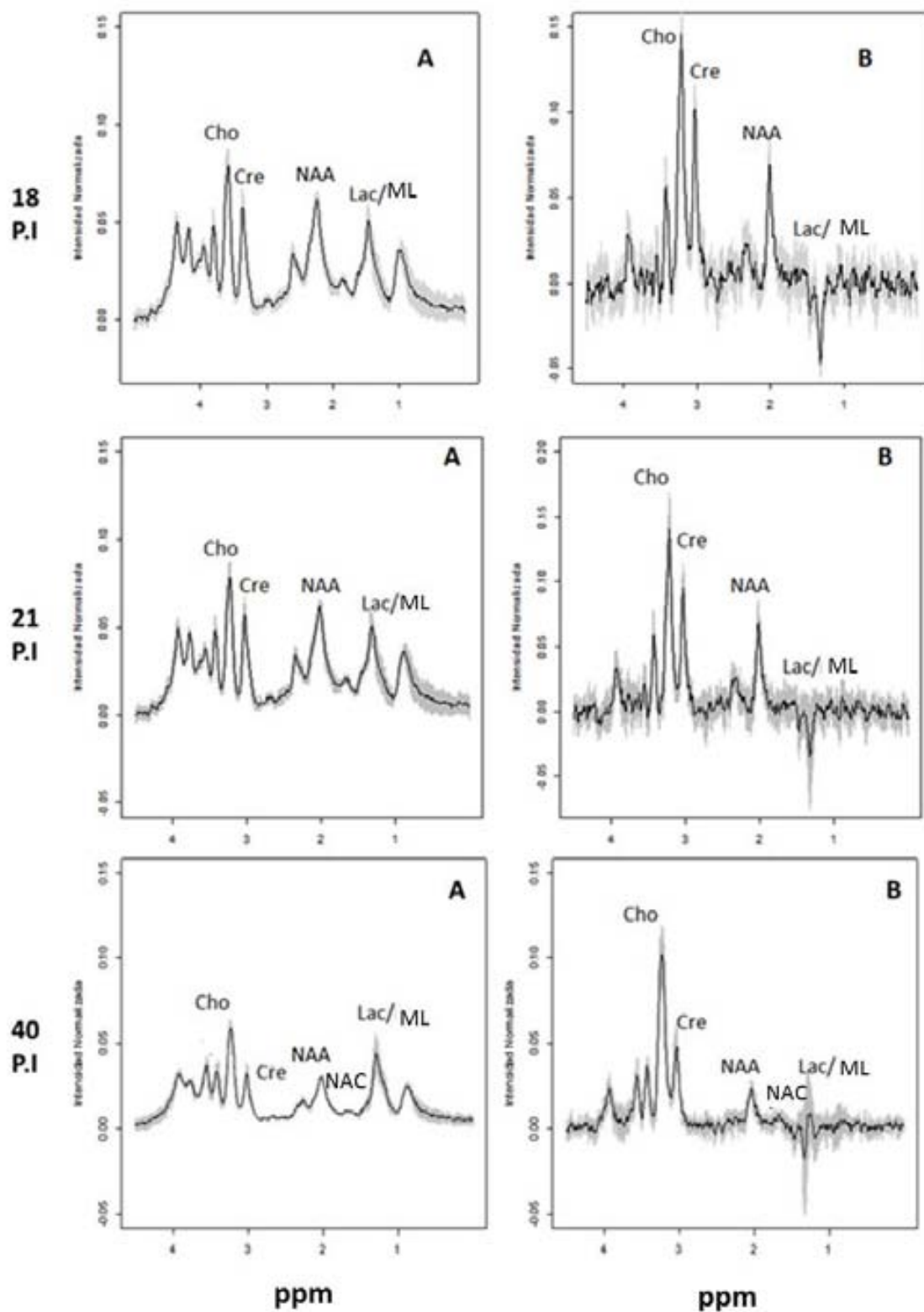
Tabla 4.2: Promedio de los cocientes de los principales metabolitos analizados para animales del grupo 1, los días 18, 21 y 40 post-implantación, para el grupo 2 35-42 días post-implantación y animales implantados con células GL261.

Cuando todos los espectros de los tumores de los ratones del grupo 1 y 2 ya se habían adquirido, se calculó (ver sección 3.2.2.1.3 del capítulo 1) un espectro promedio con los datos de los tumores de los animales del grupo 1 en los días 18 y 21 post-implantación. En el momento de dichas adquisiciones MRS, la BHE aún no estaba comprometida y tampoco se habían observado cambios fuertes en el patrón espectral a TEC y TEL. Sin embargo comparándolos con los valores para parénquima cerebral de wt (tabla 3.5) se observaron alteraciones en los cocientes, a TEC por ejemplo Cho/Cr (de 0,9 en wt a 1,38-1,65 en el grupo 1) y NAA/Cr (de 1,04 en wt a 0,63-0,95 en el grupo 1). El mismo tipo de adquisición se llevó a cabo el día 40 post-implantación (momento en el cual se observaba ruptura evidente de la BHE) y

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

entonces si se evidencio un cambio claro en el patrón espectral, como es el aumento del cociente Cho/Cr, así como una clara disminución en la señal de NAC a TEL (figura 4.27), compatible con una posible progresión del grado tumoral.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral



CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Figura 4.27: Espectros promedio (\pm SD en gris) a TEC (A) y TEL (B) obtenidos de los tumores generados a partir de gliosferas obtenidas del tumor GEM S912 en los estudios de ERM a 18, 21 y 40 días post implantación. Todos los animales pertenecen al grupo 1 (n=9).

Los espectros promedio también se calcularon para los animales pertenecientes al grupo 2. Como estos animales presentaron un crecimiento tumoral heterogéneo (por lo que su SD es bastante amplia), los espectros fueron adquiridos una sola vez entre los días 35 y 45 post-implantación a los tiempos de eco TEC y TEL (figura 4.28), estos espectros podrían ser comparables a los realizados el día 40 al grupo 1 ya que además de haber sido adquiridos en puntos temporales similares presentan características espectrales parecidas como un cociente Cho/Cr elevado, así como una clara disminución en la señal de NAA/NAC en el TEL. En el momento en el que se adquirieron, los espectros 5 de los 7 animales presentaban comprometimiento de la BHE, lo que sugeriría un grado tumoral avanzado.

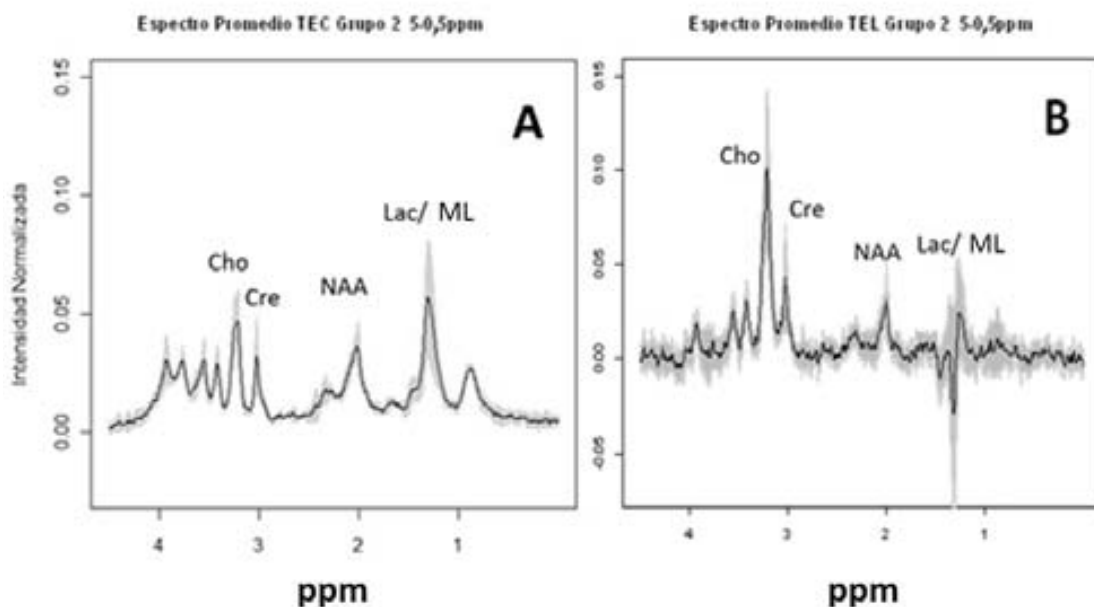


Figura 4.28: Espectros promedio (\pm SD en gris) a TEC (A) y TEL (B) obtenidos de tejido tumoral en los estudios de ERM. Todos los animales pertenecen al grupo 2 (n=7).

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

4.3.5 Estudios por IERM

En cuando a los estudios de IERM-PM con DMSO se ilustra como ejemplo el caso G1-S912 que pertenecía al grupo 1 a 33 días post-implantación. En este caso el acúmulo, o *hot spot*, de DMSO coincide con la zona interna del tumor aunque se observan también pequeños acúmulos en zona peritumoral (figura 4.29). En este punto temporal, el tumor aún no presentaba la BHE comprometida. Con la perturbación por administración de glucosa, se obtienen resultados de *hots spots* diferenciales según el tiempo de eco estudiado. Los datos a TEC no sugieren acumulación dentro de la zona tumoral, sino que indican cierto acúmulo en la periferia del tumor (figura 4.30). Aunque hay que tener en cuenta que los extremos de la malla de espectros IERM presentan una SNR más deficiente y los valores altos aislados vistos en el mapa de color podrían deberse a ello. Los datos adquiridos a TEL, enfocados a la acumulación de lactato que indican una potencial aumento de este en el interior del tumor lo que sugiere una capacidad de metabolización de glucosa por vía anaeróbica con consecuente producción de lactato aumentaba durante la hiperglicemia transitoria.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

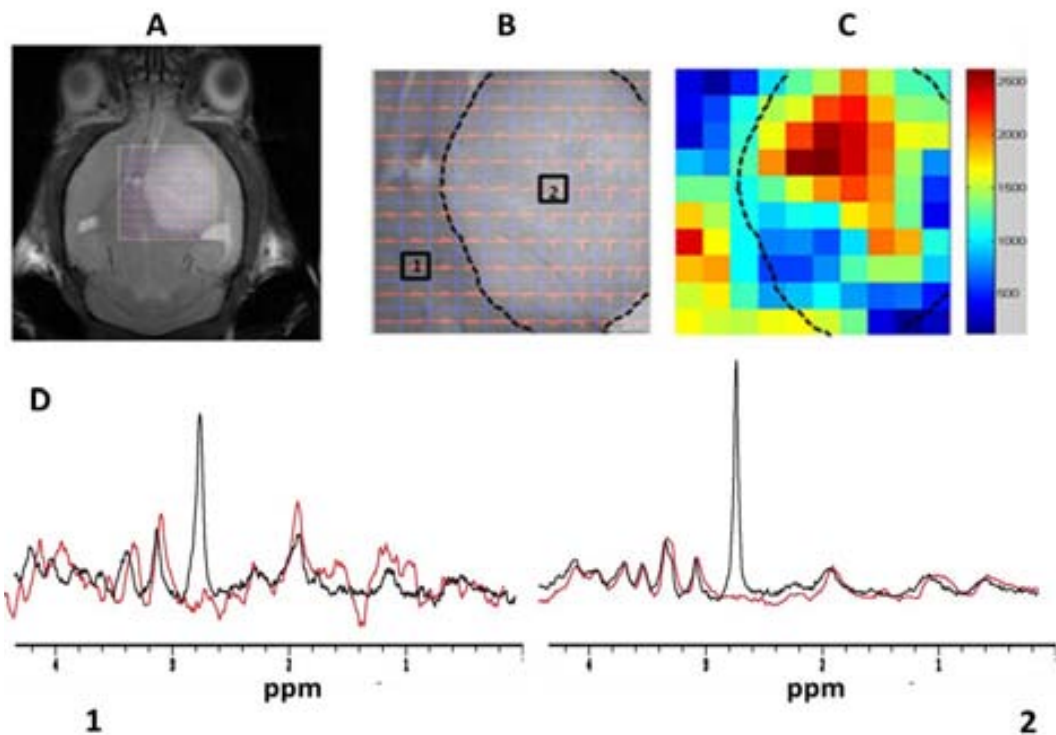
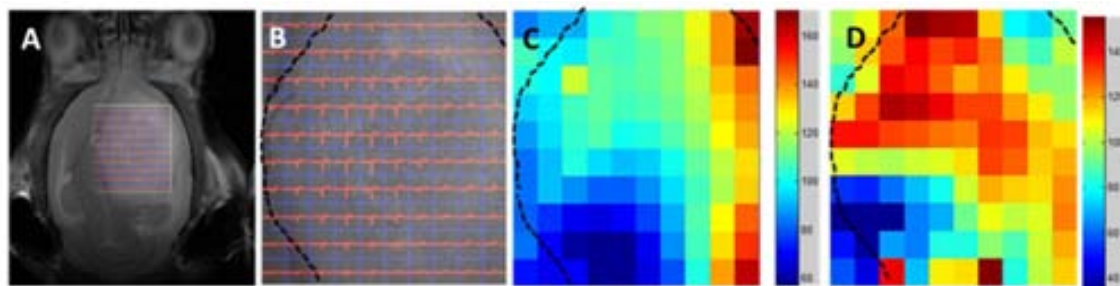


Figura 4.229: A) VOI de adquisición (cuadrado amarillo) para las secuencias IERM (14ms TEC) superpuesta a la imagen de adquisición de referencia (T_{2w} HR) en el animal G1-S912 a 33 días post-implantación. B) VOI a mayor aumento: la línea punteada negra marca el límite tentativo de la masa anómala y los cuadros 1 y 2 corresponden a los espectros SV extraídos de las regiones de la matriz de IERM y que se exponen en D). C) Mapa en escala de color codificando el cociente entre el patrón pre y post perturbación de la señal de DMSO detectada en el VOI 88 minutos tras su administración. D) Espectros de las regiones marcadas como 1 (parénquima no afectado/normal) y 2 (masa anómala) en la matriz expuesta en B, antes (espectro rojo) y 88 minutos después de la administración de DMSO (espectro en negro).



CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Figura 4.30: VOI de adquisición para la secuencia IERM (12ms TE) superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T_{2w} .HR) en el animal G1-S912 39 días post-administración. B) VOI a mayor aumento, la línea punteada negra marca el límite del tumor. C) y D) Mapas en escala de color de la intensidad de D-Glucosa a 1,3 ppm a TEC 12ms y TEL 136ms tras 88 y 66 min respectivamente de la administración.

Los espectros de la malla IERM-PM adquiridos en el VOI de todos los animales estudiados fueron utilizados para calcular mapas de acumulación de DMSO Anexo 5, los cuales mostraron claros “*hots-spots*” de acumulación de este en el interior del tumor, en comparación con el parénquima cerebral normal. Se optó por priorizar esta técnica de perturbación, dado que resultados preliminares de nuestro grupo [148] sugieren que posiblemente esta acumulación visible de DMSO es indicativa de cambios en la composición y comportamiento del tejido tumoral detectados de manera muy temprana. Es de suponer que tales cambios puedan señalar diferencias entre zonas del tumor en cuanto a su probable evolución e, incluso, potenciales diferencias en la respuesta si este tumor recibiera tratamiento, por ejemplo. La máxima concentración aparente de acúmulo de DMSO fue detectada en el minuto 88 post inyección en todos los casos, y se puede observar una clara acumulación del compuesto predominantemente en el interior del tumor como se describe en [26,7] aunque en algunos casos se puede observar cierta acumulación en zonas peritumorales, fuera de la línea de definición anatómica del tumor (ej. G7-S912 animal perteneciente al grupo 1). En sus estudios por ERM, este animal presentó un patrón espectral de tumor de alto grado, con un cociente Cho/Cr muy elevado, una señal de NAC disminuida y presencia de lípidos móviles. Imágenes posteriores de estudios IRM demuestran que en la zona de *hot spot* peritumoral hay comprometimiento de BHE, lo que cuadraría con grado alto para estas zonas y este estadio de la progresión del tumor.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

4.3.6 Estudios histopatológicos

Un total de 11 muestras de los 16 animales que desarrollaron tumores generados con gliosferas del tumor GEM S912 fueron reservadas para diagnóstico histopatológico. Esto fue debido a que las otras 5 muestras fueron congeladas y reservadas para futuras nuevas generaciones de gliosferas. Las 11 muestras tuvieron el mismo diagnóstico histopatológico original del animal GEM (oligodendroglioma anaplásico, grado III). En algunas muestras, además, se hicieron estudios con marcadores inmunohistoquímicos de diferentes tipos: Glia reactiva (GFAP) el cual detecta presencia de astrocitos y Oligo 2 para componente oligodendroglial (Tabla 4.3). Los tumores estudiados eran heterogéneos y presentaron dos zonas: una de grado II, caracterizada por presentar proliferación neoplásica circunscrita de células isomorfas y otra con proliferación de células de la glia reactiva con GFAP positivo y de grado III. Los tejidos estudiados mostraron pleomorfismo moderado, anisocariosis, pocas mitosis, células neoplásicas creciendo en patrón en forma de panal y vasos sanguíneos de forma y distribución irregulares con hiperplasia endotelial. Además se observaron poblaciones de células neoplásicas pleomórficas con evidente atipia nuclear, anisocariosis y citoplasmas eosinófilos creciendo en grupos, en las regiones de transición de grado II a III, en la que el componente vascular era más prominente. Como podemos ver en la figura 4.31, la masa anómala que se muestra sería muy positiva para oligo 2 y menos para GFAP.

ID	Tumor por HE	IHQ: Olig2 i GFAP
S912	Oligoastrocitoma anaplásico	Oligoastrocitoma anaplásico (grado III)
G2-S912		Oligoastrocitoma anaplásico (grado III)
G3-S912		
G5-S912		

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

G6-S912	Glioma poco diferenciado/Oligodendroglioma (Grado III)	
G8-S912		
G9-S912		Muy picnótico
G10-S912		Oligoastrocitoma anaplásico (grado III)
G11-S912		Oligoastrocitoma anaplásico (grado III)
G12-S912		
G13-S912		Oligoastrocitoma anaplásico (grado III)
G14-S912		

Tabla 4.3: Diagnóstico histopatológico por hematoxilina-eosina (HE), para las 11 muestras de tumor obtenidas a partir de los tumores generados de las gliosferas del tumor GEM, así como los obtenidos para algunos marcadores inmuno-histoquímicos.

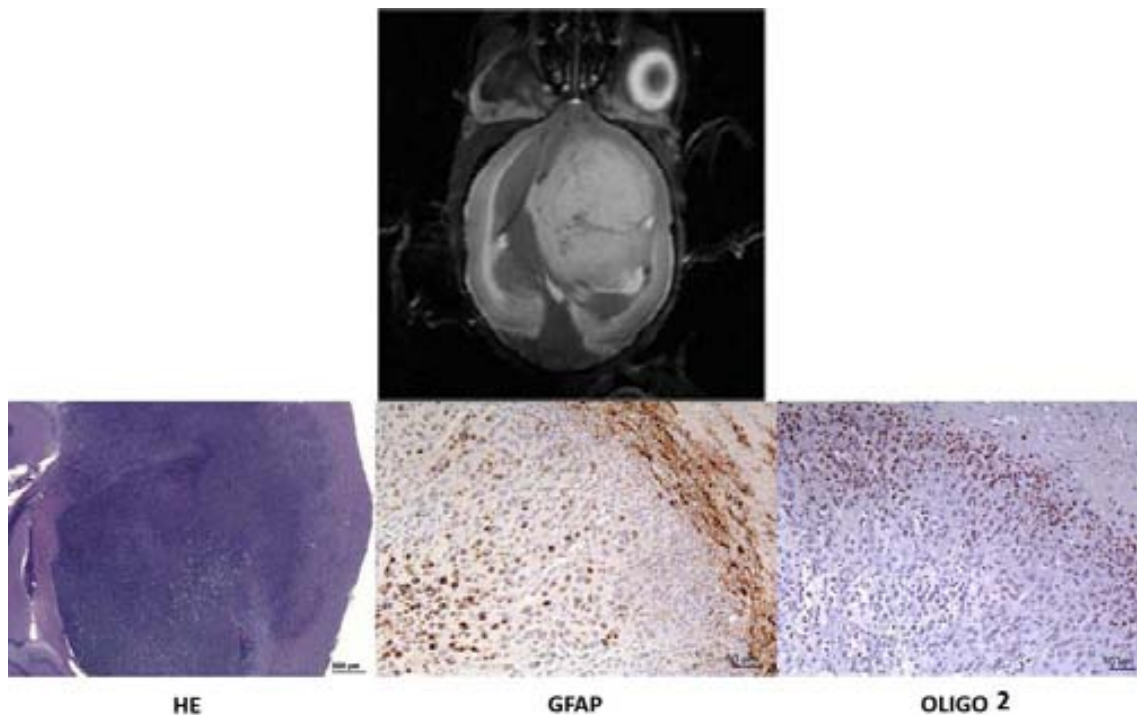


Figura 4.31: Arriba imagen T_{2W} -HR del animal G2-S912 a 43 días post-implantación en orientación axial. Abajo, las diferentes tinciones realizadas con el tejido despues del sacrificio a a día 62, respetando la orientacion que se ve en la imagen *in vivo*.

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Identificación genotípica:

Los datos obtenidos del genotipado del tumor de varios de los animales estudiados en este capítulo (tabla 4.4) muestran que, 2 de ellos mantienen exactamente el mismo genotipo del GEM original S912 (Tg/K+/-), mientras 2 de ellos progresaron a Tg/ko-/-, es decir, se habría producido una pérdida de heterocigosis para Ink4A-Arf, lo que estaría de acuerdo con una progresión hacia mayor agresividad.

ID ANIMAL	GENOTIPO
S912	Tg/ko +/-
G1-S912	Tg/ko -/-
G4-S912	Tg/ko -/-
G7-S912	Tg/ko +/-
G11-S912	Tg/ko +/-

Tabla 4.4: Resultados de la caracterización genotípica del animal GEM S912 y de 4 de los animales generados a partir de éste.

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

4.3.7 Clasificadores de animales generados a partir de gliosferas del animal GEM S912, mediante IERM-PM con glucosa

A los animales a que se les pudo realizar estudios de IERM-PM con glucosa mediante hiperglicemia transitoria en condiciones de hipotermia ligera ($\sim 30^{\circ}\text{C}$) [27,131], fueron clasificados mediante el *spectra classifier*. v3.0 Para ello se utilizó un clasificador desarrollado dentro del grupo para este tipo de estudios [28].

Los clasificadores fueron obtenidos con espectros adquiridos a TEC en hiperglicemia, con cuatro variables seleccionadas mediante el sistema SFFS. Estas variables fueron: 1,28 ppm (lípidos móviles, lactato), 1,47 ppm (alanina), 2,14 ppm (glutamina/glutamato, glutatión), 3,56 ppm (mio-inositol, glicina, glucosa).

En la figura 4.32 podemos ver un ejemplo de los resultados obtenidos mediante el *spectra classifier*. v3.0 con los animales generados a partir de gliosferas del tumor GEM S912.

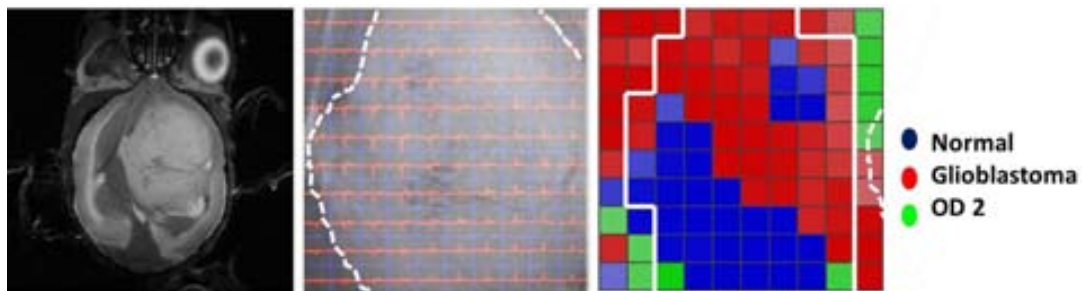


Figura 4.32: De izquierda a derecha: imagen T_{2w} HR de referencia para los estudios de IERM llevados a cabo en el animal G2-S912; ampliación del VOI de dichas secuencias con los límites del tumor marcados con una línea blanca discontinua y mapa nosológico de clasificación de cada *voxel* independiente extraído a partir del *Spectra Classifier* v3.9 (la leyenda se muestra a la derecha).

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

Aunque los resultados obtenidos con el *Spectral classifier* no fueron lo suficientemente robustos, debido a que este clasificador no estaba entrenado para clasificar tumores de grado III, es posible que entrenando también para este tipo de tumores los resultados obtenidos sean mucho más robustos y nos permitan desarrollar clasificadores para tumores cerebrales de grado III en modelos preclínicos murinos basados en datos de IERM, de una manera rápida y semi-automática, utilizando un grupo de test independiente para evaluarlos. Todo ello sería posible utilizando el software de acceso gratuito *Spectra Classifier v3.0* [138].

Aunque, como se mencionó anteriormente estos datos no fueron lo suficientemente robustos, si se acercan bastante a los resultados obtenidos por histopatología. Como ejemplo el caso del animal G2-S912, que por histopatología fue diagnosticado como oligoastrocitoma anaplásico grado III con un componente astrocítico, lo cual se asemeja mucho a los datos obtenidos mediante el *Spectra Classifier*, figura 4.32, donde podemos observar 2 zonas con diferentes tipos tumorales.

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

4.4 DISCUSIÓN

Se han usado diversos modelos animales como describen Schold y Friedman [150], para el estudio de la biología de los tumores cerebrales y su respuesta a terapias experimentales,

Así, el modelo generado por Corbett *et al* [97] donde se inoculaban adenocarcinomas de páncreas en animales C57BL/6 fue uno de los primeros modelos generados a partir de tumores de bajo grado e intermedio (grado II y III). Sin embargo, a lo largo de los trasplantes pasaron a producir metástasis, sugiriendo una progresión maligna. Posteriormente se han realizado estudios de inyección estereotáctica de gliosferas de glioblastomas humanos en ratas inmunodeprimidas [151]. Dicho estudio se llevó a cabo no solo para establecer un modelo ortotópico de tumor cerebral humano, sino también para permitir la implantación de esferoides generadas a partir de otros tipos de tumores para modelar el crecimiento metastásico en un sitio biológicamente relevante, cerebro en su caso. Como resultado se obtuvo que la inyección de gliosferas de 6 glioblastomas de diferentes pacientes produjo tumores en el 87,5% de los animales de todos los pacientes por tanto excepto para uno [151].

Otros autores [152] generaron modelos de tumor cerebral a partir de biopsias de gliomas humanos en ratas adultas donde los animales que desarrollaron tumor lo hicieron después de 3 meses de la implantación. En otros casos de inyección de gliosferas se detectó que aunque se obtuvo un resultado positivo en cuanto al desarrollo de tumores, éstos no eran representativos de las lesiones del tumor del que fueron originados [153].

Teniendo en cuenta dichos precedentes se consideró que crear un modelo transplantable de tumor de bajo grado donde se pudiera estudiar su progresión

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

mediante IRM/ERM/IERM podría ser de gran utilidad para el desarrollo de estrategias de pronóstico, diagnóstico tumoral y seguimiento futuro de respuesta a terapia.

Los intentos de generación de tumores transplantables a partir de gliosferas, llevados a cabo por otros autores, si daban resultados de interés en el caso de tumores de alto grado aunque, como se menciona antes, no siempre se trataba de un crecimiento rápido y algunas veces no recapitulaba las características principales del tumor de origen. Todos estos motivos nos llevaron a intentar generar nuestro propio modelo de bajo grado a partir de un tumor desarrollado de manera espontánea por la colonia GEM.

La puesta a punto del método en el grupo con gliosferas generadas a partir de tumores GL261 [107] presentó un crecimiento y penetrancia similar a los tumores generados a partir de células GL261 en cultivo estandar. Es decir, los animales con tumores generados a partir de células GL261 en cultivo tuvieron una supervivencia promedio de 24 días y una penetrancia de 98%, mientras que en los generados con gliosferas de células GL261 obtenidos de tumores frescos en esta tesis la supervivencia estuvo alrededor de los 27 días y su penetrancia fue del 95%.

Dicha reproducibilidad de resultados en comparación con [107] también se observó cuando se trabajó para preparar gliosferas con el tejido tumoral GL261 previamente congelado. Esta era una puesta a punto importante porque no siempre es posible trabajar con los tejidos en “fresco”, aun bajo riesgo que la congelación/descongelación del tejido pueda destruir ciertos tipos celulares, actuando de cierta forma para seleccionar una población celular que formará finalmente las gliosferas.

La aplicación de la técnica puesta a punto con los GL261 a un tumor GEM tuvo claramente una penetrancia inferior y un periodo de latencia más largo, lo que también

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

fue descrito por otros autores en modelos similares, con periodos de latencia de hasta 8 meses-1 año en desarrollar tumores [149].

En este caso, y contrariamente a lo descrito en [153] el tumor sí que recapituló el tumor de origen, en cuanto a sus características histopatológicas que no presentaron una evolución en el grado, como se presentó en la tabla 4.3 de resultados.

Con relación al patrón espectral registrado en los estudios ERM, este presentó similitud con lo ya detectado en los GEM y descrito en el capítulo 1. Por ejemplo, el aumento del cociente Cho/Cr con la progresión tumoral. También presentó una disminución de las neuronas viables dentro del tejido tumoral, lo que lleva a su vez a una disminución de NAA [154,155]. Cosa que se reflejó en el patrón espectroscópico que presentaron los tumores generados a partir del animal GEM. Otra característica espectral asociada a los oligodendrogliomas humanos, también se observó en los derivados del S912, es la elevada señal de lactato y una cierta presencia de lípidos móviles [156,157]. Ese hecho se dio en el 100% de los casos estudiados.

La vascularización es otra característica de los tumores en general que está asociada a su grado de perfusión. En estadios iniciales, cuando se está iniciando el proceso de neovascularización, la BHE está intacta, por lo que no se detecta captación de contraste. El avance de dicha neovascularización está asociado al aumento de malignidad y de agresividad biológica. Además, cambios locales como la secreción local de factores de crecimiento en respuesta a la hipoxia y la degradación y remodelación de las macromoléculas extracelulares llevan al comprometimiento de la BHE [129,158]. Los resultados obtenidos en nuestros estudios apuntan a que la mayoría de tumores disgregados GEM (aproximadamente un 70%) presentaron comprometimiento de la BHE cuando el tumor tenía un volumen entre 70-80 mm³, indicando que este aumento del volumen también conllevó muy posiblemente un

CAPITULO 2: Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

avance del grado tumoral. Por otro lado, el pequeño porcentaje de tumores que presentaba captación de contraste desde estadios muy tempranos de su crecimiento sugiere cierta heterogeneidad en los tumores individuales, compatible por ejemplo, con un tumor originario de grado III en plena transición entre grado bajo y alto.

Por otra parte las diferencias genómicas encontradas en el 50% de las muestras analizadas indican que estas no conservaron intacta la mutación transgénica inicial del GEM S912 dándose la pérdida de heterocigosidad para Ink4A-Arf. No obstante, y por lo menos en esta primera generación de tumores ello, no pareció afectar al fenotipo tumoral que permaneció fiel al tumor de origen.

Los resultados de PE-MRSI con DMSO mostrados en el anexo 5, permitieron confirmar la acumulación diferencial de DMSO en el interior de los tumores OD III, derivados del GEM S912, de acuerdo a datos previos del grupo finalmente descritos en [26].

En este momento se está continuando con el desarrollo de tumores generados a partir de gliosferas congeladas que fueron generadas a partir del tumor del animal S912. La continuidad de éste trabajo por parte de nuestro grupo de investigación sugiere que la congelación de tejidos y su posterior uso para la generación de gliosferas puede efectivamente causar una selección de la población celular y llevar a un aumento de grado. Dicho aumento no se detectó previamente (tumores GL261) por tratarse ya de una línea celular de grado IV.

CAPITULO 2:

Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

4.5 Conclusiones relativas al capítulo del intento de establecimiento de una línea transplantable de bajo grado a partir de un tumor GEM

1. Se ha puesto a punto el método de disgregación tumoral, generación de gliosferas y producción de nuevos tumores a partir de éstas, tanto para tejido fresco como congelado.
2. Se ha conseguido establecer una generación inicial de tumores a partir de un tumor GEM de grado intermedio con una penetrancia superior al 50%. Aunque dista aún del 100% deseado, ésta penetrancia es superior al 16,7% obtenido con el desarrollo espontáneo GEM para la misma colonia. Se ha caracterizado dicha línea transplantable por IRM/ERM/IERM (PM), estudios histopatológicos y caracterización genotípica.
3. Se observó la formación de 3 subgrupos cuanto al tiempo de latencia de aparición de tumores en éste estudio, que pueden deberse a la propia heterogeneidad tumoral o bien a cambios sufridos por el cultivo in vitro. Dicha dispersión se deberá tener en cuenta para futuros estudios en ésta temática.
4. Aunque el tiempo de latencia en la aparición del tumor varió entre subgrupos, cuando dicho tumor se detectó, el tiempo de evolución fue similar entre ellos, y, a su vez similar al del tumor de origen, lo que sugiere que las características de éste se conservaron bastante bien en la nueva línea transplantable generada.
5. Los datos sobre la integridad de la BHE en la línea transplantable indican también un comportamiento similar al tumor GEM de origen (S912), con presencia de captación de contraste después de la evolución del tumor a un volumen superior a 25-30 mm³, sugiriendo transición de grado.
6. Los estudios con ERM no evidenciaron diferencias cualitativas entre el grupo 1 (latencia corta) día 40 y los espectros promedio del grupo 2 (latencia larga), como era de esperar, ya que se encontraban en puntos temporales desde la

CAPITULO 2:
Intento de generación de un modelo murino de grado bajo transplantable de tumor cerebral

detección del tumor similares y la mayoría de los tumores presentaba comprometimiento de la BHE, que fue reflejado en el patrón espectral con características de grado alto.

7. En los estudios IERM-PM con DMSO de los tumores originados por trasplante la mayoría de los *hotspots* observados se encontraban dentro de la masa anómala, según IRM ponderada en T_2 , al contrario del tumor de origen donde, inicialmente, el DMSO se acumulaba fuera de dicha masa anómala.
8. Los estudios histopatológicos apuntaron a que hubo coincidencia entre el diagnóstico del tumor de origen y los nuevos tumores generados a partir de éste, confirmando el correcto funcionamiento del protocolo de disgregación llevado a cabo. Hasta donde tenemos constancia, no hay actualmente ninguna línea transplantable o in vitro de tumor cerebral murino de bajo grado que se encuentre disponible, y este desarrollo de una de grado intermedio, podría suponer, un avance relevante en este sentido.
9. Los cambios genéticos observados en la mitad de la población que se analizó en los nuevos tumores (perdida de heterocigosidad) no son desdeñables y deben ser tenidos en consideración para estudios de la evolución tumoral o bien futuros estudios de respuesta a la terapia. Una caracterización genotípica más extensa de los tejidos en los individuos de nueva generación será necesaria para comprobar dichos cambios.

**CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como
agentes de contraste *in vivo***

**5. CAPÍTULO 3: DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA EVALUAR EL
POTENCIAL DE NANOPARTICULAS COMO AGENTES DE CONTRASTE *IN VIVO*.**

5.1 OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo de la tesis fue desarrollar un método sencillo de evaluación *ex vivo* del desempeño de nuevos compuestos (ej., nanopartículas) como potenciales agentes de contraste para su uso en la detección de tumores cerebrales, utilizando cantidades mínimas de material. Dicho método debería emular mejor las condiciones de un experimento real *in vivo*, en comparación con los experimentos clásicos de medición de relajatividad *in vitro*.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Síntesis de agentes de contraste

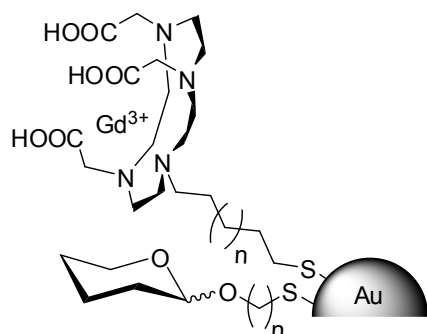
5.2.1.1 Agentes de contraste positivo

Los agentes de contraste positivo evaluados en este capítulo consistieron en diferentes preparaciones de glicon nanopartículas (GNP) (nanopartículas con un núcleo de oro, recubiertas por cadenas carbonadas de longitud variable unidas a quelatos de gadolinio y sacárido, con un diámetro de 1,8-4,5 nm). La estructura básica y el contenido de gadolinio para cada tipo de GNP están esquematizados en la figura 5.1 y resumidos en la tabla 5.1. Todas ellas fueron sintetizadas por el personal del Laboratorio de Nanomateriales Biofuncionales del CIC-Biomagune (LNB-CICBio) a partir de una sal de oro, el ligando DO3A y un complejo “neoglico”. Se utilizaron dos

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

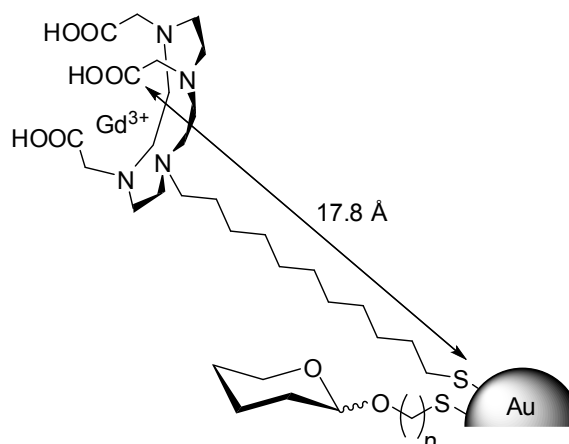
métodos diferentes de síntesis para estos agentes: 1) método "directo", tal como se describe en [82] (GNPs A-E); 2) Método "intercambio de ligandos", *Ligand Place Exchange* (LPE) tal como se describe en [159] GNPs E_1, E_2 y F-J). La estimación del contenido de gadolinio (Gd^{3+}) se llevó a cabo mediante espectrometría inducida de plasma acoplado (ICP) como en [82].

(a) "Direct" synthesis



- | | |
|---|--------|
| LacC ₅ -Au-DO3AC ₁₁ , | GNP(A) |
| <i>maltose</i> C ₁₁ -Au-DO3AC ₅ , | GNP(B) |
| GlcC ₂ -Au-DO3AC ₅ , | GNP(C) |
| GalC ₅ -Au-DO3AC ₅ , | GNP(D) |
| GlcC ₅ -Au-DO3AC ₁₁ , | GNP(E) |

(b) "Ligand-place exchange" synthesis



- | | |
|---|----------|
| GlcC ₅ -Au-DO3AC ₁₁ , | GNP(E-1) |
| GlcC ₂ -Au-DO3AC ₁₁ , | GNP(F) |
| GlcC ₉ -Au-DO3AC ₁₁ , | GNP(G) |
| GlcC ₇ -Au-DO3AC ₁₁ , | GNP(H) |
| GlcC ₃ -Au-DO3AC ₁₁ , | GNP(I) |
| GlcC ₅ -Au-DO3AC ₁₁ , | GNP(E-2) |
| GalC ₅ -Au-DO3AC ₁₁ , | GNP(J) |

Figura 5.1: Representación esquemática del quelato de Gd y brazos de sacáridos contenidos en las (GNPs) estudiadas en esta tesis. El núcleo de oro (Au) está recubierto con derivados de Gd:DO3A y auto ensamblado con conjugados de polisacáridos. EL alcano de tiol se utiliza como enlazador para unir los conjugados al núcleo de oro. Lac= lactose, Glc=glucose. Ver también tabla 5.1.

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

	Agentes de contraste Gd-GNP (Glyco-Au-DO3A:Gd) ^a	%Gd	1,4T r ₁ relajatividad (smM) ⁻¹ (n=3)	7,0T r ₁ relajatividad (s ⁻¹ mM ⁻¹)(n=3)	% IRC postmortem (n=3)	% IRC <i>in vivo</i> ** (n=9)
Síntesis "Directa"	LacC5-DO3AC11 (GNP(A))	0,55±0,05	13,5±0,1	NM	209,5 ± 4,1*	NM
	<i>maltose</i> C11-DO3AC5 (GNP(B))	0,73±0,04	6,6±0,2	NM	197,2 ± 5,6*	NM
	GlcC2-DO3AC5 (GNP(C))	0,21±0,02	12,1±0,1	NM	159,7 ± 5,3*	NM
	GalC5-DO3AC5 (GNP(D))	0,74±0,03	5,3±0,1	NM	141,2 ± 8,0*	NM
	GlcC5-DO3AC11 (GNP(E))	6,1±0,1	6,2±0,2	3,8±0,7	305,7 ± 18,9*	123,8±3,8*
Síntesis por intercambio de ligandos	GlcC5-DO3AC11 (GNP(E_1))	4,7±0,1	7,4±0,7	2,7±0,4	182,8 ± 10,7*	NM
	GlcC2-DO3AC11 (GNP(F))	3,4±0,2	7,1±0,9	2,9±0,0	185,4 ± 17,2	NM
	GlcC9-DO3AC11 (GNP(G))	3,2±0,2	7,5±0,6	1,6±0,2	168,7± 7,74*	NM
	GlcC7-DO3AC11 (GNP(H))	4,1±0,2	7,1±0,9	1,6±0,4	143,6± 8,0*	NM
	GlcC3-DO3AC11 (GNP(I))	3,3±0,2	6,3±0,7	1,8±0,1	141,5± 2,5*	NM
	GlcC5-DO3AC11 (GNP(E_2)) ^b	7,0±0,2	11,5±0,1	8,2±0,4	201,9±9,3*	124,9±8,3*
	GalC5-DO3AC11 (GNP(J))	5,0±0,2	8,1±0,3	4,6±0,2	169,1±14,1*	NM
	Gadoterate Meglumine		3,10 ^c /3,5 ^d	2,1±0,4	236,7± 8,3	113,1±2,5

Tabla 5.1: Lista de todas las GNPs estudiadas en este capítulo, incluyendo el porcentaje de gadolinio contenido en cada una. Los valores de relajatividad (r1) a 1,4T y 7T, y de IRC se

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

obtuvieron a 23°C (post-mortem) mientras las medidas *in vivo* a 37°C. a) Lacto= lactosa, gluco=glucosa, galacto= galactosa, malto=maltosa.

C (número) tras la nomenclatura del sacárido: longitud de la cadena carbonada que une el glúcido a la nanopartícula. DOTA= Gd:DO3a conjugado.

C (número) tras DO3A= longitud de la cadena carbonada que enlaza el complejo de gadolinio a la nanopartícula.

Las GNP: A-E fueron sintetizadas por el “método directo”, (“direct synthesis”) mientras que GNP E_1, E_2 y F-J fueron sintetizadas por el “método de intercambio de ligandos”, (“*Ligand Place Exchange synthesis*”) como se esquematiza en la sección 5.2.1.

b) La GNP(E_2) fue obtenida de GNP(E_1) después de una incubación adicional con el complejo DO3AC11-Gd durante 44 horas como se describe en [159].

* $p < 0.05$ versus DOTAREM. a) y b) valores como en [82], b) valores como en [159] y d) [160]

** Valores de IRC (n=9 medidas independientes en 3 animales), medidos en el momento de máximo aumento, dependiendo del AC estudiado.

El agente comercial de IRM DOTAREM (Gadoterate meglumine, Guerbet, Roissy, France) fue usado como referencia para comparación con los resultados obtenidos con las diferentes GNPs.

5.2.1.2 Agentes de contraste negativos

Los agentes de contraste negativos evaluados en este trabajo consistieron en diferentes SPIONs: nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de trietilenglicol

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

(TEG) – o de ácido dimercaptosuccínico (DMSA). Para los SPIONs recubiertos con TEG, se utilizó el método de síntesis que se describe en [161] con ligeras modificaciones, tal como se describe en [162] Las SPIONs recubiertas de DMSA se obtuvieron a través de un intercambio de ligando a partir del SPION recubierto de TEG, como fue descrito en [163]. Estos agentes fueron producidos por el personal del Grupo de Superficies y Partículas Nanoestructuradas del Instituto de Nanociencia de Aragón (NFP-INA), de la Universidad de Zaragoza.

El agente comercial SINEREM (ferumoxtran-10, Guerbet, Roissy, France) fue usado como referencia para comparación con los resultados obtenidos con los SPIONs.

5.2.2 Estudios de relajatividad *in vitro*

5.2.2.1 Estudios a 1,4 T

Se midieron los tiempos de relajación T_1 (longitudinal) y T_2 (transversal) en diferentes disoluciones de GNP (rango de 10 a 0,625 mg/mL de la nanopartícula) en agua MiliQ. Las relajatividades fueron medidas a 23°C y 1,41 Tesla (T) en un equipo Bruker minispec (MQ60) TD-RMN (Bruker Optik, Ettlingen, Alemania), por el personal de LNBCICBiO, (San Sebastian España).

Para las SPIONs, se prepararon 5 disoluciones diferentes en NaCl a 0,9% conteniendo entre 0 y 1 mM de hierro cada una. Las medidas de T_1 y T_2 se llevaron a cabo en un equipo Bruker minispec, MQ 60 (Bruker Optik, Ettlingen, Alemania) a 23°C y 1,41T en el NFP-INA, (Zaragoza, España).

Los valores de T_1 se determinaron utilizando el método de inversión-recuperación (IR) y los de T_2 , utilizando la secuencia Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG). Para los

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

cálculos de T_1 y T_2 , los valores obtenidos fueron ajustados a una curva monoexponencial. Se realizaron tres mediciones independientes de T_1 y T_2 en todas las muestras.

Las relajatividades r_1 y r_2 se obtuvieron a partir de las pendientes de las curvas $1/T_1$ y $1/T_2$ frente a la concentración de Gd^{3+} o Fe expresada en mM.

5.2.2.2 Estudios a 7T

Para este estudio, se utilizaron para las GNP's cuatro soluciones con concentraciones diferentes de estas y Gadoterato de Meglumina en solución salina (NaCl 0,9%). Dichas concentraciones oscilaron entre 0,125 y 1 mM en gadolinio. Se diseñó un *phantom* utilizando tubos capilares inmovilizados en plastilina (diámetro interno del capilar 1,5 mm) para las soluciones de las GNP. Para los estudios con los SPION se utilizaron 4 soluciones diferentes en concentraciones de 0,08 a 0,64 mM en hierro. Se diseñó un *phantom* utilizando tubos plásticos (diámetro interno de 3 mm) posicionados en una espuma de polietileno.

Todos los estudios (relajatividad *in vitro*, estudios *ex vivo* e *in vivo*) se llevaron a cabo en un imán horizontal de 7T (BioSpec 70/30, Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania) instalado en la Plataforma Tecnológica de Aplicaciones Biomédicas de la Resonancia Magnética Nuclear conjunta de la UAB y del Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN). Los experimentos *in vivo* y de relajatividad a 1,4T fueron llevados a cabo a una temperatura de 37°C, mientras los experimentos *ex vivo* y de relajatividad a 7T se realizaron a la temperatura de 23°C, esencialmente con los parámetros ya descritos en el apartado 3.2.2.1.

CAPITULO 3: **Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo***

Todos los estudios se iniciaron con una secuencia ponderada en T_2 (*Rapid Acquisition with Refocused Echoes*, RARE), *echo train length*, 8; campo de vista (FOV), 19,2 x 19,2 mm; matriz (MTX), 128 x 128 (150 x 150 $\mu\text{m}/\text{pixel}$); número de cortes (NS), 14 (coronal) / 7 (sagital) y 5 (axial); grosor de cada corte (ST), 1 mm; espacio entre cortes (*Gap*) 1,1mm; TR/TE, 2000/36ms; número de promedios (NA), 1; tiempo total de adquisición (TAT), 24s.

Después de estas secuencias iniciales para localización de la zona de interés, los estudios de relajatividad (mapas de T_1 y T_2) se llevaron a cabo con los siguientes parámetros:

A) Estudios de relajatividad con las GNPs

Para los mapas de T_1 , se adquirió una secuencia RARE, FOV, 7,0 x 3,5 mm; matriz (MTX), 512 x 256 (13,7 x 13,7 $\mu\text{m}/\text{pixel}$); número de cortes (NS), 1; grosor de cada corte (ST), 1 mm; TE, 30 ms; los TRs utilizados fueron los siguientes: 75 / 150 / 300 / 600 / 1200 / 2400 y 4800 ms; número de promedios (NA), 2; tiempo total de adquisición (TAT), 20min.

Para los mapas de T_2 , se adquirió una secuencia *Multi-Slice-Multi-Echo* (MSME); FOV, 7,0 x 3,5 mm; (MTX), 512 x 256 (13,7 x 13,7 $\mu\text{m}/\text{pixel}$); (NS), 1; (ST), 1 mm; TR, 4800 ms; los TEs utilizados fueron los siguientes: 20 / 40 / 60 / 80 / 100 / 120 / 140 / 160 / 180 / 200 / 220 / 240 / 260 / 280 / 300 / 320 / 340 / 360 / y 400 ms; (NA), 2; (TAT), 1h 16min.

B) Estudios de relajatividad de las SPIONs recubiertas con TEG/DMSA

Para los mapas de T_1 , se adquirió una secuencia RARE, FOV, 30 x 45 mm; (MTX), 128 x 128 (234 x 352 $\mu\text{m}/\text{pixel}$); (NS), 3; (ST), 2 mm; TE, 7,5 ms; los TRs utilizados fueron los siguientes: 300, 500, 900, 600, 1500, 2800, 4200, 8000 y 15000 ms; (NA), 1; (TAT), 34min 24s.

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

Para los mapas de T_2 , se adquirió una secuencia *Multi-Slice-Multi-Echo* (MSME); FOV, 30 x 45 mm; (MTX), 256 x 128 (117 x 352 $\mu\text{m}/\text{pixel}$); (NS), 3; (ST), 2 mm; TE, 8.500 ms; los TRs fueron de acuerdo a la siguiente lista 8,5 / 17 / 25,5 / 34 / 42,5 / 51 / 59,5 / 68 / 76,5 / 85 / 93,5 / 102 / 110,5 / 119 / 127,5 / 136 / 144,5 / 153 / 161,5 / 170 / 178,5 / 187 / 195,5 / 204 / 212,5 / 221 / 229,5 / 238 / 246,5 / y 255 ms; (NA), 1; (TAT), 8min 10s.

Las relajatividades r_1 y r_2 se obtuvieron a partir de las pendientes de las curvas $1/T_1$ y $1/T_2$ frente a la concentración de Gd^{3+} o Fe expresada en mM.

5.2.3 Modelos animales

Los animales utilizados en estos estudios fueron animales control C57BL/6, entre 20-25g de peso. Todos los animales C57BL/6 fueron obtenidos del laboratorio Charles River (Francia) y estabulados en el *Servei de estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)*.

Para los estudios *ex vivo* se utilizó un total de 12 animales (uno por cada AC). Para los estudios *in vivo*, se utilizó un total de 9 animales (n=3 para cada AC).

Las células de glioma de ratón GL261 fueron obtenidas de la misma fuente y utilizadas de la misma manera descrita en la sesión 4.2.1. Los tumores fueron inducidos (n=9) por inyección estereotóxica de células GL261, como se describe en el capítulo 2, apartado 4.2.3.

Todos los estudios fueron llevados a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados por la institución local (comité de ética animal) y la legislación regional (CEEAH 1176 y 1178).

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

5.2.4 Estudios por IRM

Todos los estudios se iniciaron con imágenes en T₂ de alta resolución adquiridas a partir de tres secciones horizontales del cerebro con el objetivo de tener una buena caracterización morfológica del tejido investigado. Para este propósito, se utilizó una secuencia RARE con los siguientes parámetros: FOV, 17,6x17,6 mm; MTX, 256x256 (69x69 µm / pixel), NS, 3, TR / TE: 3000/36 ms, NA; 4, TAT; 4 min 48 s.

5.2.4.1 Estudios *ex vivo*

5.2.4.2 Puesta a punto de las cantidades de AC convenientes para los estudios *ex vivo*.

Las cantidades finales con las que se realizaron los estudios *ex vivo* para cada uno de los AC, tanto positivos como negativos, se establecieron después de realizar ensayos previos con diferentes concentraciones. La finalidad de estos ensayos era encontrar la manera de utilizar la menor cantidad de AC, pero que aún produjera un incremento visible de contraste. Estas pruebas fueron hechas con los agentes comerciales gadoterato de meglumina (para los agentes de contraste positivo) y Ferumoxtran (para los agentes de contraste negativos).

La optimización de los AC positivos se hizo con el método de 1 punto de inyección, esencialmente como se describe en el capítulo 2 sección 4.2.3, mientras que los AC negativos se optimizaron con el método de 3 puntos de inyección (ver apartado 5.2.4.3).

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

Para la evaluación de los AC positivos, se realizó una adquisición de las imágenes ponderadas en T_1 utilizando las mismas secciones axiales descritas previamente (apartado 5.2.2.2). Para ello, se utilizó una secuencia MSME, FOV 17,6x 17,6 mm; MTX, 128x128 (138x138 $\mu\text{m}/\text{pixel}$), TR/TE, 350/8,5 ms; NA, 1, número de repeticiones (NR), 15; TAT, 11 min. Para el análisis de los AC negativos, se adquirieron imágenes ponderadas en T_2 con las mismas secciones axiales descritas en el apartado 5.4.4.2. Para ello, se llevó a cabo una secuencia RARE con: FOV 17,6x 17,6 mm; MTX, 256x256 (69x69 $\mu\text{m}/\text{pixel}$), TR/TE, 4000/12 ms, NA, 1, (NR), 1; TAT, 3 min 12 s.

Antes de la adquisición de estas secuencias, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico intraperitoneal (200 mg/kg), y luego inmovilizados sobre un soporte estereotáxico. La administración de contraste se realizó por inyección estereotáxica, de la misma manera que la generación de tumores descrita en el capítulo 2 apartado 4.2.3., excepto que la suspensión celular se sustituyó por la solución del agente de contraste a ser evaluado.

Los AC utilizados para los estudios *ex vivo* se disolvieron en solución salina (NaCl al 0,9%), teniendo en cuenta la estimación de gadolinio o contenido de hierro previamente determinado (Tablas 5.1 y 5.2), con el fin de lograr soluciones de las concentraciones necesarias del metal deseado. La cantidad utilizada finalmente para cada animal fue de 5 nmol de Gd que se disolvieron en 4 μl de solución salina (en caso de los ACs positivos) y 8,2ng de hierro disueltos en 4 μl de solución salina (en caso de los ACs negativos). Una solución comercial de gadoterato de meglumina fue utilizada como referencia para comparar el incremento de contraste obtenido con las GNPs y un AC comercial basado en óxido de hierro (Ferumoxtran -10 ® Guerbet, Roissy, Francia) fue utilizada como referencia para las SPIONs. Estos datos fueron corroborados mediante mediciones de incremento de contraste de cada uno de los

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

slices que formaban parte del tumor, haciendo un promedio de los valores obtenidos y los resultados fueron muy similares.

Agente de contraste	Fe (mg/ml) n=1	Relajatividad (s ⁻¹ mM ⁻¹) r2 a 1,4T n=3	Relajatividad (s ⁻¹ mM ⁻¹) r2 7,0T n=3	% IRC ex vivo n=3
Ferumoxtran-10	21	66,1 ± 0,3	63,5±16,2	-31,8 ± 5,4
TEG (SPION1)	0,91	48,0±0,7	67,7±4,2	-39,3 ± 11,0
DMSA (SPION2)	0,72	119,6±2,5***	15,2±2,6**	-38,7 ± 8,2*

Tabla 5.2: Lista de todos los SPIONs utilizados en esta tesis y su respectiva concentración en hierro. Valores de relajatividad a 1,4T y 7T e IRC obtenido con las medidas *ex vivo*.

* p<0.05 versus Ferumoxtran

**p<0.05 versus TEG and Ferumoxtran

***p<0.05 versus TEG

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

5.2.4.3. Puesta a punto del método de tres puntos de inyección:

Inicialmente, se llevaba a cabo únicamente un solo punto de inyección en cada animal, de modo que para obtener n=3 para cada agente de contraste, se recurría a la utilización de muchos animales. Para tratar de reducir este número, se puso a punto el método de inyección de tres puntos consecutivos a lo largo de la línea media, que luego se utilizó de manera regular para los diversos AC.

Los 3 puntos de inyección en cada lado se administraron con las siguientes coordenadas en mm de Bregma: a) -2,32 X, -0,10 Y, -3,85 Z, b) -2,32 X, -1,50 Y, -3,85 Z, C) -2,00 X, -4,5 Y, -3,85 Z. Todo el proceso de inyección del AC *ex vivo* realizó en 15 minutos.

5.2.4.4 Estudios *in vivo*

Los animales fueron anestesiados con isoflurano al 0,5-1,5% en O₂, y se mantuvo su frecuencia respiratoria entre 40-60 respiraciones por minuto. La temperatura corporal se mantuvo entre 36,5-37,5 °C con un sistema de recirculación de agua incorporado en la cama de los animales, y se midió con una sonda rectal. La frecuencia respiratoria y la temperatura fueron monitorizadas constantemente (PC-SAM Instruments, Inc., Nueva York, EE.UU.). Antes de la introducción del animal en el escáner, cada ratón se canuló en la vena de la cola con una cánula construida con un sistema de distribución múltiple con tubos de polietileno. En este caso, una aguja de 20-30G se conectó a través de tubos de polietileno, a 2 jeringas independientes de 1 ml (Becton-Dickinson, SA, Madrid, España) cargados con solución salina heparinizada (40 U/ml heparina) y un agente de contraste (9,7 mM en Gd). El agente de contraste se inyectó en forma de

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

un “bolus” (76±6µl, aproximadamente 0,04 mmol / kg) durante los estudios dinámicos DCE. Tres ratones con tumor GL261 recibieron gadoterato de meglumina y otros seis recibieron cada una de las GNPs escogidas: GlcC5-DO3AC11 (GNP(E) n=3) y GlcC5-DO3AC11 (GNP(E_2) (n=3).

El estudio T₁ DCE se realizó utilizando las mismas tres secciones descritas para las secuencias de alta resolución T₂ en los estudios *ex vivo*. Para ello, una secuencia MSME fue usada con: MTX, 128x128 (138x138 µm/ pixel), TR / TE, 200/8,5 ms; NA, 2, (NR), 41, TAT, 35min. El “bolus” de contraste se administró después de la tercera repetición de la secuencia T₁ (aproximadamente 2,5 minutos después del comienzo del protocolo de adquisición de la imagen).

5.2.5 Post procesamiento

El procesamiento y post-procesamiento de las imágenes de los estudios *ex vivo* T₁ y T₂ se llevó a cabo con *software* de Bruker Paravision (versión 4.0) y el programa ImageJ 1.44p (*National Institutes of Health, EE.UU.*). Las regiones de interés (ROIs) fueron definidas manualmente después de la inspección visual, tanto en el área de máximo contraste como el área equivalente del parénquima contralateral. La intensidad de señal IRM se midió en el sitio de inyección y se comparó con la zona contralateral del parénquima en cada caso. Estos valores se han utilizado para los cálculos de IRC (ver ecuación 5.1). Sólo se midió el corte donde se observó un mayor aumento de contraste.

$$IRC(\%) = \left(\frac{S(i)}{S(c)} \right) \times 100 \quad \text{eq.5.1}$$

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

Donde S(i) es la señal de la región “ipsilateral” donde se administró el contraste y que muestra visualmente el mayor aumento de contraste, y S(c) es la señal de la región contralateral equivalente, que sirve como control y que se define como 100%.

Procesamiento de los datos de los estudios *in vivo*:

Los datos de DCE-IRM fueron procesados utilizando una plataforma para el análisis farmacocinético desarrollado recientemente en el marco del programa intramural PROGLIO y PROGLIO 2 (CIBER-BBN) utilizando *Interactive Data Language* (IDL) (ITT *Visual Information Solutions, Boulder, CO, USA*) y que se encuentra disponible para descargar en <http://www.die.upm.es/im/archives/DCEurLAB/>. Esta plataforma fue desarrollada por el Grupo de Investigación de Tecnología de Imágenes Biomédicas de la Universidad Politécnica de Madrid (BIT-UPM). Los mapas de codificación en color para DCE se calcularon para cada píxel, midiendo la relación entre el aumento máximo de señal de este y su intensidad promedio antes de la inyección del bolus de AC. De esta manera, en las series temporales se cuantifica el aumento de contraste promedio dentro de los tumores y, los mapas traducen el máximo aumento de contraste en cada píxel de la ROI en el momento de máximo aumento de IRC. Los mapas de IAUC (*initial area under the curve*) se generaron por la integración de las curvas dinámicas durante los primeros 150 segundos después de la administración del agente de contraste, tal como fue descrito en [164,165] pero sin la normalización a un valor de referencia de IAUC.

El parámetro k_{ep} (tasa de lavado entre el espacio extracelular y el plasma) (Eq. 5.2) fue calculado de acuerdo al modelo de “Hoffmann-Brix” [166].

$$\frac{S(t)}{S(0)} = 1 + Ak_{ep} \frac{(e^{-k_{ep}t} - e^{-k_{el}t})}{k_{ep} - k_{el}} \quad \text{eq. 5.2}$$

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

Siendo k_{el} la velocidad de eliminación del agente de contraste por el plasma. Por lo tanto, la pendiente inicial de la curva a tiempos cortos después de la inyección, es proporcional a $A \times k_{ep}$ señal de multiplicación. El valor "A" representa la pendiente de subida inicial de la curva de DCE.

Para cada animal, y cada corte, las regiones de interés se definieron manualmente alrededor del tumor. La resolución de los datos se redujo de 128 x 128 a 64 x 64 píxeles y los mapas de intensidad de colores para IRC, IAUC y k_{ep} se generaron dentro de estos ROIs. Esto ayudó a mejorar la exactitud de las estimaciones hechas con el modelo de "Hoffmann-Brix", mientras la mayoría de los valores experimentales que no se ajustaban bien a este modelo se filtraron por la definición de los umbrales para la desviación estándar ($<0,2$) y para el error medio ($<1,5$) del ajuste. Los valores que sobrepasaban dicho umbral fueron descartados del análisis. El análisis estadístico dentro de las regiones del tumor en cada corte se realizó con SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.). Un total de 836, 761 y 699 píxeles fueron analizados en los animales estudiados durante la inyección de Gadoterato de Meglumina y de la GNP(E) y GNP(E_2), respectivamente.

5.2.6 Análisis estadístico

Los cambios de señal observados en las imágenes de los estudios *ex vivo* con los distintos ACs fueron medidos en los ROIs definidos en las imágenes ponderadas en T_1/T_2 (dependiendo del AC en cuestión), para cada GNP/SPION y fueron comparados con Gadoterato de Meglumina, Ferumoxtran-10 (según el AC) y solución salina.

Para los estudios *in vivo*, las mediciones del mismo animal, pero correspondientes a diferentes cortes de la imagen fueron considerados como mediciones independientes

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

(total de n= 9 para cada AC). El incremento de contraste promedio en la ROI dentro de los tumores también se comparó entre los animales inyectados con diferentes agentes de contraste.

Para ambos estudios, en un primer paso se analizó la distribución de los datos en cada grupo por el test de Kolmogorov-Smirnov (comparando la distribución obtenida con la distribución normal). La homogeneidad de la varianza se analizó utilizando el test de Levene. Los test “t” de Student para muestras independientes se utilizaron para el análisis estadístico cuando los datos obtenidos siguieron una distribución normal (gaussiana). Si los datos no presentaban una distribución normal, se optó por un test no paramétrico (“U” Mann-Whitney) para el análisis estadístico. El nivel de significación para todas las pruebas fue de $p < 0,05$.

5.2.7 Estudios de Biodistribución

Se llevaron a cabo experimentos de biodistribución de dos tipos: animales sin tumor (wt) en tres puntos temporales, y luego animales con tumor en un solo punto temporal, como se muestra en la tabla 5.3.

Tipo de animal	Concentración GNP [mM]	Puntos temporales	Muestras recogidas
wt n=3	9,7 mM en Gd	1h, 48h, y 14 días post-administración de contraste	Bazo, hígado, riñón pulmón y plasma
Con tumor n=3	9,7 mM en Gd	24h, post-administración de contraste	Tumor, parénquima cerebral contralateral y plasma

Tabla 5.3: Descripción del tipo de animal, concentración de la GNP en el volumen que se inyectó, puntos temporales analizados y muestras recogidas para los estudios de biodistribución realizados.

CAPITULO 3: **Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo***

Estos estudios fueron realizados en colaboración con el *Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biología Molecular en nanomedicina (CIBBIM-nanomedicine), Hospital Universitari Vall d'Hebron*.

Estudios llevados a cabo:

1) Estudios IRM llevados a cabo antes de la administración de la GNP, y en los puntos temporales mencionados en la tabla 5.3: Estos estudios se empezaron con imágenes ponderadas en T_2 que fueron adquiridas en el plano axial del cuerpo del ratón con el fin de obtener una buena caracterización morfológica de los tejidos investigados. La secuencia usada para este propósito fue una secuencia RARE con los siguientes parámetros: MTX, 256x128 (0,31x0,31 mm/pixel), NS, 16; TR/TE, 2000/36 ms; NA, 2, TAT, 48 s.

El IRC obtenido fue medido con imágenes ponderadas en T_1 usando una secuencia MSME con los siguientes parámetros: MTX, 256x128 (0,31x0,31mm/pixel), NS, 10; TR/TE, 350/10 ms; NA, 4, TAT, 2 min 59 s, que se adquirió antes y después de la administración de contraste en cada punto temporal.

2) Biodistribución de las GNPs por ICP-MS: Después de ser analizados por IRM los puntos temporales, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los tejidos descritos en la tabla 5.3 recogidos. De igual manera, fueron recolectadas muestras de orina y plasma que fueron almacenadas a -80°C . Las muestras fueron analizadas para contenido de oro y Gadolinio por *Induced Coupled Plasma-Mass Spectrometry* (ICP-MS) en la Unidad de Técnicas Científicas de la Universidad de Barcelona.

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

5.3 RESULTADOS

Los estudios de IRC *ex vivo* y los estudios de relajatividad *in vitro* a 1,4T fueron llevados a cabo para todas las GNPs, mientras que los estudios de relajatividad *in vitro* a 7T y los análisis *in vivo* se limitaron a los compuestos que mejores resultados presentaron en los AC de tipo positivo.

5.3.1 Estudios de relajatividad *in vitro*

Los valores relajatividad r_1 , para los agentes de contraste positivos tanto a 1,4T como a 7T, se muestran en la tabla 5.1. Como se esperaba, la r_1 disminuye con el aumento del campo magnético [167] El valor obtenido para Gadoterato de Meglumina a 7T *in vitro* concuerda con los valores obtenidos de la literatura *in vivo* encontrados para Gd-DTPA a 6,3T aunque a temperaturas ligeramente distintas [168]. Para los valores de relajatividad, se observaron algunos valores discrepantes al comparar los resultados en el 7,0 y 1,4T (Tabla 5.1). Tomemos como ejemplo la GNP(F) vs GNP(G): ambas tienen valores de relajatividad muy similares a 1,4T y sin embargo, el valor obtenido para la relajatividad a 7,0T con la GNP(G) es la mitad del valor obtenido para la GNP(F), siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Los valores de r_2 a 1,4T y 7T para los ACs de tipo negativo se muestran en la tabla 5.2. El valor obtenido para Ferumoxtran-10 a 1,4T *in vitro* concuerda con el valor

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

obtenido en la literatura en estudios *in vitro* ($65 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) a la misma temperatura [169]. La variación de los valores de relajatividad r_2 obtenidos para las muestras de SPIONs con respecto al valor para Ferumoxtran-10 se pueden explicar por la variación en el diámetro medio de agregado de TEG (15nm) y DMSA (30nm), en comparación con el diámetro descrito en la literatura para el Ferumoxtran-10 (20nm) [86]. Como sería de esperar, el aumento del diámetro de los agregados de SPIONs aumenta notablemente el valor r_2 , pasando de 48,6 a 179,3 s.mM^{-1} , lo que coincide con los resultados previamente reportados por Muller *et al* [170], en relación a la correlación entre el valor de relajatividad de los agentes de óxido de hierro y el diámetro de sus agregados.

5.3.2 Análisis de IRC en los estudios *ex vivo*

5.3.2.1 Puesta a punto de la cantidad óptima de AC

En las pruebas realizadas para hallar la cantidad de AC que nos permitiera utilizar la menor cantidad posible en los experimentos *ex vivo*, pero que aún produjera un incremento visible de contraste, para los AC positivos, la cantidad óptima fue 5nM de Gd (figura 5.2) y para los agentes negativos 0,0082 μg de Fe (Figura 5.2B). Concentraciones inferiores de dichos AC, sobre todo de los AC negativos, produjeron resultados incorrectos y un IRC demasiado bajo en relación al contralateral.

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

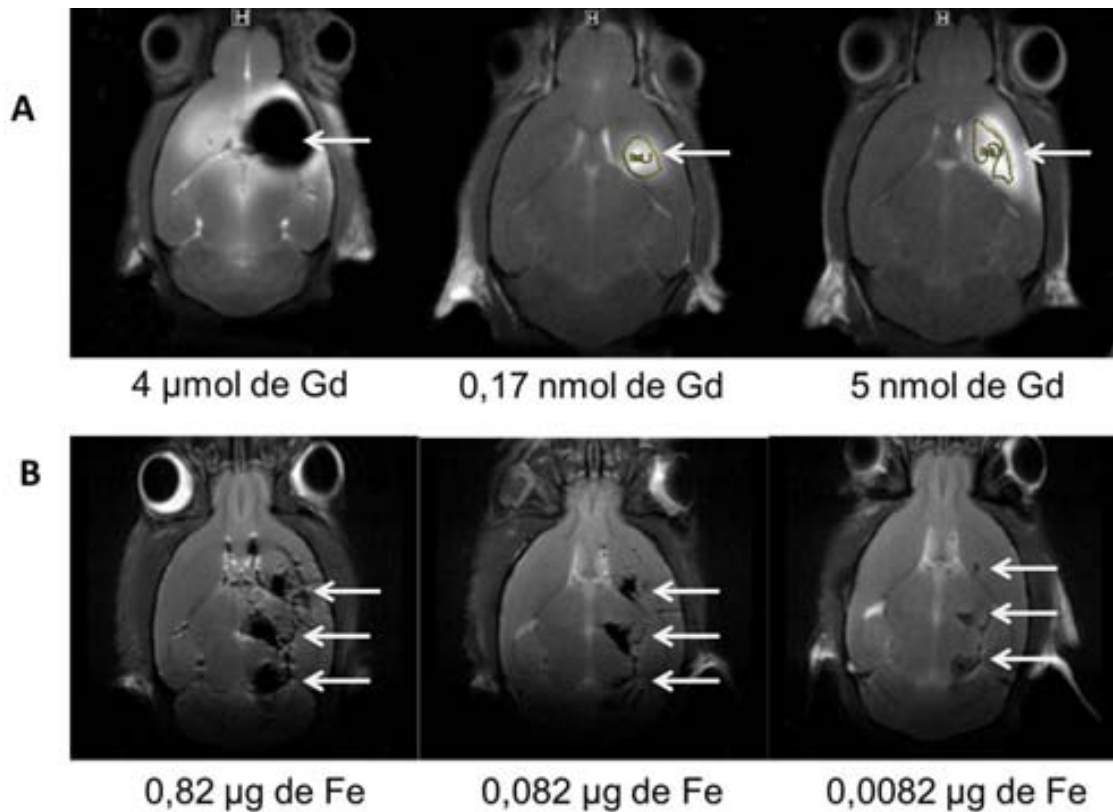


Figura 5.2: Ensayos de puesta a punto con diferentes cantidades de AC en los ensayos *ex vivo*. A) AC de tipo positivo (Gadoterato de Meglumina) y B) AC de tipo negativo (Ferumoxtran - 10). Las cantidades usadas en la inyección del agente se indican en el pie de cada imagen.

Para los AC negativos se realizaron pruebas con dos agentes de contraste de uso comercial el Ferumoxtran -10 y el Endorem. Se estudiaron estos agentes a diferentes concentraciones de Fe y se comparó con la zona contralateral y el aire (figura 5.3). El valor finalmente escogido para estos agentes de contraste fue el de 0,0082 μg de Fe ya que fue la concentración óptima en el punto de inyección que permitió valorar los cambios en el comportamiento de los AC. Además, esta concentración fue estadísticamente distinta de la señal contralateral y de la señal proveniente del aire.

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

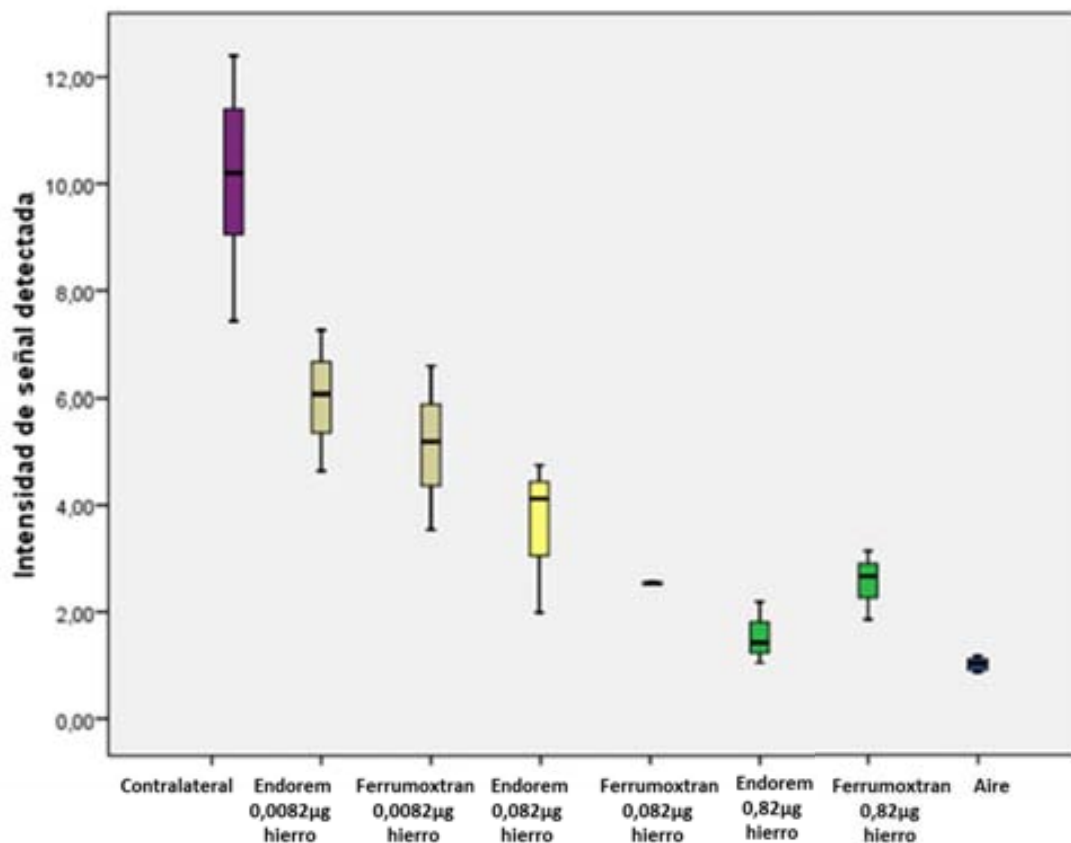


Figura 5.3: *Boxplot* con la comparación de la intensidad de señal detectada en las imágenes MRI ponderadas en T_2 para cada concentración utilizada de los agentes comerciales Endorem y Ferumoxtran -10, la parte contralateral a los puntos de inyección, y del aire. Todos los puntos con $n=3$.

5.3.2.2 Puesta a punto en los experimentos *post-mortem* de los 3 puntos de inyección

La optimización del protocolo basado en los 3 puntos de inyección se realizó con éxito, resultando en una disminución del número total de animales utilizados para evaluar un AC. La figura 5.4 muestra un ejemplo con el AC Gadoterato de Meglumina. El IRC promedio en el punto de inyección en relación a la señal contralateral ($141,2 \pm 8$ en un punto por animal y $139,34 \pm 0,4$ en 3 puntos por animal) no presenta diferencias

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

significativas $p=0,095$. Sin embargo por los valores se encuentra bastante cercano a significación.

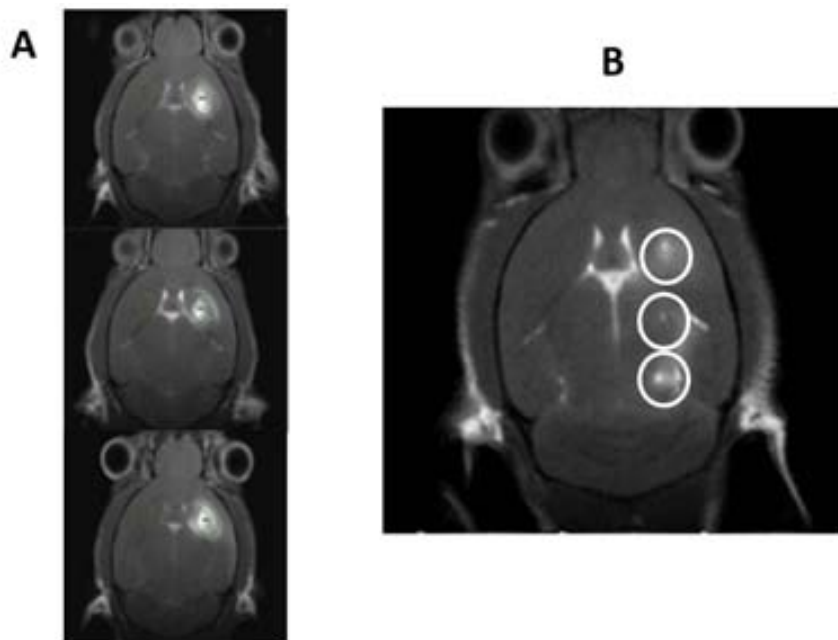


Figura 5.4: Imágenes ponderadas en T_1 , con el agente de contraste gadoterato de Meglumina (5nM). A) un punto de inyección por animal, B) tres puntos de inyección por animal.

A partir de esta puesta a punto, los siguientes estudios con AC se llevaron a cabo con el método de tres puntos de inyección.

- Agentes de contraste positivos

En la (figura 5.5A), se muestra una imagen representativa ponderada en T_1 para la GNP(E), así como los ROIs seleccionados para el análisis de IRC (expansión en (B)). El aumento de contraste obtenido con este método varía claramente dependiendo de la GNP estudiada, lo que queda reflejado por la variabilidad observada en los *boxplots* (figura 5.5C). Todas las GNPs estudiadas, excepto la GNP (E) mostraron valores de IRC significativamente más bajos de incremento de contraste, en comparación con el Gadoterato de Meglumina ($236,7 \pm 14,4\%$ con respecto al IRC contralateral) con

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

excepción de GNP(F), que fue inferior, pero de forma no significativa. La GNP(E), preparada por el “método directo” muestra el aumento de contraste más elevado ($305,7 \pm 32,8\%$). Si se tiene en cuenta la estructura de los distintos AC positivos (ver tabla 5.1), el uso de la glucosa como glúcido en la GNP, cuando se utiliza una cadena de longitud C5 para este ligando, parece proporcionar el mejor valor para contraste positivo, siempre que la cadena para el ligando de DO3A sea de longitud C11. Aparte de esto, para un mismo AC el método "directo" de síntesis (GNP (E)) parecía producir un mejor resultado que el método de intercambio de ligandos LPE (GNP (E_1) y GNP (E_2)).

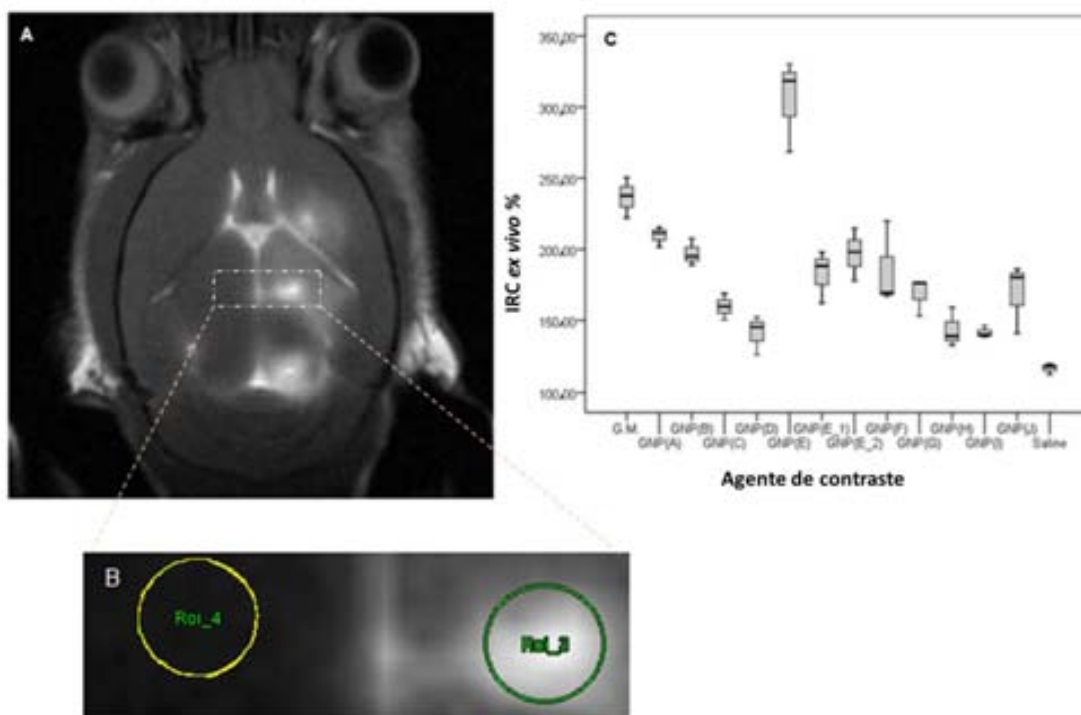


Figura 5.5: A) Imagen representativa ponderada en T_1 y ejemplo de los ROIs utilizados (dibujados manualmente como círculo, verde (ipsilateral) y amarillo (contralateral)) para la cuantificación del incremento de señal observado con la GNP (E). B) Expansión de la región central (rectángulo de líneas blancas discontinuas), C) *Boxplot* del incremento relativo de contraste para la solución salina, gadoterato de meglumina (G.M.) y las diferentes GNPs, de los

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

ROIs obtenidos para cada uno de los AC estudiados. EL IRC fue calculado usando la ecuación 5.1 (ver también tabla 5.1).

Agentes de contraste negativos

La figura 5.6 muestra una imagen representativa ponderada en T_2 para los SPIONs estudiados, así como los ROIs seleccionados para el análisis. Se detectaron cambios significativos (aunque no muy elevados) entre el efecto de los SPIONs DMSA y Ferumoxtran-10 (figura 5.6 y tabla 5.2). Esto no fue observado para el SPION TEG, posiblemente debido a la alta variabilidad de los valores obtenidos.

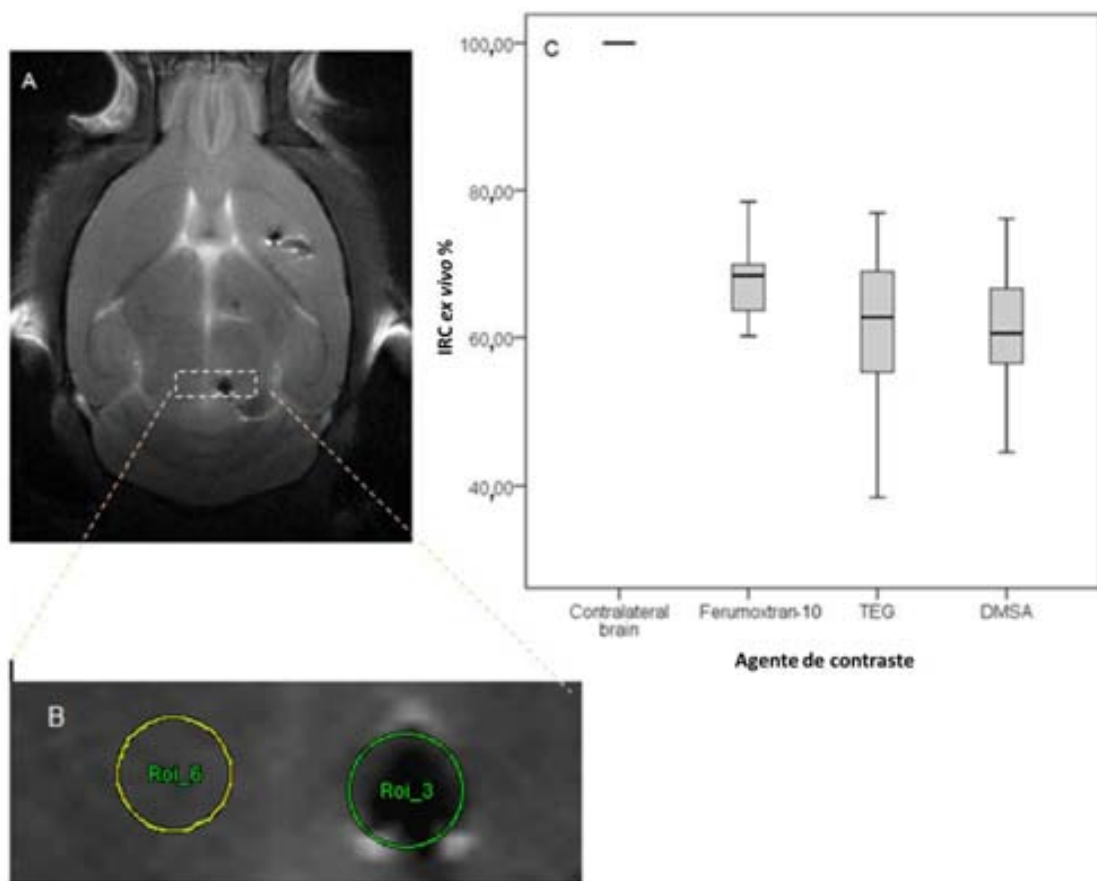


Figura 5.6: A) Imagen representativa ponderada en T_2 y ejemplo de los ROIs usados (dibujados manualmente como círculo, verde (ipsilateral) y amarillo (contralateral) para la

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

disminución de señal de los SPION B) Expansión de la región central (rectángulo de líneas blancas discontinuas) C) *Bloxplot* de la variación de contraste para los SPIONs.

5.3.3 Estudios de IRM *in vivo*

Los estudios de IRM demostraron, como sería predecible, la presencia de tumor 10 días después de la inoculación de las células GL261 (figura 5.7) con un tamaño comparable al de estudios previos del grupo ($18 \pm 5 \text{ mm}^3$). Uno de los hallazgos más consistentes en los tumores fue la captación de contraste en imágenes ponderadas en T_1 después de la administración de contraste. En este caso, todos los agentes de contraste evaluados *in vivo* (Gadoterato de Meglumina, GNP(E) y GNP(E_2)) mostraron un aumento de contraste en las imágenes ponderadas en T_1 . (Figura 5.7: T_1 -ref vs T_1 -max, y figura 5.8).

La GNP(E) mostró un incremento de contraste significativamente ($p < 0,001$) mayor en los tumores GL261 ($123,8 \pm 3,8\%$) en comparación con gadoterato de meglumina ($113,1 \pm 2,5\%$). Esto puede ser claramente observado en la figura 5.7 que muestra las cuantificaciones (IRC) obtenidas a partir de las imágenes ponderadas en T_1 . Las diferencias fueron estadísticamente significativas en el tiempo de máximo incremento de contraste, T_1 -max ($p < 0,001$). Además, el resultado de la GNP(E_2) también fue significativamente mejor a T_1 -max que con el gadoterato de meglumina, con diferencias significativas con respecto a la GNP(E) ($p < 0,001$). Debe también señalarse que el tiempo de aumento máximo (aproximadamente 8,3 min, figura 5.8) fue claramente más largo para la GNP(E_2) que para la GNP(E) y gadoterato de meglumina (aproximadamente 3 min).

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

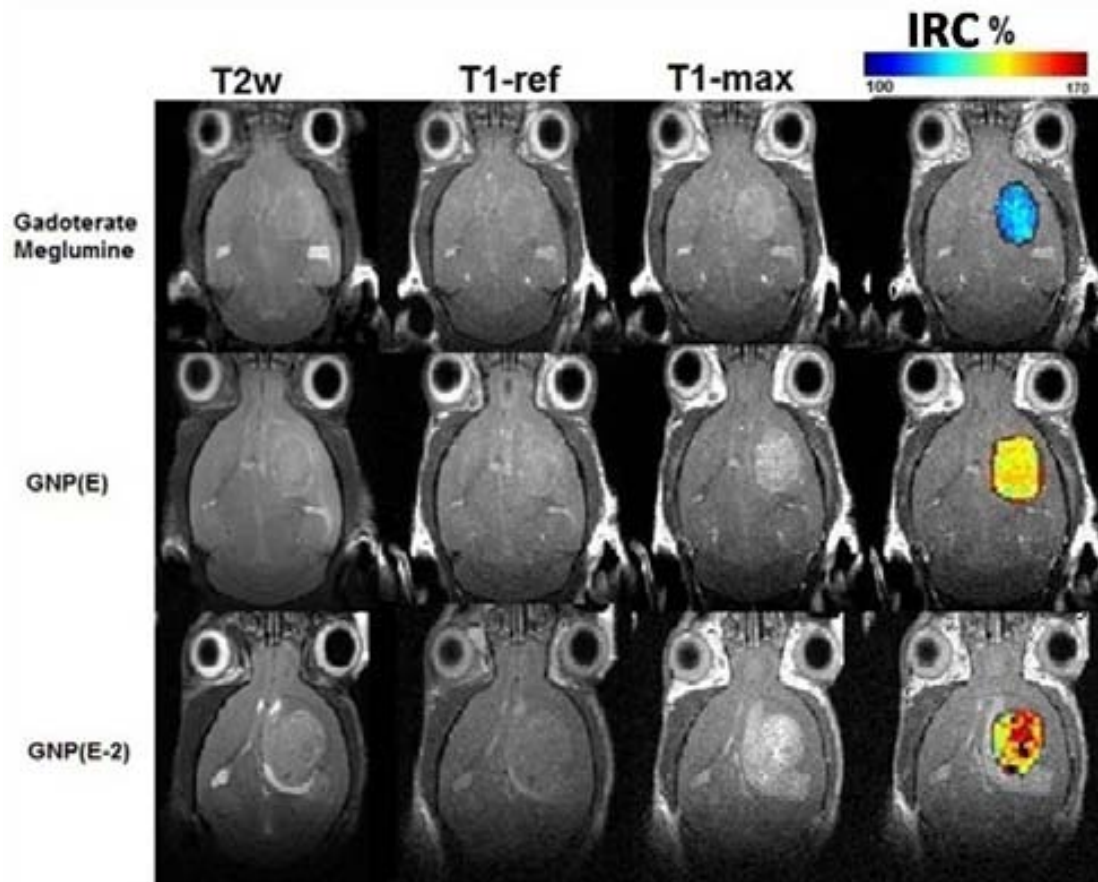


Figura 5.7: De izquierda a derecha, imágenes representativas axiales ponderadas en T_{2w} , imagen ponderada en T_1 antes (T_{1-ref}) y después de la administración de contraste, en el punto máximo de captación de contraste, (T_{1-max}), y mapas codificados en color para el IRC de 3 animales inoculados con células GL261. La barra codificada en color en la parte de arriba muestra el rango de IRC medido en dichas imágenes. Los píxeles negros en las imágenes de la columna de la derecha corresponden a casos con valores encima o debajo del umbral establecido (los límites establecidos para el post-procesamiento de las imágenes para estudio IRC% se describen en métodos, sección 5.2.5).

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

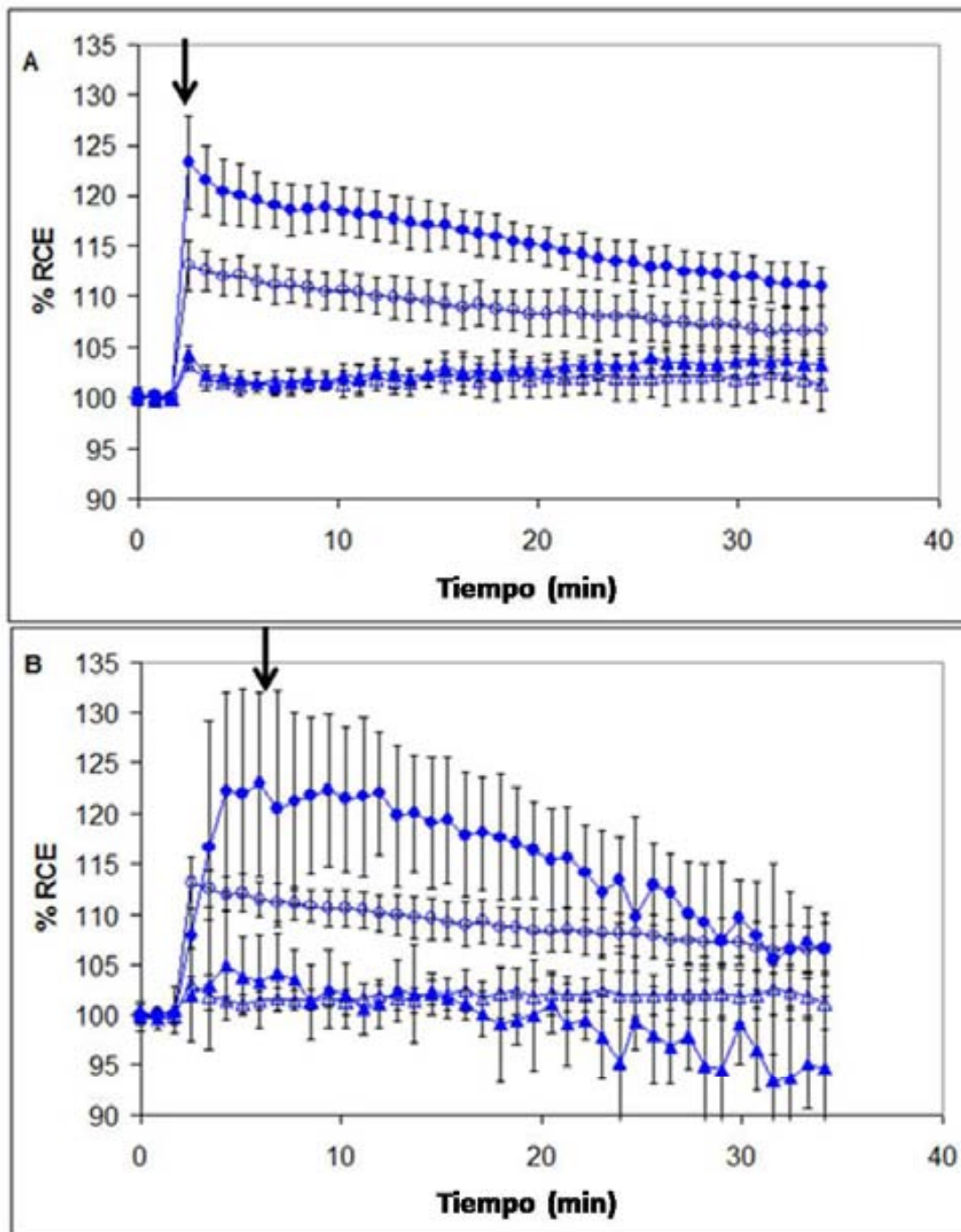


Figura 5.8: Series temporales obtenidas a partir de la cuantificación de las imágenes DCE. Las curvas muestran el incremento de contraste promedio obtenido para cada grupo experimental. A) gadoterato de meglumina (símbolos sin rellenar); GNP(E) (símbolos rellenos). B) gadoterato de meglumina (símbolos sin rellenar); GNP(E_2) (símbolos rellenos). Los círculos corresponden a los valores medidos en los tumores, mientras los triángulos corresponden a la

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

zona contralateral. Los resultados corresponden a los datos obtenidos a partir de 3 animales por grupo y 3 secciones analizadas por animal, lo que significa n=9 mediciones independientes por grupo. Las flechas indican el tiempo de incremento máximo de contraste medible en la imagen.

Otros Parámetros biofísicos

La tabla 5.4 y la figura 5.9 muestran el resumen para el IRC *ex vivo*, *in vivo*, K_{ep} y IAUC para el gadoterato de meglumina y los 2 AC positivos que fueron evaluados en todos los estudios desde *in vitro* a *in vivo*.

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

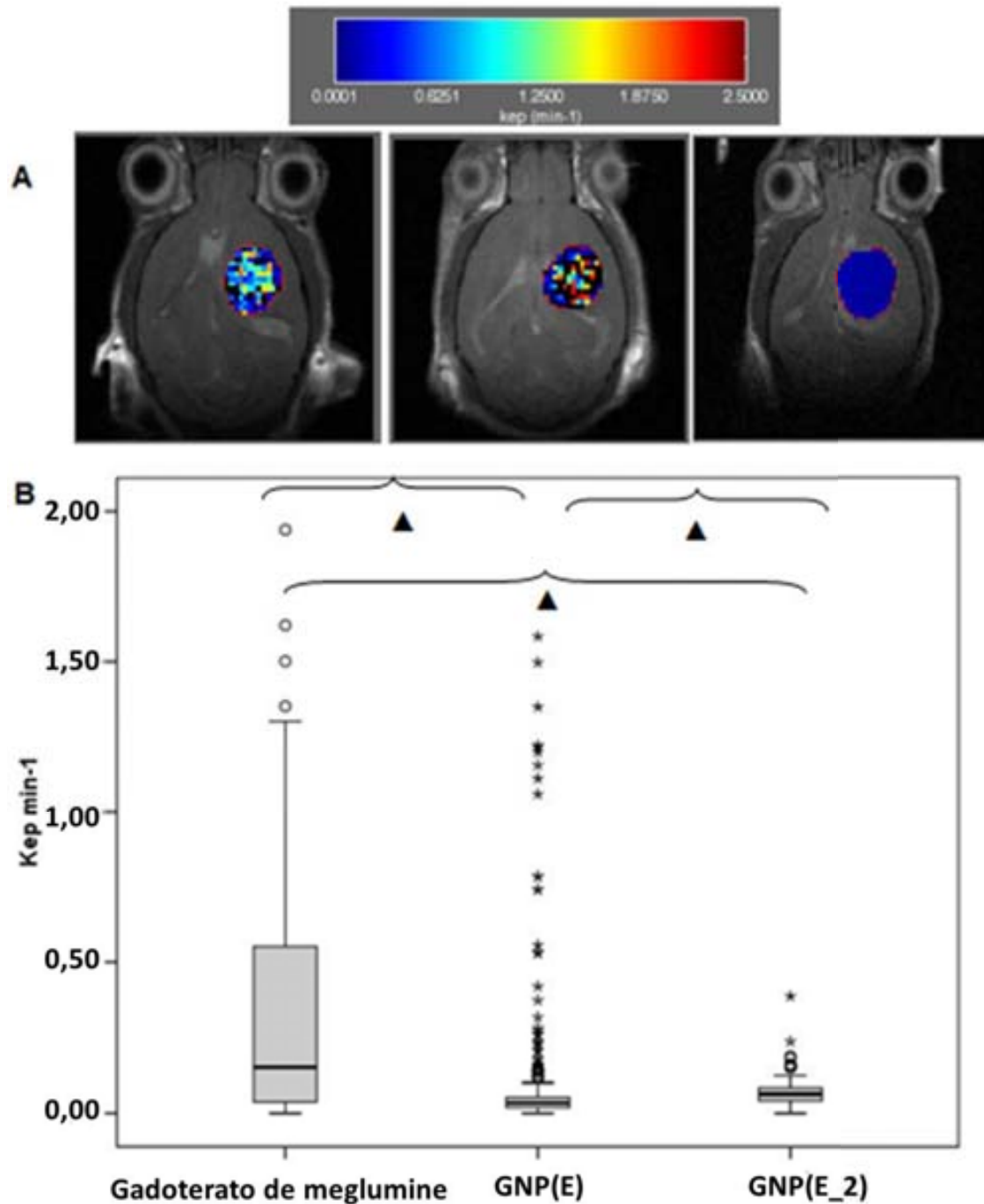


Figura 5.9: A) Imágenes ponderadas en T_1 , superpuestas con mapas de color de K_{ep} en tres ratones portadores de glioma GL261. De izquierda a derecha: gadoterato de meglumina, GNP(E) y GNP (E_2). Los píxeles negros corresponden a casos con valores encima o debajo de los límites establecidos para el ajuste de K_{ep} (ver sección 5.2.5). Las escalas de color en la parte de arriba muestran el rango de valores encontrados para K_{ep} en cada caso así como la

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

codificación de dichos colores. B) *Blospot* de comparación de los valores de K_{ep} (min^{-1}) obtenidos con todos los pixels de los animales estudiados utilizando los mismos agentes de contraste mostrados en A). Las diferencias significativas ($p < 0,05$) están marcadas con triángulos.

AC	% IRC <i>ex vivo</i>	% IRC <i>in vivo</i> a $T_{1\text{-max}}$	% IRC <i>In vivo</i> a 3min	K_{ep} (min^{-1})	IAUC
Gadoterato Meglumina	236,7±14,4	113,1±2,5	113,1±2,5	0,32±0,36	2,8±0,1
GNP(E)	305,7±32,8*	123,8±3,8*	123,2±1,5*	0,07±0,18*	3,1±0,2*
GNP(E_2)	201,9±16,1 [§]	124,9±8,3*	107,9±2,0* [§]	0,06±0,03* [§]	2,6±0,2* [§]

Tabla 5.4: IRC *ex vivo*, IRC *in vivo* a $T_{1\text{-max}}$ de cada AC y a 3 min post-administración, valores de K_{ep} y IAUC obtenidos con estudios *in vivo* de los 3 AC positivos estudiados *in vitro*, *post-mortem* e *in vivo*.

* $p < 0,05$ en comparación con Gadoterato de meglumina.

§ $p \leq 0,05$ en comparación con GNP(E).

5.3.4 Estudios de biodistribución

Ensayos con animales sin tumor: GNP(E)

Analizando las gráficas de los estudios ICP-MS de la GNP(E) se encontró un aumento de señal en la vejiga del ratón tras 1 hora post-administración de la GNP, que desaparece completamente 48 horas post-administración (Figura 5.1) indicando la rápida eliminación vía renal del quelato de Gd.

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

En cuanto a la cuantificación por ICP-MS de Gd y Au contenidos en la orina, hígado riñones y plasma, la mayor fracción de estos elementos se encuentra en la orina aunque no muestren la misma distribución. Comparativamente, más Gd es excretado a través de la orina mientras que el Au parece acumularse en el hígado, figura 5.10.

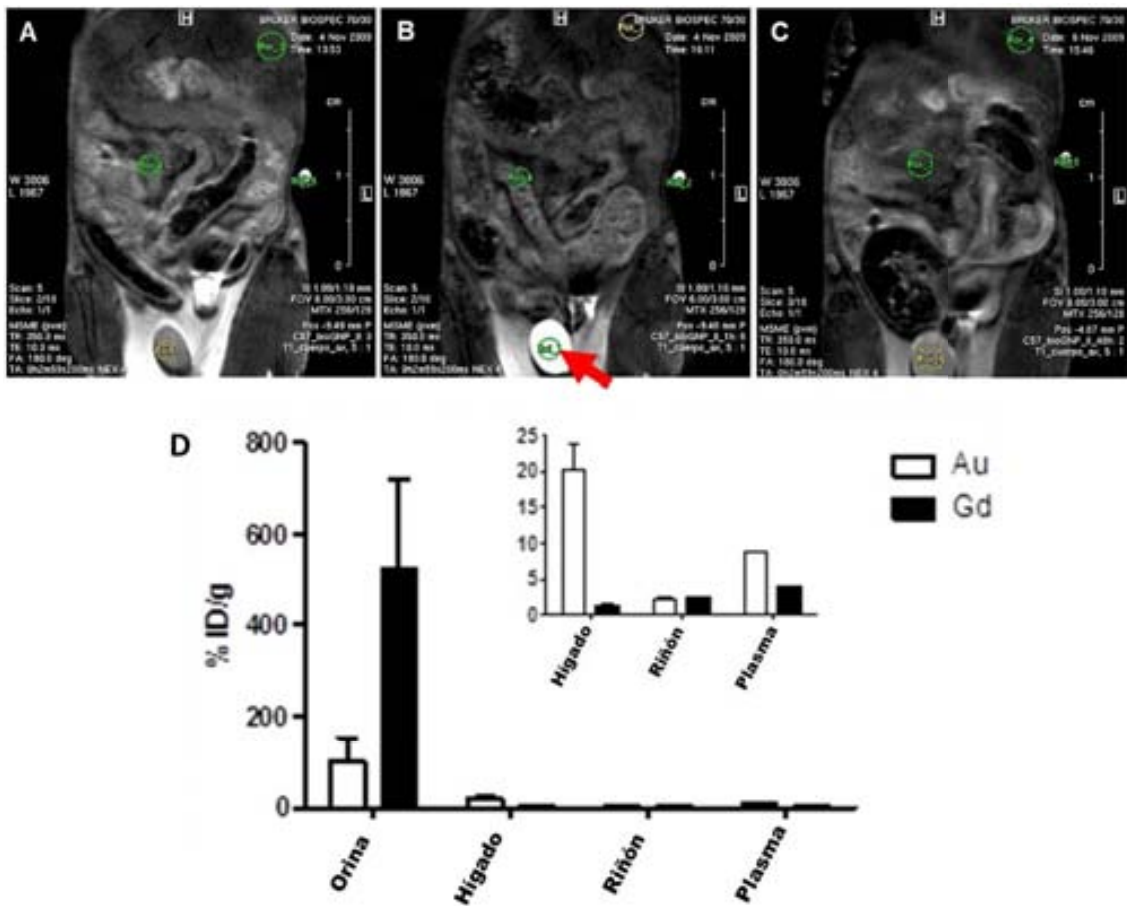


Figura 5.10: Biodistribución evaluada por IRM y ICP-MS de la GNP(E). Imagen ponderada en T_1 del cuerpo de uno de los animales estudiados, cabeza arriba, cola abajo. A) Antes de la inyección de la GNP(E), B) 1h después de la administración, C) 48h después de la administración. Los distintos ROIs fueron dibujados en diferentes partes del cuerpo del ratón: vejiga (flecha roja), hígado, intestinos y también una región externa cuerpo (aire). Las imágenes muestran un claro aumento de la señal debido al efecto del gadolinio sobre la relajatividad del agua en la vejiga (flecha roja en B) tras 1h de la administración de la GNP(E),

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

que desaparece completamente 48h post-administración. D) Cuantificación por ICP-MS de Gd y Au contenido en la orina, hígado riñones y plasma, ID, dosis inicial.

Ensayos con animales portadores de tumor: GNP(E) y GNP(E_2)

Los estudios con AC positivos *in vivo* fueron complementados con ICP_MS de las muestras recogidas de dichos animales donde se midió el contenido de Au en el tumor y en el parénquima contralateral (figura 5.11). Los ensayos de biodistribución para las GNPs 24h después de su administración demostraron que los tumores de los animales administrados con GNP(E) y GNP(E_2) acumulan al menos 10 veces más agente de contraste que el lado contralateral, y cerca de dos veces más cantidad que en la sangre circulante, posiblemente debido al efecto de retención de contraste nanoparticulado en los tumores [171] (figuras 5.11 y 5.12).

Es importante mencionar que para ambas GNP(E) y GNP(E_2) fueron llevados a cabo análisis de parámetros bioquímicos, de monitorización renal y función hepática (incluyendo glucosa, proteínas totales, albumina, creatina, urea, bilirrubina total, aminotransferasa aspartato (AST) y aminotransferasa alanina (ALT)) en las muestras obtenidas de los ratones administrados con esas GNPs, así como un completo estudio histopatológico 24h y 14 días post-administración. No fueron encontrados cambios significativos en comparación con los ratones control (sin administración de GNP), indicando que estas GNPs no son tóxicas para los animales.

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

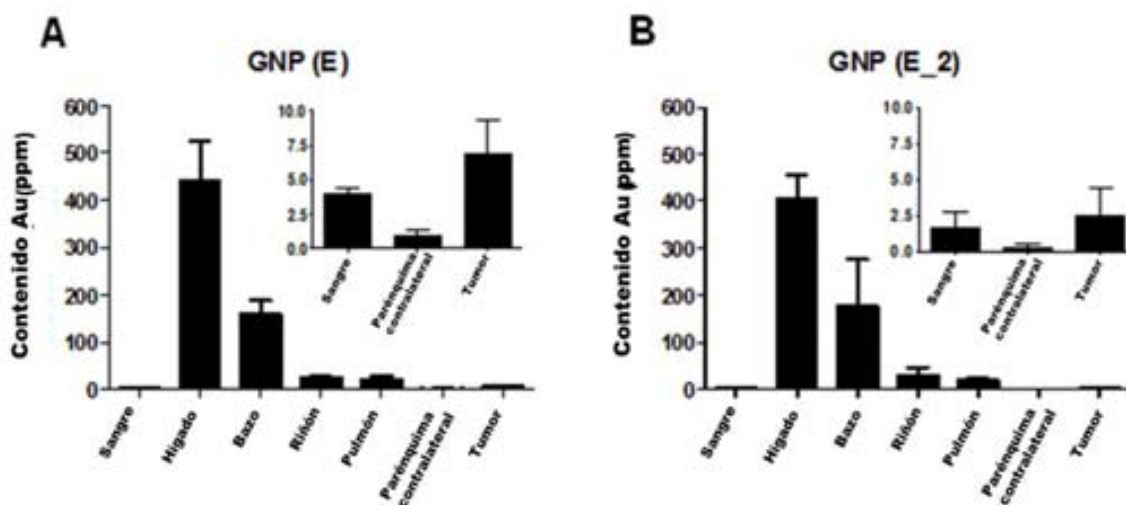


Figura 5.11: Biodistribución por ICP-MS de Oro (Au), 24h post-administración para A) GNP(E) y B) GNP(E_2). Los recuadros en cada gráfico muestran la acumulación de Au en el tumor, comparada con las concentraciones en el plasma y el parénquima contralateral. La diferencia de acumulación de Au entre el parénquima contralateral y los tumores es estadísticamente significativa para GNP(E), $p = 0,02$ y con tendencia a significación para la GNP(E-2), $p = 0,056$. Los resultados son mostrados en partes por millón (ppm).

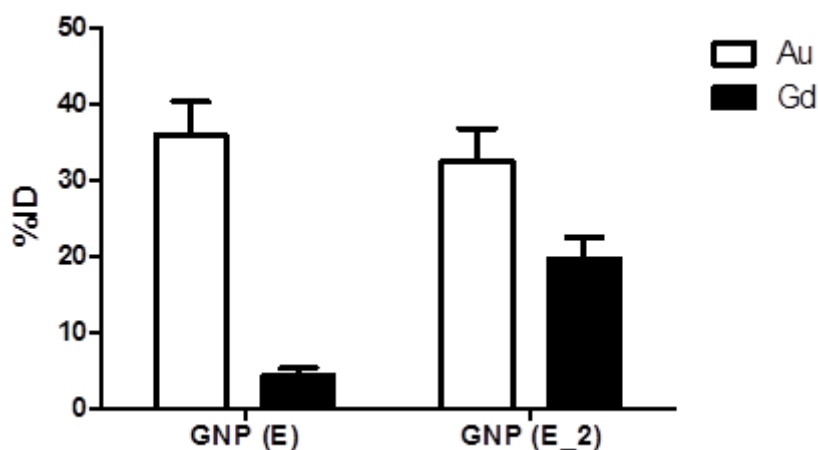


Figura 5.12: Porcentaje de Au y Gd detectados en el hígado para la GNP(E), correspondiente a las 24h post-administración y para la GNP(E_2) 48h post-administración. Para la GNP(E), se encuentra una cantidad más alta de Au en el hígado, comparado con el Gd, (cociente Au-Gd $7,84 \pm 1,48$ y la diferencia entre los dos elementos es estadísticamente significativa, $p = 0,0023$)

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

mientras que en el caso de la GNP(E_2) la acumulación de Gd en el hígado es muy similar a la del Au (cociente Au-Gd $1,60 \pm 0,21$ y la diferencia entre los dos elementos no es estadísticamente significativa, $p > 0,05$), indicando que aunque pueda ocurrir alguna liberación de Gd por la GNP, el método de síntesis de intercambio de ligandos asegura una estabilidad más alta del complejo de GNP Gd-Au.

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

5.4 DISCUSIÓN

Los complejos de gadolinio son usados comúnmente como agentes de contraste positivos en estudios clínicos por IRM. No obstante, además del posible problema de su conocida asociación con la fibrosis nefrogénica sistémica [68], son inespecíficos, es decir, son capaces de detectar cambios anatómicos y morfológicos pero no una patología específica. El desarrollo de agentes de contraste con propiedades de direccionalización específicas, capaces de reconocer moléculas o receptores característicos de un tejido o una patología, tendría un impacto clínico significativo. Uno de los modos de lograr este objetivo es el desarrollo de nano-plataformas para unir simultáneamente el AC y moléculas para su direccionalización formando agentes de contraste de tamaño nanométrico [172,173].

Los nuevos AC positivos evaluados en este trabajo son GNPs recubiertas de oro con múltiples brazos de glúcidos y complejos de Gd (Gd-GNPs) (figura 5.1) que fueron preparadas como agentes T_1 con potencial de direccionalización a los gliomas de cerebro de ratón [82,159], mimetizando la presentación multivalente de hidratos de carbono en superficies de células [174,175]. Como dichas gliconopartículas son solubles y estables bajo condiciones fisiológicas, no presentan toxicidad y son resistentes a la degradación enzimática [176], representan una nueva prometedora plataforma multivalente para aplicaciones biológicas [13,177-179]. Se seleccionaron carbohidratos simples para recubrir las nanopartículas de oro porque dichos carbohidratos son nutrientes importantes para las células y su captación depende de la expresión de transportadores específicos (por ejemplo GLUTs) [180] y proteínas de unión a carbohidratos.

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

Efecto del recubrimiento de las nanopartículas en los resultados de los AC positivos

Pequeñas modificaciones en la estructura química de los ligandos que cubren las GNPs podrían llevar a cambios en el IRC [82], ya que podrían afectar, por ejemplo, a la esfera de hidratación de Gd o el tiempo total de correlación del AC. Además, los hidratos de carbono son ligandos específicos de transportadores GLUT y lectinas (receptores celulares de unión a carbohidratos) que pueden conferir propiedades de vectorización a las GNPs.

Considerando las medidas de relajatividad *in vitro* descritas en esta tesis se observó que ciertas diferencias estructurales como la naturaleza del carbohidrato o la longitud de las cadenas de unión a glúcido o Gd parecen influenciar los valores de r_1 (tabla 5.1). Por ejemplo, las GNPs que incorporan lactosa GNP(A) o glucosa GNP(C), muestran los mayores valores de le relajatividad *in vitro* a 1,4T. Adicionalmente la longitud de la cadena que une el quelato de Gd puede tener también un papel en ese sentido, siendo la longitud "C5" (ver diferencias entre GNPs(C) y (E) o (F)) la que puede producir mejores valores a 1,4T. Algunas diferencias observadas en la serie GlcCX-DO3AC11 preparada por el método de intercambio de ligandos (GNPs (E_1), (E_2) y GNPs F-J siendo "X" un número entre 2 y 9), podrían ser explicadas si la cadena carbonada de unión al glúcido modulara el acceso del agua al ion Gd del quelato. Por ejemplo, GlcC3-DO3AC11 (GNP I) tiene el valor de relajatividad más bajo en 1,4T (para las GNPs de glucosa) y ocupa la franja más baja de valores de relajatividad a 7,0T.

Los estudios de IRC *ex vivo* muestran resultados discrepantes en comparación a los valores de relajatividad *in vitro*: por ejemplo la longitud C5 para la cadena carbonada de unión al DO3A no produjo un valor elevado de IRC, que sería lo esperado teniendo

CAPITULO 3: **Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo***

en cuenta los resultados de relajatividad *in vitro*. De la misma manera, los valores altos de relajatividad obtenidos con la GNP(A) y (C) no se traducen en un elevado IRC *ex vivo*. No se puede descartar que la baja cantidad relativa de Gd contenida en estas GNPs (aunque corregida en la preparación de las soluciones de AC para lograr la misma cantidad final de Gd en los estudios *post-mortem*) *ex-vivo* pueda tener una influencia en el IRC obtenido en cada caso. Este hecho también podría ser responsable de las diferencias observadas entre GNP(E) y (F), que presentan porcentajes de Gd por masa de GNP distintos, pero tienen valores similares de relajatividad *in vitro*.

Adicionalmente, la longitud de las cadenas de unión a la glucosa y a los complejos de Gd podrían modular las interacciones con los receptores o transportadores celulares. Es bien sabido que los transportadores de glucosa GLUT-1 están sobre-expresados en las células tumorales [181] y su estructura ha sido extensamente investigada. Es posible que sea necesaria una longitud "óptima" de la cadena de unión del glúcido a la GNP para una interacción efectiva con los transportadores GLUT-1, lo que se traduciría en la restricción máxima de movilidad del quelato Gd^{3+} y, por lo tanto, una reducción del tiempo de correlación de la molécula, con efecto concomitante en su relajatividad efectiva. La longitud de la cadena de unión (para ambos, glucosa y quelato de Gd) podría pues modular estas interacciones. Por ejemplo, la longitud C3 para la cadena de unión a la glucosa GNP(I) mostró uno de los valores más bajos de IRC *ex vivo* en la serie GlucoCX-DOTAC11 y se encontraron diferencias significativas en comparación con las longitudes C5 y C9GNP(E_1) y GNP(G). Ello sugiere que una cadena de unión a la glucosa demasiado corta podría comprometer la interacción apropiada de la GNP con los GLUT. Luciani *et al* en [182] obtuvieron resultados relevantes en este aspecto con niosomas cubiertos por glucosa, los cuales produjeron aumento de contraste, mientras que los niosomas sin glucosa no produjeron ningún

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

aumento, reforzando la posibilidad de que esta interacción (glucosa-GLUT) esté también presente en nuestro caso. Además de, posiblemente, modular los valores de relajatividad *ex vivo/in vivo*, el uso de glucosa también podría contribuir al direccionamiento de los AC a las células tumorales y a sus transportadores de glucosa.

Estudios preliminares de nuestro grupo (Simões y colaboradores, resultados no publicados) analizaron los efectos *in vivo* de la GNP(E) en el mismo modelo tumoral durante euglicemia y durante hiperglicemia inducida ($26,9 \pm 1,8$ mM en sangre). Dicho estudio no mostró diferencias significativas en los cambios de IRC máximo observado durante los distintos estados de glicemia. Ello podría sugerir que la posible competición entre la glucosa unida a la GNP y la glucosa libre por la interacción con los transportadores GLUT no parece afectar su comportamiento como agente de contraste. Sin embargo, serían necesarios más experimentos con la GNP(E_2) (ver discusión sobre la incorporación del quelato de Gd en la GNP(E)), así como ensayos *in vivo* de competición entre la glucosa de las GNPs (con y sin el quelato de Gd) para clarificar la contribución de la unión de las GNPs que contienen glucosa a los transportadores GLUT en la producción del IRC observado.

Un aspecto importante a considerar es la diferencia observada en el contenido de Gd y los valores de relajatividad en GNP(E), (E_1) y (E_2), que están recubiertas con los mismos ligandos (GlcC5 y DO3AC11). Estas diferencias probablemente se deben a la diferencia de método de síntesis (“directo” versus LPE) usado en la preparación de las GNPs. Considerando las GNPs preparadas por el método de síntesis “directo”, la relajatividad $r1$ *in vitro* a 1,4T sugeriría que la combinación entre el tipo de carbohidrato presente en la GNP, longitud de su cadena de unión y la longitud de la cadena de unión a DO3A que produciría el mejor comportamiento *in vivo* deberían ser la GNP(C)

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

con glucosa y la GNP(A) con lactosa, ambas con valores r_1 bastante similares (tabla 5.1), mientras que la glucosa GNP(E) parecería ser una de las peores. Sin embargo, los análisis *ex vivo* apuntan a la GNP(E) como la mejor GNP de todas, siendo (C) y (A) claramente inferiores a la GNP(E) y también inferiores al agente comercial gadoterato de meglumina. De ésta forma, la relajatividad r_1 a 7T fue medida solo para las GNPs que mejor comportamiento presentaron en los análisis *ex vivo*, siendo un ejemplo la GNP(E). Posteriormente se planificaron estudios *in vivo* con la partícula que presentó el mejor comportamiento *ex vivo*, la GNP(E), que en efecto, produjo *in vivo* mejor incremento de contraste que el gadoterato de meglumina en dosis comparables de Gd (figura 5.5C).

Paralelamente, un protocolo refinado hecho de la síntesis de GNP LPE se aplicó a un nuevo lote de GNPs (GNPs E_1, E_2 y F – J). El valor de relajatividad *in vitro* r_1 a 7T para la GNP(E_2) fue el mejor ($8,2 \pm 0,4$) entre las GNPs preparadas con el método LPE (tabla 5.1), aunque los análisis de IRC *ex vivo* sugerían un peor comportamiento (no significativo) que el gadoterato de meglumina. En un primer momento, este resultado no fue extrapolado a los estudios *in vivo* dado que el valor de IRC obtenido fue comparable para GNP(E) y GNP(E_2), y los dos valores fueron significativamente mejores que el gadoterato de meglumina (figura 5.13), cuando, eran medidos en su punto de máxima producción de contraste. Sin embargo, si el IRC era medido en el mismo punto temporal (3 min después de la inyección del AC en los experimentos de DCE, (figura 5.14), las predicciones de los estudios *in vivo* y *post-mortem* concuerdan demostrando que la GNP que presenta un mejor comportamiento en los dos estudios es la GNP(E) (figura 5.14). ¿Porque surge esta aparente discrepancia entre las predicciones *ex vivo* y los resultados *in vivo*? Las pequeñas diferencias, significativas, encontradas en el tiempo de incremento máximo de contraste (“T1-max”) entre las dos GNPs analizadas apuntan a que el comportamiento de la GNP(E_2) es el esperado

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

para un agente de contraste macromolecular [92]. El diámetro descrito para las GNPs sintetizadas está entre 1,8-4,5nm [82], comparable a agentes de contraste macromoleculares (4-6 nm) [82,183]. Por otro lado, el tiempo de incremento máximo de contraste y el perfil de lavado obtenido con la GNP(E) son similares a los obtenidos con el quelato libre (gadoterato de meglumina) (figura 5.8A) mientras que la GNP(E_2) alcanza el incremento máximo de una manera más lenta (figura 5.8B) lo que concuerda con los resultados obtenidos usando niosomas publicados por Luciani *et al*, [182], aunque con un tipo de tumor diferente.

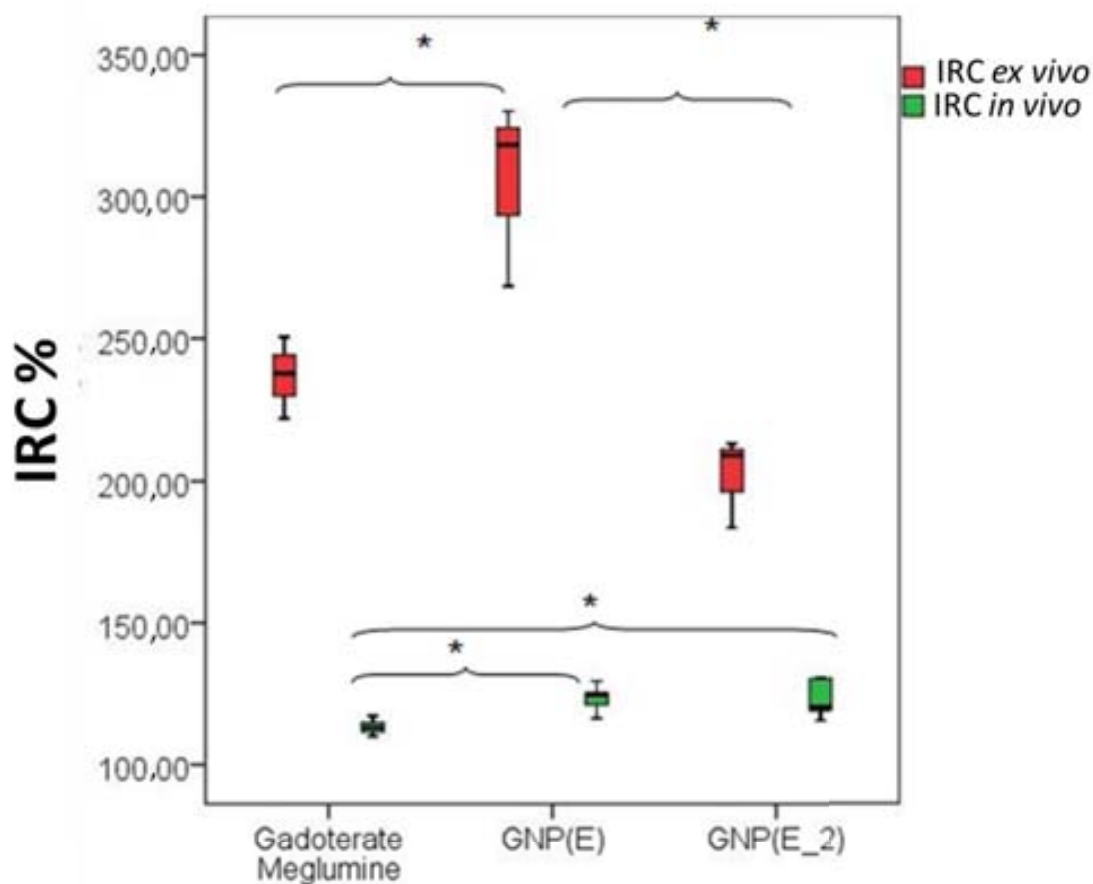


Figura 5.13 Boxplot de la comparación del valor de IRC obtenido en los estudios *ex vivo* (cajas rojas) y estudios *in vivo* (cajas verdes) en el tiempo máximo (T1-max) para cada agente de

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

contraste estudiado: gadoterato de meglumina, GNP(E) and GNP (E_2). Las diferencias significativas ($p < 0,05$) están marcadas con un asterisco.

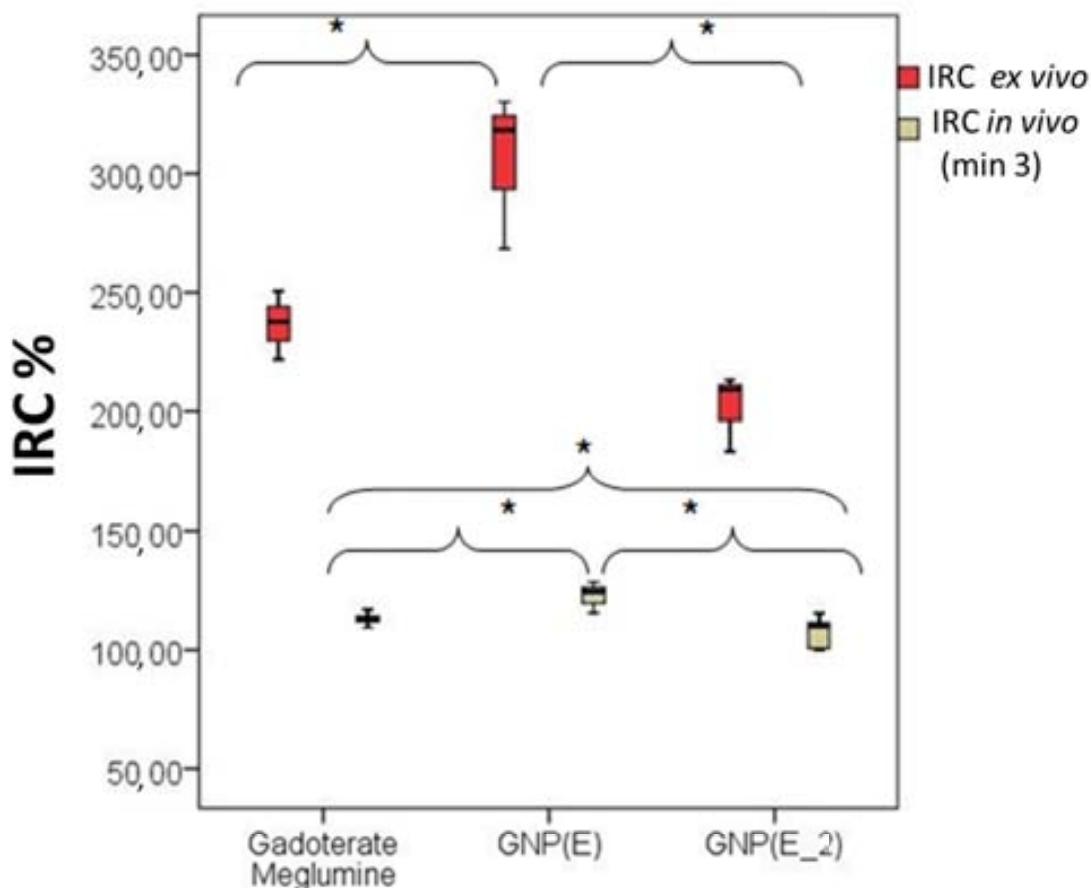


Figura 5.14: *Boxplot* de la comparación de IRC obtenido en los estudios *ex vivo* (cajas rojas) y estudios *in vivo* (cajas beige) a 3 min después de la inyección del AC, para cada agente de contraste estudiado: gadoterato de meglumina, GNP(E) y GNP(E_2). Las diferencias significativas ($p < 0,05$) están marcadas con un asterisco.

Se ha especulado sobre los motivos que llevarían a la GNP(E) a presentar un comportamiento diferente en estudios de DCE en comparación con la GNP(E_2). Datos obtenidos por Irure [159] sugieren que parte del Gd unido a la GNP sintetizada por el “método directo” puede ser quelado por los hidratos de carbono en lugar de por el

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

grupo DO3A. Esto podría permitir al Gd^{3+} estar en equilibrio entre su forma unida y no unida a la nanopartícula, de manera similar a otros casos descritos en la literatura [184] produciendo un perfil con una doble vertiente. Es decir, que la GNP(E) se comportaría, parcialmente, como un AC de bajo peso molecular. Por otro lado, en la GNP(E_2) la unión del Gd^{3+} ocurriría solo a través del quelato DO3A, no dándose esa doble vertiente. Además, datos preliminares obtenidos con los estudios de biodistribución de las GNPs de imágenes por IRM e ICP-MS (figuras 5.11 y 5.12) también apuntan a la posibilidad de la separación del Gd de la GNP(E) durante los estudios de biodistribución. El análisis conjunto de las determinaciones de Gd y Au en el hígado para GNP(E) y GNP(E_2) (figura 5.12), refuerza esta suposición. La administración de ambas nanopartículas produce una acumulación significativa de Au en hígado, pero en el caso de la GNP(E_2) el contenido de Gd fue similar al del Au, mientras en el caso de la GNP(E) el hígado acumuló 7,84 veces más Au que Gd. Esta "pérdida" de parte de Gd^{3+} unido a la GNP podría explicar porque la GNP(E) se comporta parcialmente como el gadoterato de meglumina libre.

Finalmente, las medidas de otros parámetros biofísicos (por ejemplo k_{ep} , figura 5.9 y tabla 5.4) también concuerdan con esta hipótesis. Los valores obtenidos para gadoterato de meglumina y para GNP(E) y GNP(E_2) son significativamente diferentes. Kim *et al*, [92] demostraron anteriormente que los ACs con diferente peso molecular tienen diferentes tiempos de lavado. Es decir, que se observa tiempo más largo de lavado, o dicho de otra manera, valores más bajos de k_{ep} para ACs con un mayor peso molecular. En la misma línea, de Lussanet *al*, [183] cuantificaron un parámetro que está estrechamente relacionado con la k_{ep} , el "coeficiente de transferencia" (KPS) (la ratio de transferencia de agente de contraste de la sangre hacia el espacio intersticial, altamente dependiente de la permeabilidad), y encontraron una relación inversa entre el peso molecular de AC y el valor obtenido para este

CAPITULO 3: Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

coeficiente de transferencia. En resumen, ambas, GNP(E) y GNP(E_2), presentaron un comportamiento de agentes de contraste macromoleculares de acuerdo con los valores promedio de K_{ep} , pero la gran dispersión en el caso de la GNP(E) (figura 5.9), sugiere un comportamiento mixto, que se superpone parcialmente con los valores producidos por el compuesto de referencia de bajo peso molecular, el gadoterato de meglumina.

Evaluación de las nanopartículas con función de AC negativo

Los AC de tipo negativo mostraron diferencias entre los valores encontrados para la relajatividad $r2$ *in vitro* y los valores de IRC *ex vivo*. Así, el comportamiento *ex vivo* para las SPIONs recubiertas de DMSA y TEG (Figura 5.6 y tabla 5.2) están muy cercanos a los valores encontrados para el agente comercial Ferumoxtran-10, al contrario de lo que se podía esperar de las medidas realizadas *in vitro*. Esto sugiere un posible interés futuro en el protocolo *ex vivo* para la evaluación del potencial de ACs negativos antes de avanzar hacia otras etapas adicionales del análisis *in vivo*, como IRM y estudios de biodistribución.

Finalmente, además de la mimetización más exacta de las condiciones *in vivo*, el método *ex vivo* descrito en este capítulo de la tesis consume cantidades muy pequeñas de AC comparada con un estudio *in vivo*: 800 veces menos en el caso de los agentes de contraste positivos (5 nmol/animal contra 4.000 nmol/animal). Además, como este estudio se lleva a cabo con animales previamente sacrificados, no requiere ningún ensayo toxicológico preliminar para la evaluación del compuesto candidato

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

5.5 Conclusiones relativas al Capítulo de desarrollo de un método *ex vivo* de evaluación de nuevos agentes de contraste.

1. Se ha puesto a punto un método *ex vivo* para la evaluación preclínica de potenciales agentes de contraste que mimetiza las condiciones *in vivo* de manera más eficiente que los estudios de relajatividad *in vitro*.
2. Se ha refinado dicho método *ex vivo* para reducir la cantidad de animales utilizados en el ensayo, de manera exitosa.
3. Se ha analizado una batería de agentes de contraste positivos y negativos, tanto *in vitro* a 1.4T, 7T y *ex vivo* a 7T, y se ha llevado a cabo una selección que llevó al estudio de 2 de los mejores agentes de contraste positivos de manera más extensa *in vivo*.
4. Se han obtenido resultados en el estudio *ex vivo* de AC de tipo positivo con distintas longitudes de cadenas enlazadoras del glúcido en su cobertura, que sugieren la existencia de una longitud óptima para maximizar el contraste obtenido. Ello podría ser debido a una facilitación de la interacción del glúcido de la GNP con los transportadores GLUT celulares.
5. Nuestros resultados parecen indicar que, tanto para agentes de contraste de tipo positivo como negativo, hay factores *in vivo* que no se pueden reproducir con los tests *in vitro*, y por lo tanto sería inconveniente adicionar otras estrategias como las aquí propuestas para la preselección de potenciales agentes de contraste de uso preclínico o clínico.

CAPITULO 3:
Desarrollo de un método para evaluar el potencial de nanopartículas como agentes de contraste *in vivo*

6. Se han detectado diferencias entre el IRC obtenido *ex vivo* y el IRC obtenido *in vivo* cuando no se tenía en cuenta el tiempo de máxima producción de contraste. Esto evidenció diferencias en el comportamiento de los agentes de contraste (macromolecular vs. pequeño tamaño molecular) que no concordaban con la supuesta estructura del quelato en la GNP.
7. Se ha obtenido información adicional sobre el comportamiento macromolecular de agentes de contraste de tipo positivo con el cálculo de parámetros biofísicos de perfusión tumoral a partir de los estudios dinámicos de contraste. Dicha información pudo corroborarse con los estudios de biocompatibilidad llevados a cabo con los mencionados agentes de contraste. Se ha podido proponer que, aun teniendo la misma estructura molecular básica, GNP(E_2) presentaba un comportamiento macromolecular no presentado por GNP(E), compatible a su vez con los distintos métodos de síntesis usados en su preparación y posibles diferencias subyacentes en la quelación del Gd.
8. Nuestros estudios nos han permitido concluir que ambos agentes de contraste de tipo positivo GNP(E) y GNP (E_2), aún con diferencias en su comportamiento *in vivo*, son significativamente mejores en su *performance* que el agente de contraste comercial actualmente más utilizado en la clínica.

6. DISCUSIÓN GENERAL

Los tumores cerebrales en general no tienen un buen pronóstico, aunque puede ser más favorable si se detecta la lesión o masa anómala en un estadio temprano y se aplican las estrategias curativas apropiadas. Dichos tumores, la mayoría de las veces, se detectan por la manifestación de señales y síntomas producidos por compresión por parte del tumor de distintas partes del cerebro por efecto de masa [185], por lo que no se suelen detectar, por la falta de síntomas, en momentos tempranos de su progresión.

Por cuestiones éticas, no se pueden realizar estudios repetidos con el mismo paciente para obtener información de interés sobre la evolución tumoral y para desarrollar posibles mejoras en su diagnóstico temprano, de ahí la importancia de los estudios con modelos preclínicos de dicha patología. La mayoría de los estudios preclínicos con técnicas no invasivas y tumores cerebrales se centran en los modelos de alto grado [186,187,152] y por lo tanto serían convenientes estudios adicionales que tengan en cuenta modelos de bajo grado cuyo pronóstico es mejor y la enfermedad, desde un punto de vista terapéutico podría ser más manejable.

Los modelos preclínicos que más fielmente recapitulan la patología humana son los de desarrollo espontáneo y lento como los de las colonias de animales genéticamente modificados (GEM), generalmente basados en la expresión de transgenes o silenciamiento *knock-out* de determinados genes que participan en el desarrollo de dichos tumores [114]. Por éste motivo, el trabajo inicial de ésta tesis se llevó a cabo con la caracterización y estudio de las colonias GEM, de las cuales se esperaba obtener los ejemplares necesarios para un estudio más profundizado del diagnóstico y evolución de la enfermedad en tumores cerebrales gliales de bajo grado.

No obstante, como se pudo comprobar en el desarrollo del trabajo llevado a cabo en el capítulo 1, los resultados obtenidos con las colonias GEM no fueron satisfactorios ni se correspondieron con los descritos en la literatura. Esto se pudo deber parcialmente a que muchos de los estudios en la literatura se llevan a cabo con evaluación por histopatología a punto final [111,120,140] mientras lo que se pretendía en ésta tesis era obtener modelos que no solo desarrollaran la patología, sino que además lo hicieran de forma detectable y utilizable para su evaluación y seguimiento por IRM/ERM/IERM, y no únicamente la evolución histopatológica, necesariamente restringida por la imposibilidad de usar al mismo tiempo una muestra de tejido para histopatología y continuar estudiando la progresión tumoral en el mismo animal. En este sentido, se mantuvo y evaluó exhaustivamente las colonias GEM, incluso de forma rutinaria sin esperar al desarrollo de posibles síntomas de los animales. No obstante, la penetrancia tumoral conseguida fue o bien muy baja, o bien inadecuada para llevar a cabo un estudio con las características deseadas, es decir, con tumores de bajo grado y evolución relativamente lenta. La colonia GEM que más se aproximó al modelo tumoral deseado para el estudio propuesto al inicio de esta tesis fue la colonia "S". Fue por ello que nos planteamos desarrollar una línea de tumor transplantable a partir de un tumor de grado bajo/intermedio detectado en un animal de dicha colonia. Para tal selección, se tuvieron en cuenta todas las herramientas de detección no invasiva desarrolladas en nuestro grupo y no únicamente la evolución histopatológica. Ello se hizo para asegurarnos con la máxima fiabilidad posible de que, efectivamente, la lesión en cuestión se trataba de un tumor de interés.

Mientras se analizaba la colonia GEM para la detección de un tumor con las características adecuadas para la generación de la línea transplantable, fue necesario poner a punto la técnica de disgregación de tumores, generación de gliosferas y reimplantación en nuevos animales. El paso de cultivo y expansión es necesario para

la producción de una nueva generación de tumores a partir del original, y para la puesta a punto de la técnica se utilizaron tumores GL261 estándar, ya debidamente caracterizados por nuestro grupo y otros autores [108,28]. Este tipo de puesta a punto resulta técnicamente compleja y larga, por tener que producir una generación numerosa de animales con tumores, así como su completa caracterización, seguimiento y comparación con los tumores que les dieron origen. El primer intento de desarrollo de una línea transplantable a partir de un tumor GEM finalmente se hizo con un ejemplar que presentó una lesión con características de transición de grado (diagnóstico final de OA de grado III), porque no se pudo disponer a tiempo de una lesión totalmente característica de bajo grado. Dicho desarrollo, aunque no presentó una penetrancia del 100% del fenotipo tumoral, fue exitoso en el sentido de que más de la mitad de los animales sometidos al proceso presentaron lesiones de características de evolución, espectroscópicas e histopatológicas compatibles con el tumor de origen. El hecho de que parte de los individuos sufran una mutación genética adicional (pérdida de heterocigosidad para Ink4A-Arf) y presenten un cambio en la caracterización fenotípica no es desdeñable y puede ser de interés en estudios futuros del grupo. En el caso que nos ocupa, cabe añadir la heterogeneidad intrínseca del tumor que puede verse magnificada con el paso de expansión in vitro y generación de gliosferas. Este hecho, y la posible diferencia entre la cantidad de células madre (no cuantificadas) presentes en las muestras usadas para la producción de nuevos tumores, podrían ser los responsables de la dispersión en el tiempo de latencia hasta la detección de los tumores en la nueva generación analizada tras la disgregación. Idealmente serían convenientes estudios adicionales para determinar si la congelación de los tejidos de un tumor de bajo grado puede ejercer alguna presión en la selección natural de supervivencia de células con tendencia a grados más altos, así como de la influencia del paso por un cultivo in vitro en las características de la nueva generación tumoral transplantada.

Idealmente, la tarea experimental planificada preveía la posible aplicación de los animales generados con la línea transplantable de bajo grado a los estudios a llevar a cabo con nuevos agentes de contraste. No obstante, dicha línea ni estuvo disponible a tiempo, ni produjo efectivamente animales de bajo grado, sino una mayoría de tumores en transición con un grado III, con lo cual el trabajo en el último capítulo de la tesis se basó en el bien caracterizado modelo GL261 de grado IV.

Por lo tanto en dicho capítulo, se desarrolló un método novedoso de estudio de potenciales agentes de contraste basado en análisis *ex vivo* que podría mimetizar de manera más efectiva el entorno *in vivo*, en comparación con los estudios clásicos de relajatividad *in vitro*. Dicho estudio nos ha permitido seleccionar de una batería de candidatos, agentes de contraste de nueva síntesis basados en gadolinio, los que mejor potencial han presentado para llevar a cabo estudios *in vivo* comparándolos con el agente comercial actualmente disponible para estudios clínicos. Adicionalmente, el análisis de agentes de contraste dentro de dicha batería con pequeñas diferencias en su estructura y en las cadenas enlazadoras a sus grupos funcionales nos ha permitido sugerir que la producción de IRC está posiblemente modulada por la interacción de los ligandos glucídicos del agente de contraste con los transportadores GLUT en la membrana de las células, siendo posible que exista una longitud óptima de esta cadena enlazadora que permite maximizar los resultados a obtener. Además del valor de IRC producido (que resultó ser significativamente mejor en los agentes de contraste candidatos que en el agente comercial disponible), también se detectaron diferencias en los parámetros biofísicos de estos agentes (obtenidos mediante estudios cinéticos con administración de contraste), que evidencian sus características de agentes de contraste macromoleculares. Estos estudios también evidenciaron diferencias relevantes en el comportamiento de los dos agentes de contraste positivos estudiados *in vivo*, aunque se trataba de compuestos supuestamente con fórmula estructural

idéntica. Dichas diferencias, relacionadas probablemente con la estabilidad del quelato de gadolinio en el agente de contraste, podrían ser explicables por diferencias en el método de síntesis utilizado en cada caso. Asimismo los estudios de biocompatibilidad y biodistribución de dichos AC corroboraron lo antes planteado. Así, se pudo proponer que el método de síntesis por intercambio de ligandos producía el agente de contraste más estable y sus resultados preliminares de biocompatibilidad apuntaron a que podría ser un candidato de interés en la línea de desarrollo de nuevos agentes de contraste direccionalizados.

Idealmente, la derivatización de dichos agentes de contraste por la inclusión de distintos glúcidos unidos a ellos debería conferirles cierta vectorialización hacia las células tumorales. Hubiera sido interesante evaluar la capacidad de las GNPs debidamente modificadas para actuar como agentes de contraste en tumores de bajo grado, accediendo a las células tumorales sin la necesidad de comprometimiento de la BHE. No obstante, no fue posible evaluar dicha posibilidad por la falta de disponibilidad de modelos de bajo grado adecuados a dicho estudio. Futuros estudios en esta línea pueden llevar al desarrollo de un agente de contraste que pueda también ser utilizado para tumores de bajo grado y sin descartar la posibilidad de incluir en el agente de contraste agentes terapéuticos, entrando así en el campo actual de la teragnosis [188].

7. CONCLUSIONES GLOBALES

1. En cuanto a las colonias de animales transgénicos que desarrollan espontáneamente tumores cerebrales, la penetrancia y desarrollo del fenotipo tumoral están influenciadas por distintos factores que no pudimos controlar de manera satisfactoria en el curso de ésta tesis. Sin embargo, el reducido número de GEM total con tumores espontáneos explorados por IRM/ERM/IERM (36/307) fue de gran utilidad para el trabajo colaborativo en el grupo [27,28,7,131,21]
2. Se ha podido desarrollar una línea transplantable a partir de un tumor GEM, previa optimización con modelos de tumor estándar bien caracterizados. Dicha técnica necesita el paso previo de expansión y cultivo *in vitro* para su aplicación y se ha podido desarrollar hasta primera generación una línea de tumor glial de grado intermedio (oligodendroglioma anaplásico).
3. Se ha desarrollado un método *ex vivo* para el análisis y selección de nuevos agentes de contraste, utilizando el mínimo número de animales posibles, pero con una mimetización más eficiente del entorno *in vivo* en comparación con los análisis de relajatividad *in vitro*. Dicho método ahorra la necesidad de tests toxicológicos previos y necesita mucho menos material que un análisis completo *in vivo*. Ha sido exitosamente aplicado a una batería de agentes de contraste positivo, lo que resultó en una selección de 2 agentes que resultaron ser, en efecto, significativamente mejores que el agente de contraste comercial disponible en la clínica.

8. REFERENCIAS

1. Rabi I (1992) A new method of measuring nuclear magnetic moment. *J Magn Reson Imaging* Mar-Apr;2(2):131-133.
2. Filler A (2009) The history, development and impact of computed imaging in neurological diagnosis and neurosurgery: Ct, mri, and dti. *Nature proceedings* Julio:6-43.
3. Damadian R (1971) Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science* 171:1151-1153
4. Lauterbur PC (1973) Image formation by induced local interactions: Examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature* 242:190-191.
5. Ernst R (1978) Gyromagnetic resonance fourier transform zeugmatography patente n 4,070,611. US Patent.
6. Gadian D (1996) *Nmr and its applications to living systems*. 2nd edn., New York: Oxford Science Publications
7. Delgado-Goñi T (2012) Aproximación a la caracterización morfológica y molecular por irm y erm de la respuesta a la terapia en modelos preclínicos de glioma. Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès.
8. Westbrook C (2002) *Mri at a glance*. Blackwell Science Ltd.,
9. Majós C, Alonso J, Aguilera C, Serrallonga M, Perez-Martin J, Acebes J, Arus C, Gili J (2003) Proton magnetic resonance spectroscopy ((1) h mrs) of human brain tumours: Assessment of differences between tumour types and its applicability in brain tumour categorization. *Eur Radiol* 13 (3):582-591.
10. Catherine Westbrook CK (1998) *Mri in practice*. Blackwell Science Ltd
11. Mark A, Brown R (2003) *Mri basic principles and aplicaciones*. 3rd ed edn. John Wiley & Sons, Inc.,
12. Gili, Planas J, Capdevila Cirera A (eds) (1992) *Resonancia magnética*. Centre Diagnòstic Pedralbes DL: Barcelona, Barcelona.
13. Garcia I, Marradi M, Penades S (2010) Glyconanoparticles: Multifunctional nanomaterials for biomedical applications. *Nanomedicine (Lond)* 5 (5):777-792.
14. Weybright P, Maly P, Gomez-Hassan D, Blaesing C, Sundgren P (2004) Mr spectroscopy in the evaluation of recurrent contrast-enhancing lesions in the posterior fossa after tumor treatment. *Neuroradiology* 46 (7):541-549.
15. Brown TR, Kincaid BM, Ugurbil K (1982) Nmr chemical shift imaging in three dimensions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (11):3523-3526.

16. Segebarth CM, Baleriaux DF, Luyten PR, den Hollander JA (1990) Detection of metabolic heterogeneity of human intracranial tumors in vivo by 1h nmr spectroscopic imaging. *Magnetic Resonance Medicine* 13 (1):62-76.
17. Grütter R (1993) Automatic, localized in vivo adjustment of all first-and second-order shim coils. *Magnetic Resonance in Medicine* 29 (6):804-811.
18. Pohmann R, Rommel E, von Kienlin M (1999) Beyond k-space: Spectral localization using higher order gradients. *J Magn Reson* 141 (2):197-206.
19. Luts J, Laudadio T, Idema AJ, Simonetti AW, Heerschap A, Vandermeulen D, Suykens JA, Van Huffel S (2009) Nosologic imaging of the brain: Segmentation and classification using mri and mrsi. *NMR Biomed* 22 (4):374-390.
20. Tkac I, Rao R, Georgieff MK, Gruetter R (2003) Developmental and regional changes in the neurochemical profile of the rat brain determined by in vivo 1h nmr spectroscopy. *Magn Reson Med* 50 (1):24-32.
21. Simões RV, Candiota AP, Julià-Sapé M, Arus, C. (2012) Chapter 33 - in vivo magnetic resonance spectroscopic imaging (mrsi) and ex vivo quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy (hrmas). In: Media SSB (ed), vol Chapter 31.
22. Howe FA, Opstad KS (2003) 1h mr spectroscopy of brain tumours and masses. *NMR Biomed* 16 (3):123-131.
23. Tate AR, Underwood J, Acosta DM, Julià-Sapé M, Majós C, Moreno-Torres A, Howe FA, van der Graaf M, Lefournier V, Murphy MM, Loosemore A, Ladroue C, Wesseling P, Luc Bosson J, Cabanas ME, Simonetti AW, Gajewicz W, Calvar J, Capdevila A, Wilkins PR, Bell BA, Remy C, Heerschap A, Watson D, Griffiths JR, Arús C (2006) Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra. *NMR Biomed* 19 (4):411-434.
24. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002) The who classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61 (3):215-225; discussion 226-219.
25. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9 (3):157-173.
26. Delgado-Goñi T, Martin-Sitjar J, Simões R, Acosta M, Lope-Piedrafita S, Arús C (2013) Dimethyl sulfoxide (dms) as a potential contrast agent for brain tumors. *NMR Biomed* Feb;26(2):173-184
27. Simões RV, Garcia-Martin ML, Cerdan S, Arús C (2008) Perturbation of mouse glioma mrs pattern by induced acute hyperglycemia. *NMR Biomed* 21 (3):251-264
28. Simões RV, Ortega-Martorell S, Delgado-Goñi T, Fur YL, Pumarola M, Candiota AP, Martín J, Stoyanova R, Cozzone PJ, Julià Sapé M, Arús C (2012) Improving the

- classification of brain tumors in mice with perturbation enhanced (pe)-mrsi. *Integr Biol (Camb)* 4 (2):183-191
29. Project G (Accessed July 27th 2011) [Http://globocan.iarc.fr/](http://globocan.iarc.fr/).
30. Louis D, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (eds) (2007) Who classification of tumours of tumours of the central nervous system . IARC, Lyon Press.
31. Bernstein M, Berger M (eds) (2001) *Neuro-oncology the essentials*. Thieme New York.
32. Kaye A, Laws E (eds) (2001) *Brain tumours 2ª Edición* edn. Churchill Livingstone, USA.
33. Stewart B, Kleihues P (eds) (2003) *Eds world health organization, world cancer report*. Lyon, IARC Press.
34. Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran NL, Hoelzinger DB, Berens ME (2007) Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci* 64 (4):458-478.
35. Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W, editors. . IARC (2007) *The who classification of tumours of the central nervous system*. Lyon Press.
36. Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathologica* January 109.
37. Shetty P, Moiyadi A, Pantvaidya G, Arya S (2010) Cystic metastasis versus brain abscess: Role of mr imaging in accurate diagnosis and implications on treatment. *J Cancer Res Ther* 6 (3):356-358.
38. Khan SH, Buwembo JE, Li Q (2005) Concurrence of glioma and multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 32 (3):349-351.
39. Doolittle ND, Abrey LE, Bleyer WA, Brem S, Davis TP, Dore-Duffy P, Drewes LR, Hall WA, Hoffman JM, Korfel A, Martuza R, Muldoon LL, Peereboom D, Peterson DR, Rabkin SD, Smith Q, Stevens GH, Neuwelt EA (2005) New frontiers in translational research in neuro-oncology and the blood-brain barrier: Report of the tenth annual blood-brain barrier disruption consortium meeting. *Clin Cancer Res* 11 (2 Pt 1):421-428.
40. Essig M, Rohrer M, Giesel F, Tuttonberg J, Weber MA, Michaely H, Gerigk L, Voth M (2010) Human brain tumor imaging with a protein-binding mr contrast agent: Initial experience. *Eur Radiol* 20 (1):218-226.
41. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C (2008) Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol* 67 (2):139-152.
42. Hlaihel C, Guilloton L, Guyotat J, Streichenberger N, Honnorat J, Cotton F (2010) Predictive value of multimodality mri using conventional, perfusion, and spectroscopy mr in anaplastic transformation of low-grade oligodendrogliomas. *J Neurooncol* 97 (1):73-80.
43. Upadhyay N, Waldman A (2011) Conventional mri evaluation of gliomas. *Br J Radiol* 84 Spec No 2:S107-111.

44. Attenberger UI, Runge VM, Morelli JN, Williams J, Jackson CB, Michaely HJ (2010) Evaluation of gadobutrol, a macrocyclic, nonionic gadolinium chelate in a brain glioma model: Comparison with gadoterate meglumine and gadopentetate dimeglumine at 1.5 t, combined with an assessment of field strength dependence, specifically 1.5 versus 3 t. *J Magn Reson Imaging* 31 (3):549-555.
45. Nelson SJ (2011) Assessment of therapeutic response and treatment planning for brain tumors using metabolic and physiological mri. *NMR Biomed* 24 (6):734-749.
46. Favre J, Taha JM, Burchiel KJ (2002) An analysis of the respective risks of hematoma formation in 361 consecutive morphological and functional stereotactic procedures. *Neurosurgery* 50 (1):48-56; discussion 56-47.
47. Field M, Witham TF, Flickinger JC, Kondziolka D, Lunsford LD (2001) Comprehensive assessment of hemorrhage risks and outcomes after stereotactic brain biopsy. *J Neurosurg* 94 (4):545-551.
48. Sibtain NA, Howe FA, Saunders DE (2007) The clinical value of proton magnetic resonance spectroscopy in adult brain tumours. *Clin Radiol* 62 (2):109-119.
49. Martinez-Bisbal MC, Celda B (2009) Proton magnetic resonance spectroscopy imaging in the study of human brain cancer. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 53 (6):618-630.
50. Laprie A (2009) Proton magnetic resonance spectroscopic imaging and other types of metabolic imaging for radiotherapy planning in adult and pediatric high-grade gliomas. *Cancer Radiother* 13 (6-7):556-561.
51. Wright AJ, Fellows G, Byrnes TJ, Opstad KS, McIntyre DJ, Griffiths JR, Bell BA, Clark CA, Barrick TR, Howe FA (2009) Pattern recognition of mrsi data shows regions of glioma growth that agree with dti markers of brain tumor infiltration. *Magn Reson Med* 62 (6):1646-1651.
52. Simonetti AW, Melssen WJ, van der Graaf M, Postma GJ, Heerschap A, Buydens LM (2003) A chemometric approach for brain tumor classification using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Anal Chem* 75 (20):5352-5361.
53. Weybright P, Sundgren PC, Maly P, Hassan DG, Nan B, Rohrer S, Junck L (2005) Differentiation between brain tumor recurrence and radiation injury using mr spectroscopy. *AJR Am J Roentgenol* 185 (6):1471-1476.
54. INTERPRET DSS, Decision Support System, 3.1 v [Http://gabrmn.Uab.Es/dss](http://gabrmn.Uab.Es/dss). Accessed April, 27th 2013.
55. INTERPRET DSS, Decision Support System, v3.0 [Http://gabrmn.Uab.Es/dss](http://gabrmn.Uab.Es/dss). Accessed July, 27th 2011.
56. Pérez-Ruiz A, Julià Sapé M, Mercadal G, Olier I, Majos C, Arus C (2010) The interpret decision-support system version 3.0 for evaluation of magnetic resonance spectroscopy data from human brain tumours and other abnormal brain masses. *BMC Bioinformatics* 11:581.
57. [Http://gabrmn.Uab.Es/sc](http://gabrmn.Uab.Es/sc).

58. Ortega-Martorell S, Olier I, Julià-Sapé M, Arús C (2010) SpectraClassifier 1.0: A user friendly, automated mrs-based classifier-development system. *BMC Bioinformatics* 11 (106):1-14.
59. Bloch F, Hansen WW, M. P (1946) The nuclear induction experiment. *M Phys Rev* 70:474
60. Lauterbur PC, M.H. M-D, Rudin AM (1978) *Frontiers of biological energetics*. Academic Press., New York.
61. Toth E, Helm L, Merbach AE (2001) The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging.
62. Giesel F, Mehndiratta A, Essig M (2010) High-relaxivity contrast-enhanced magnetic resonance neuroimaging: A review. *Eur Radiol* 20(10): 2461-2474
63. Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB (1999) Gadolinium(iii) chelates as mri contrast agents : Structure, dynamics, and applications. *Chem Rev* 99 (2293-2352).
64. Hermann P, Kotek J, Kubicek V (2008) Gadolinium (iii) complexes as mri contrast agents: Ligand design and properties of the complexes. *Dalton Trans* 23:3027-3047.
65. Bulte JWM, Kraitchman DL (2004) Iron oxide mr contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomedicine* 17:484-499.
66. Laurent S, Elst L, Muller R (2006) Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents. *Contrast Media Mol Imaging* 1(3):128-137.
67. Caravan P (2006) Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based mri contrast agents. *Chem Soc Rev* 35:512-523.
68. Broome D, Girguis M, Baron P, Cottrell A, Kjellin I, Kirk G (2007) Gadodiamide-associate nephrogenic systemic fibrosis: Why radiologists should be concerned. *AJR Am J Roentgenol* 188 (2):881-889.
69. Cheon J, Lee JH (2008) Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology. *Acc Chem Res* 41:1630-1640.
70. Xie J, Liu G, Eden HS, Ai H, Chen X (2011) Surface-engineered magnetic nanoparticle platforms for cancer imaging and therapy. *Acc Chem Res* 44:883-892.
71. Lee CC, Mackay JA, Frechet JM, Szoka FC (2005) Designing dendrimers for biological applications *Nat Biotechnol* 23 (1517-1526).
72. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L (2001) Viral vectors for gene therapy: The art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Medicine* 7:33--40.
73. Frias JK, Williams KJ, Fisher EA, Fayad ZA (2004) Recombinant hdl-like nanoparticles: A specific contrast agent for mri of atherosclerotic plaques. *J Am Chem Soc* 126:16316-16317.

74. Huang X, Bronstein LM, Retrum J, Dufort C, Tsvetkova I, Aniagyei S, Stein B, Stucky G, McKenna B, Remmes N, Baxter D, Kao CC, Dragnea B (2007) Self-assembled virus-like particles with magnetic cores *Nano, Lett* 7:2407-2416.
75. Liao H, Nehl CL, Hafner JH (2006) Biomedical applications of plasmon resonant metal nanoparticles. *Nanomedicine* 1:201-208.
76. Thorek D, Chen A, Czupryna J, Tsourkas A (2006) Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Ann Biomed Eng Jan*;34(1):23-38.
77. Qian X, Peng XH, Ansari DO, Yin-Goen Q, Chen GZ, Shin DM, Yang L, Young AN, Wang MD, Nie S (2008) In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced raman nanoparticles tags. *Nat Biotechnol* 26:83-90.
78. Hilger I, Hiergeist R, Hergt R, Winnefeld K, Schubert H, Kaiser WA (2002) Thermal ablation of tumors using magnetic nanoparticles: An in vivo feasibility study. *Invest Radiology* 37:580-596.
79. O'Neal DP, Hirsch LR, Halas NJ, Payne JD, West JL (2004) Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Lett* 209:171-176.
80. Lebdusková P, Kotek J, Hermann P, Vander Elst L, Muller RN, Lukes I, Peters JA (2004) A gadolinium(iii) complex of a carboxylic-phosphorus acid derivative of diethylenetriamine covalently bound to inulin, a potential macromolecular mri contrast agent. *Bioconjug Chem* 15 (4):881-889.
81. Bhaskar S, Tian F, Stoeger T, Kreyling W, de la Fuente JM, Grazú V, Borm P, Estrada G, Ntziachristos V, Razansky D (2010) Multifunctional nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: Perspectives on tracking and neuroimaging. *Part Fibre Toxicology* 7:7-3.
82. Marradi M, Alcántara D, de la Fuente J, García-Martín M, Cerdan S, Penadés S (2009) Paramagnetic gd-based gold glyconanoparticles as probes for mri: Tuning relaxivities with sugars. *Chem Commun* 14 (26):3922-3924.
83. Küstermann E, Himmelreich U, Kandal K, Geelen T, Ketkar A, Wiedermann D, Strecker C, Esser J, Hoehn M SA (2008) Efficient stem cell labeling for mri studies. *Contrast Media Mol Imaging* 3:27-37.
84. Figuerola A, Di Corato R, Manna L, Pellegrino T (2010) From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacological Research* 62:126-143.
85. Yu M, Park J, S. J (2012) Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics* 2 (1):3-44.
86. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, Muller R (2008) Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev* 108 (6):2064-2110
87. Mustafi D, Peng B, Foxley S, Makinen MW, Karcmar GS, Zamora M, Ejniak J, Martin H (2009) New vanadium-based magnetic resonance imaging probes: Clinical potential for early detection of cancer. *J Biol Inorg Chem*.

88. Cosentino U, Pitea D, Moro G, Saracino GAA, Villa A (2009) Conformational behaviour determines the low-relaxivity state of a conditional mri contrast agent. *Phys Chem Chem Phys* 11:3943-3950.
89. Fries P, Runge VM, Bücken A, Schürholz H, Reith W, Robert P, Jackson C, Lanz T, Schneider G (2009) Brain tumor enhancement in magnetic resonance imaging at 3 tesla: Intraindividual comparison of two high relaxivity macromolecular contrast media with a standard extracellular gd-chelate in a rat brain tumor model. *Investigative Radiology* 44:200-206.
90. Högemann D, Ntziachistos V, Josephson L, Weissleder R (2002) High throughput magnetic resonance imaging for evaluation targeted nanoparticle probes. *Bioconjugate Chem* 13:116-121.
91. Bouchard L-S, Anwar MS, Liu GL, Hann B, Gray JW, Wang X, Pines A, Chen FF (2009) Picomolar sensitivity mri and photoacoustic imaging of cobalt nanoparticles. *PNAS* Mar 17;106(11) (11):4085-4089.
92. Kim SH, Csaky KG, Wang NS, Lutz RJ (2008) Drug elimination kinetics following subconjunctival injection using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Pharmacological Research* 25 (3):512-520.
93. Swanson SD, Kukowska-Latallo JF, Patri AK, Chen C, Ge S, Cao Z, Kotlyar A, East AT, Baker JR (2008) Targeted gadolinium-loaded dendrimer nanoparticles for tumor-specific magnetic resonance contrast enhancement. *Int J Nanomedicine* 3 (2):201-210.
94. Caravan P (2009) Protein-targeted gadolinium-based magnetic resonance imaging (mri) contrast agents: Design and mechanism of action *Acc Chem Res* 42 (7):851-862.
95. Krause W (2002) Contrast agents i: Magnetic resonance, vol 221. *Topics in current chemistry*. Springer, Berlin.
96. McConville P, Elliot WL, Kreger A, Lister R, Moody JB, Trachet E, Urban F, Leopold WR (2007) Preclinical models of tumor growth and response. In: Shields AF (ed) *In vivo imaging of cancer therapy*. Humana Press, pp 13-32.
97. Corbett T, Roberts B, Leopold W, Peckham J, Wilkoff L, Griswold DJ, Schabel FJ (1984) Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in c57bl/6 mice. *Cancer Res* Feb; 44(2):717-726.
98. Simmons M, Richter C, Tennant R, Franklin J Production of epecific pathogen-free rats in plasic germfree isolator room. In, *Life uin medical and biological* 1968.
99. Resources IoLA (1996) Guide for the care and use of laboratory animals. 1ra edn. National Academy Press Washington, D.C.
100. Qiu W, Su G (2012) Challenges and advances in mouse modeling for human pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* Nov 1:1245-1225.
101. Ho K, Poon P, Owen S, Shoichet M (2012) Blood vessel hyperpermeability and pathophysiology in human tumour xenograft models of breast cancer: A comparison of ectopic and orthotopic tumours. *BMC Cancer* 12(1):579.

102. Wilmanns C, Fan D, O'Brian C, Bucana C, Fidler I (1992) Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon c. *Int J Cancer* vol. 52 Num. 1: 98-104.
103. Lee J, Lund-Smith C, Borboa A, Gonzalez A, Baird A, Eliceiri B (2009) Glioma-induced remodeling of the neurovascular unit. *Brain Res* 1288:125-134.
104. Criscuoli L, Rizzo R, Fuzzi B, Melchiorri L, Menicucci A, Cozzi C, Dabizzi S, Branconi F, Evangelisti P, Baricordi O, Noci I (2005) Lack of histocompatibility leukocyte antigen-g expression in early embryos is not related to germinal defects or impairment of interleukin-10 production by embryos. *Gynecol Endocrinol* 20(5):264-269.
105. Lund C, Nguyen M, Owens G, Pakchoian A, Shaterian A, Kruse C, Eliceiri B (2006) Reduced glioma infiltration in src-deficient mice. *J Neurooncol* May;78(1):19-29.
106. Eliceiri B, Paul R, Schwartzberg P, Hood J, Leng J, Cheresh D (1999) Selective requirement for src kinases during vegf-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* Dec;4(6): 915-924.
107. Newcomb EW, Zagzag D (2009) Chapter 12: The murine gl261 glioma experimental model to assess novel brain tumor treatments. In: Van Meir EG (ed) *Cns cancer. Models, markers, prognostic factors, targets and therapeutic approaches*. Atlanta (USA), pp 227-241.
108. Cha S, Johnson G, Wadghiri YZ, Jin O, Babb J, Zagzag D, Turnbull DH (2003) Dynamic, contrast-enhanced perfusion mri in mouse gliomas: Correlation with histopathology. *Magn Reson Med* 49 (5):848-855.
109. Szatmari T, Lumniczky K, Desaknai S, Trajcevski S, Hidvegi EJ, Hamada H, Safrany G (2006) Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci* 97 (6):546-553.
110. Gutmann DH, Baker SJ, Giovannini M, Garbow J, Weiss W (2003) Mouse models of human cancer consortium symposium on nervous system tumors. *Cancer Res* 63 (11):3001-3004.
111. Weiss WA, Burns MJ, Hackett C, Aldape K, Hill JR, Kuriyama H, Kuriyama N, Milshteyn N, Roberts T, Wendland MF, DePinho R, Israel MA (2003) Genetic determinants of malignancy in a mouse model for oligodendroglioma. *Cancer Res* 63 (7):1589-1595.
112. Barker M, Hoshino T, Gurcay O, Wilson C, Nielsen S, Downie R, Eliason J (1973) Development of an animal brain tumor model and its response to therapy with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res* 33(5): 976-986.
113. Pollard S, Yoshikawa K, Clarke I, Danovi D, Stricker S, Russell R, Bayani J, Head R, Lee M, Bernstein M, Squire J, Smith A, Dirks P (2009) Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* Jun 5;4(6):568-580.
114. Fomchenko EI, Holland EC (2006) Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Clin Cancer Res* 12 (18):5288-5297.

115. Reifenberger J, Reifenberger G, Ichimura K, Schmidt E, Wechsler W, Collins V (1996) Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors. *Am J Pathol* 149(1):29-35.
116. Deloulme J, Raponi E, Gentil B, Bertacchi N, Marks A, Labourdette G, Baudier J (2004) Nuclear expression of s100b in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. *Mol Cell Neurosci* Dec;27(4):453-465.
117. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN (1998) Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 90:1473-1479.
118. Duerr E, Rollbrocker B, Hayashi Y, Peters N, Meyer-Puttlitz B, Louis D, Schramm J, Wiestler O, Parsons R, Eng C, Von Deimling A (1998) Pten mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 30;16(17):2259-2264.
119. Ino Y, Betensky R, Zlatescu M, Sasaki H, Macdonald D, Stemmer-Rachamimov A, Ramsay D, Cairncross J, Louis D (2001) Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: Implications for patient management at diagnosis. *Clin Cancer Res* 7(4):839-845.
120. Aguzzi A, Kleihues P, Heckl K, Wiestler O (1991) Cell type-specific tumor induction in neural transplants by retrovirus-mediated oncogene transfer. *Oncogene* 6:113-118
121. Takenaka N, Mikoshiba K, Takamatsu K, Tsukada Y, Ohtani M, Toya S (1985) Immunohistochemical detection of the gene product of rous sarcoma virus in human brain tumors. *Brain Res* 1;337(2):201-207.
122. Baba H, Nakahira K, Morita N, Tanaka F, Akita H, Ikenaka K (1997) Gfap gene expression during development of astrocyte. *Dev Neurosci* 19(1):49-57.
123. Danks R, Orian J, Gonzales M, Tan S, Alexander B, Mikoshiba K, Kaye A (1995) Transformation of astrocytes in transgenic mice expressing sv40 t antigen under the transcriptional control of the glial fibrillary acidic protein promoter. *Cancer Res* 1;55(19):4302-4310.
124. Weissenberger J, Steinbach J, Malin G, Spada S, Rüllicke T, Aguzzi A (1997) Development and malignant progression of astrocytomas in gfap-v-src transgenic mice. *Oncogene* 14, 2005–2013 (1997). 1;14(17):2005-2013.
125. Huson S, Hughes R (1994) A pathogenetic and clinical overview. In: *Neurofibromatoses* T (ed). Chapman & Hall Medical, London.
126. Sorensen SA, Mulvihill JJ, Nielsen A (1986) Long-term follow-up of von recklinghausen neurofibromatosis. Survival and malignant neoplasms. *N Engl J Med* 314:1010–1015.
127. Ding H, Roncari L, Shannon P, Wu X, Lau N, Karaskova J, Gutmann DH, Squire JA, Nagy A, Guha A (2001) Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results

in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas. *Cancer Res* 61 (9):3826-3836.

128. Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW (1994) Pathways leading to glioblastoma multiforme: A molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg* 81:427-436.

129. Fischer I, Gagner J, Law M, Newcomb E, Zagzag D (2005) Angiogenesis in gliomas: Biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol* 15(4):297-310.

130. Ernst T, Hennig J (1995) Improved water suppression for localized in vivo 1h spectroscopy. *J Magn Reson B* 106 (2):181-186.

131. Simões RV, Delgado-Goni T, Lope-Piedrafita S, Arús C (2010) 1h-mrsi pattern perturbation in a mouse glioma: The effects of acute hyperglycemia and moderate hypothermia. *NMR Biomed* 23 (1):23-33.

132. Hall Me (1999) Correlation-based feature subset selection for machine learning: Hamilton, new zealand: University of waikato.

133. Garcia-Gomez JM, Luts J, Julia-Sape M, Krooshof P, Tortajada S, Robledo JV, Melssen W, Fuster-Garcia E, Olier I, Postma G, Monleon D, Moreno-Torres A, Pujol J, Candiota AP, Martinez-Bisbal MC, Suykens J, Buydens L, Celda B, Van Huffel S, Arus C, Robles M (2009) Multiproject-multicenter evaluation of automatic brain tumor classification by magnetic resonance spectroscopy. *MAGMA* 22 (1):5-18.

134. De Edelenyi FS, Rubin C, Esteve F, Grand S, Decorps M, Lefournier V, Le Bas JF, Remy C (2000) A new approach for analyzing proton magnetic resonance spectroscopic images of brain tumors: Nosologic images. *Nat Med* 6 (11):1287-1289.

135. De Vos M, Laudadio T, Simonetti AW, Heerschap A, Van Huffel S (2007) Fast nosologic imaging of the brain. *J Magn Reson* 184 (2):292-301.

136. Herminghaus S, Pilatus U, Moller-Hartmann W, Raab P, Lanfermann H, Schlote W, Zanella FE (2002) Increased choline levels coincide with enhanced proliferative activity of human neuroepithelial brain tumors. *NMR Biomed* 15 (6):385-392.

137. Doblaz S, He T, Saunders D, Hoyle J, Smith N, Pye Q, Lerner M, Jensen R, Towner R (2012) In vivo characterization of several rodent glioma models by 1h mrs. *NMR Biomed* 25(4):685-694.

138. (SC) S, 3.9 V [Http://gabrmn.Uab.Es/sc](http://gabrmn.Uab.Es/sc). Accessed Mayo 5 2012.

139. Candiota AP, Majos C, Bassols A, Cabanas ME, Acebes JJ, Quintero MR, Arus C (2004) Assignment of the 2.03 ppm resonance in in vivo 1h mrs of human brain tumour cystic fluid: Contribution of macromolecules. *Magn Reson Mater Phy* *MAGMA* 17 (1):36-46.

140. Reilly K, DA. L, Bronson R, McLaughlin M, Jacks T (2000) Nf1;trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects. *Nat Genet* 26(1):109-113.

141. Ciezca M (2011) Optimization of the pcr-based genotyping of the low grade astrocytoma gfap-v12ha-ras transgenic mice model. Master of biochemistry. Universitat Autònoma de Barcelona.

142. Ginsberg L, Fuller G, Hashmi M, Leeds N, Schomer D (1998) The significance of lack of mr contrast enhancement of supratentorial brain tumors in adults: Histopathological evaluation of a series. *Surg Neurol* Apr;49(4):436-440.
143. Muñoz D, Meir EG, Agnihotri S, Guha A (2009) Transgenic mouse models of cns tumors: Using genetically engineered murine models to study the role of p21-ras in glioblastoma multiforme. In: *Cns cancer. Cancer drug discovery and development.* Humana Press Chapter 4: Part 1:: 61-76.
144. Shannon P, Sabha N, Lau N, Kamnasaran D, Gutmann DH, Guha A (2005) Pathological and molecular progression of astrocytomas in a gfp:12v-ha-ras mouse astrocytoma model. *Am J Pathol* 167:859-867.
145. Giraldi T, Zorzet S, Perissin L, Rapozzi V (2000) Stress and chemotherapy. Combined effects on tumor progression and immunity in animal models. *Ann N Y Acad Sci* 917:549-559.
146. Jason G, Pajurkova E, Taenzer P, Bultz B (1997) Acute effects on neuropsychological function and quality of life by high-dose multiple daily fractionated radiotherapy for malignant astrocytomas: Assessing the tolerability of a new radiotherapy regimen. *Psychooncology* 6(2):151-157.
147. Nelson S, Huhn S, Vigneron D, Day M, Wald L, Prados M, Chang S, Gutin P, Sneed P, Verhey L, Hawkins R, Dillon W (1997) Volume mri and mrsi techniques for the quantitation of treatment response in brain tumors: Presentation of a detailed case study. *J Magn Reson Imaging* 7(6):1146-1152.
148. Delgado-Goñi T, Martin-Sitjar J, Acosta M, Lope-Piedrafita S, Arús C (2011) Dmso-based contrast for monitoring gbm response to therapy. *Magn Reson Mater Phy* 24 (S1):119-120.
149. Chen R (2010) A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 17(4):362-375.
150. Schold SJ, Friedman HS. (1984) Human brain tumor xenografts. *Prog Exp Tumor Res* 28:18-31.
151. Engebraaten O, Hjortland G, Hirschberg H, Fodstad O (1999) Growth of precultured human glioma specimens in nude rat brain. *J Neurosurg* 90(1):125-132.
152. Liu H, Yang H, Hua M, Wei K (2012) Enhanced therapeutic agent delivery through magnetic resonance imaging-monitored focused ultrasound blood-brain barrier disruption for brain tumor treatment: An overview of the current preclinical status. *Neurosurg Focus* Jan;32(1) (:1432-54).
153. Peterson D, Sheridan P, Brown WE J (1994) Animal models for brain tumors: Historical perspectives and future directions. *J Neurosurg* 80(5):865-876.
154. Cha S (2003) Perfusion mr imaging: Basic principles and clinical applications. *Magn Reson Imaging Clin N Am*:403-413.

155. Law M, Yang S, Wang H, Babb J, Johnson G, Cha S, Knopp E, Zagzag D (2003) Glioma grading: Sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion mr imaging and proton mr spectroscopic imaging compared with conventional mr imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 24(10):1989-1998.
156. Jenkinson M, Du Plessis D, Walker C, Smith T (2007) Advanced mri in the management of adult gliomas. *Br J Neurosurg* 21(6):550-561.
157. Price S (2007) The role of advanced mr imaging in understanding brain tumour pathology. *Br J Neurosurg* 21(6):562-575.
158. Jain R, di Tomaso E, Duda D, Loeffler J, Sorensen A, Batchelor T (2007) Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* 8(8):610-622.
159. Irure Yoldi A (2012) Paramagnetic gd-based gold glyconanoparticles as probes for magnetic resonance imaging phd thesis. CIC-BIOMAGUNE, San Sebastian.
160. Laurent S, Vander EL, Muller R (2006) Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents. *Contrast Media & Molecular Imaging* 1(3):128-137.
161. Cai W, Wan J (2007) Facile synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles in liquid polyols. *J Colloid Interface Sci* 305 (2):366-370.
162. Miguel-Sancho N, Bomati-Miguel O, Colom G, Salvador J-P, Marco M-P, Santamaría J (2011) Development of stable, water-dispersible, and biofunctionalizable superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemistry of materials* 23:2795-2802.
163. Jun Y, Huh Y, Choi J, Lee J, Song H, Kim S, Yoon S, Kim K, Shin J, Suh J, Cheon J (2005) Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. *J Am Chem Soc* 127 (16):5732-5733.
164. Robinson SP, McIntyre DJ, Checkley D, Tessier JJ, Howe FA, Griffiths JR, Ashton SE, Ryan AJ, Blakey DC, Waterton JC (2003) Tumour dose response to the antivascular agent zd6126 assessed by magnetic resonance imaging. *Br J Cancer* 88 (10):1592-1597.
165. Evelhoch JL (1999) Key factors in the acquisition of contrast kinetic data for oncology. *J Magn Reson Imaging* 10 (3):254-259.
166. Hoffmann U, Brix G, Knopp MV, Hess T, Lorenz WJ (1995) Pharmacokinetic mapping of the breast: A new method for dynamic mr mammography. *Magn Reson Imaging* 33 (4):506-514.
167. Caravan P (2009) Influence of molecular parameters and increasing magnetic field strength on relaxivity of gadolinium and manganese- based t1 contrast agents. *Contrast Media & Molecular Imaging* 100 (7):4:89.
168. Rozijn T, Van der Sanden B, Heerschap A, Creyghton J, Boveé W (1999) Determination of in vivo rat muscle gd-dtpa relaxivity at 6.3 t. *Magn Reson Mater Phy* 9 (1-2):65-71.
169. Corot C, Robert P, Idée J, Port M (2006) Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 58 (14):1471-1504.

170. Muller R, Elst L, Roch A, Peter J, Csajbok E, Gillis P, Gossuin Y (2005) Relaxation by metal-containing nanosystems. *Adv Inorg Chem* 57:239-292.
171. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K (2000) Tumor vascular permeability and the epr effect in macromolecular therapeutics. *J Control Release* 65:271-284.
172. Malakoutikhah M, Teixidó M, Giralt E (2011) Shuttle-mediated drug delivery to the brain. *Angew Chem Int Ed Engl* 50:7998-8014.
173. McCarthy R, Weissleder R (2008) Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Therapy Adv Drug Deliv* 60 (:1241-1251).
174. De la Fuente J, Barrientos A, Rojas T, Rojo J, Cañada J, Fernández A, Penadés S (2001) Gold glyconanoparticles as water-soluble polyvalent models to study carbohydrate interactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 40:2257-2261.
175. De la Fuente J, Penadés S (2006) Glyconanoparticles: Types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science. *Biochim Biophys Acta* 1760:2293-2352.
176. Barrientos A, De la Fuente J, Jiménez M, Solís D-, FJ. C, Martín-Lomas M, Penadés S (2009) Modulating glycosidase degradation and lectin recognition of gold glyconanoparticles. *Carbohid Re* 344:1474-1478.
177. Marradi M, Martín-Lomas M, Penadés S (2010) Glyconanoparticles: Polyvalent tools to study carbohydrate-based interactions. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 64:211-290.
178. Rojo J, Días V, de la Fuente J, Segura I, Barrientos A, Hans H, Riese HH, Bernad A, Penadés S (2004) Gold glyconanoparticles as new tools in antiadhesive therapy. *ChemBiochem* 5:291-297.
179. Boisselier E, Astruc D (2009) Gold nanoparticles in nanomedicine: Preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev* 38:1759-1782.
180. Hatanaka H (1974) Transport of sugar in tumor cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 355:77-104.
181. Flynn J, Wang L, Gillespie D, Stoddard G, Reid J, Owens J, Ellsworth G, Salzman K, Kinney A, Jensen R (2008) Hypoxia-regulated protein expression, patient characteristics and preoperative imaging as predictors of survival in adults with glioblastoma multiforme. *Cancer* 113 (5):1032-1042.
182. Luciani A, Olivier J-C, Clement O, Siuave N, Brillet P-Y, Bessoud B, Gazeau F, Uchegbu I, Khan E, Frija G, Cuenod C (2004) Glucose-receptor mr imaging of tumors: Study in mice with pegylated paramagnetic niosomes. *Radiology* 234:135-142.
183. de Lussanet QG, Langereis S, Beets-Tan RG, van Genderen MH, Griffioen AW, van Engelshoven JM, Backes WH (2005) Dynamic contrast-enhanced mr imaging kinetic parameters and molecular weight of dendritic contrast agents in tumor angiogenesis in mice. *Radiology* 235 (1):65-72.

184. Barrett T, Kobayashi H, Brechbiel M, Choyke PL (2006) Macromolecular mri contrast agents for imaging tumor angiogenesis. *Eur Radiol* 60 (3):353-366.
185. Jacques G, Cormac O (2013) Central nervous system tumors. *Handb Clin Neurol* 112:931-958.
186. Albanese C, Rodriguez O, VanMeter J, Fricke S, Rood B, Lee Y, Wang S, Madhavan S, Gusev Y, Petricoin Er, Wang Y (2013) Preclinical magnetic resonance imaging and systems biology in cancer research: Current applications and challenges. *Am J Pathol Feb*;182(2):312-318.
187. McConville P, Hambardzumyan D, Moody J, Leopold W, Kreger A, Woolliscroft M, Rehemtulla A, Ross B, Holland E (2007) Magnetic resonance imaging determination of tumor grade and early response to temozolomide in a genetically engineered mouse model of glioma. *Clin Cancer Res May* 15;13(10)::2897-2904.
188. <http://pubs.Acs.Org/doi/ipdf/10.1021/ar2000138>.

ANEXOS

ANEXO 1: Clasificación WHO de Tumores del Sistema Nervioso Central [30]

TUMOURS OF NEUROEPITHELIAL TISSUE

Astrocytic tumours

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

Oligodendroglial tumours

Oligodendroglioma	9450/3
Anaplastic oligodendroglioma	9451/3

Oligoastrocytic tumours

Oligoastrocytoma	9382/3
Anaplastic oligoastrocytoma	9382/3

Ependymal tumours

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

Choroid plexus tumours

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

Other neuroepithelial tumours

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

Neuronal and mixed neuronal-glial tumours

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

Tumours of the pineal region

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

Embryonal tumours

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

TUMOURS OF CRANIAL AND PARASPINAL NERVES

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

Neurofibroma	9540/0
Plexiform	9550/0

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

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

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

ANEXO 2:

Principales resonancias de metabolitos que pueden detectarse por ERM de¹H *in vivo* a 1,5 T en cerebro humano, normal y/o patológico (Reproducido de [50,51].

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

ANEXO 3:

Protocolo de Inspección Semanal de Animales

IP: Colonias (ratones):

C. Arús

S(>8 semanas edad), P y R (>4 semanas edad)

Fecha:	Sala:	Jaula:	Animal:	Colab. SE:
___ / ___ / _____	_____	_____	_____	_____
(dd/mm/aaaa)				

Observaciones:

	SI
Comportamiento anormal	<input type="checkbox"/>
Movilidad anormal	<input type="checkbox"/>
Paresia: _____	<input type="checkbox"/>
Parálisis: _____	<input type="checkbox"/>
Anomalias oculares	<input type="checkbox"/>
Crisis epiléptica	<input type="checkbox"/>
Tumoraciones: _____	<input type="checkbox"/>

Otras observaciones:

Número Full Estabulari: _____

ANEXO 4

Cultivo de gliosferas a partir de tejido

Material y reactivos

- MEDIO CONTROL (500ML)

PRODUCTO	CANTIDAD	REFERENCIA
DMEM	250ML	SIGMA D5671
F12	250ML	GIBCO 21765-037
30% GLUCOSA	6ML	SIGMA G7021
1M HEPES	2,5ML	GIBCO 15630-056
L-GLUTAMINA/ PEN-ESTREPT*	5ML	GIBCO 10378-016
HEPARINA 0,2%	1ML	SIGMA H3149
BSA (1)	2GR	SIGMA B4287
N2 SUPPLEMENT (2)	5ML	GIBCO 17502-048

*Pen-estrep= Penicilina/esreptomocina

(1): NO AGITAR DESPUÉS DE AÑADIRLA AL MEDIO, INCUBAR A 37°C HASTA QUE SE DISUELVA Y LUEGO SE FILTRA TODO POR FILTRO DE 0,2 MICRAS

(2): SE AÑADE A LA BOTELLA DESPUÉS DE FILTRAR

- MEDIO COMPLETO, AÑADIR AL MEDIO CONTROL:

PRODUCTO	CANTIDAD PARA 50 ML	REFERENCIA	STOCK	PREPARACIÓN
EGF 20NG/ML	250µL	INVITROGEN 53003-018	4µG/ML	ALICUOTAR A -20°C
FGF 10NG/ML	20µL	SIGMA F0291	25µG/ML	ALICUOTAR A -20°C

- PIPETAS PASTEUR
- PIPETAS
- BISTURIS
- FILTROS (BD FALCON 40 µMREF 352340)
- TUBOS CÓNICOS
- PUNTAS
- PLACAS T75

Procedimiento:

- Disgregar mecánicamente la muestra del tumor (tanto si proviene de muestra congelada como si proviene del animal sacrificado en ese mismo momento) con la ayuda de bisturí y pipetas pasteur.
- Recoger el tejido con medio control y pasarlo a un tubo cónico.
- Centrifugar 8 minutos a 1000g.
- Eliminar el sobrenadante y volver a pipetear el *pellet* para disgregarlo.
- Resuspender el *pellet* en medio completo y sembrar en placas T75 (si se puede contar 750.000 células/flascon).
- Mantener en incubador a 37°C y 5% O₂
- Filtrar utilizando filtros de 40µM “caso necesario”.
- Estas células serán de pase 0 (P0).
- Pasar las células una vez se hayan formado gliosferas en la quinta división esto será el (P1)
- Para pasar las gliosferas recoger el medio en un tubo cónico.
- Añadir un poco más de medio al frasco o placa para acabar de recoger todas las gliosferas.
- Centrifugar 8 minutos a 750g.
- Eliminar el sobrenadante.
- Añadir 100µl de medio y pipetear unas 40 veces.
- Resuspender en 1ml de medio completo.
- Sacar 10µl y contar las células vivas con azul de tripán.
- Sembrar en las placas que corresponda con medio completo.
 - 750.000 células 1T75
 - 250.000 células 1T25

ANEXO 5

A la izquierda VOI de adquisición (cuadrado amarillo) para las secuencias IERM (12 ms TEC) superpuesto a la imagen de adquisición de referencia (T_{2W} HR). El VOI a mayor aumento se muestra en el centro, la línea punteada negra marca el límite de la masa anómala. A la derecha se muestra un mapa en escala de color de la intensidad de DMSO detectada en el VOI 88 minutos tras la administración. Se puede observar una clara acumulación del DMSO dentro del tumor comparado con el parénquima peritumoral.

