

### 4.3.3 Glutamat i Glutamina

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

El cas de glutamat i glutamina és més difícil que d'altres perquè hi ha una superposició molt gran de les ressonàncies i un patró resultant molt complex. Hi ha modulació parcial a 2/ 2,3 ppm amb molt solapament entre un metabòlit i altre (figura 4.53 A, B i C), i no hi ha prou resolució a baix camp (*in vivo*) per detectar aquesta diferència, sent per això generalment designats com *glx* que també inclou ressonàncies provinents del GABA. A més, la presència dels dos components (glu i gln) causa cancel·lació parcial d'alguns pics i l'espectre resultant és lleugerament diferent de l'espectre d'un i altre compost aïllats. Una de les coses interessants comprovades a l'estudi d'aquests mostres model és que el primer component de la ressonància a 2/2,08 ppm en els espectres *in vivo* de pacients era més elevat del que s'esperaria si es tractés només de glu/gln i es perdia considerablement després de l'extracció PCA.

La visibilitat relativament baixa del glu i gln per RMN és deguda a la distribució del senyal d'aquest compost entre diferents ressonàncies de baixa intensitat, al contrari d'altres compostos amb la mateixa concentració però que presenten una sola ressonància intensa. Michaelis i col (1991) han demostrat que és possible fer la distinció entre glu i gln per la modificació en el patró dels triplets (2,35 ppm – glu i 2,45 ppm – gln), però no sempre la qualitat espectral permet aquesta diferenciació; igualment, la presència de macromolècules pot emascarar aquesta distinció. En alguns casos és molt important la distinció del patró entre glu i gln com per exemple la cirrosi hepàtica. La característica espectral *glx* elevada és una important característica dels espectres de meningiomes, d'entre altres (Howe i Opstad, 2003; Cho i col, 2003; Majós i col, 2003).

Quant a la part de senyal a 2,08 ppm que no es recupera a l'extracció PCA, es podria tractar de compostos N-acetil diferents de NAA (Gadian i col, 1991) com igualment han citat alguns autors (Gill i col, 1990) hipotetitzant sobre la seva presència en tumors on no s'espera la presència de NAA com és el cas del meningioma (Tate i col, 2003). Una anàlisi més exhaustiva del possible origen del pic a 2,03 ppm es pot trobar a l'apartat dels líquids cístics (secció 4.1).

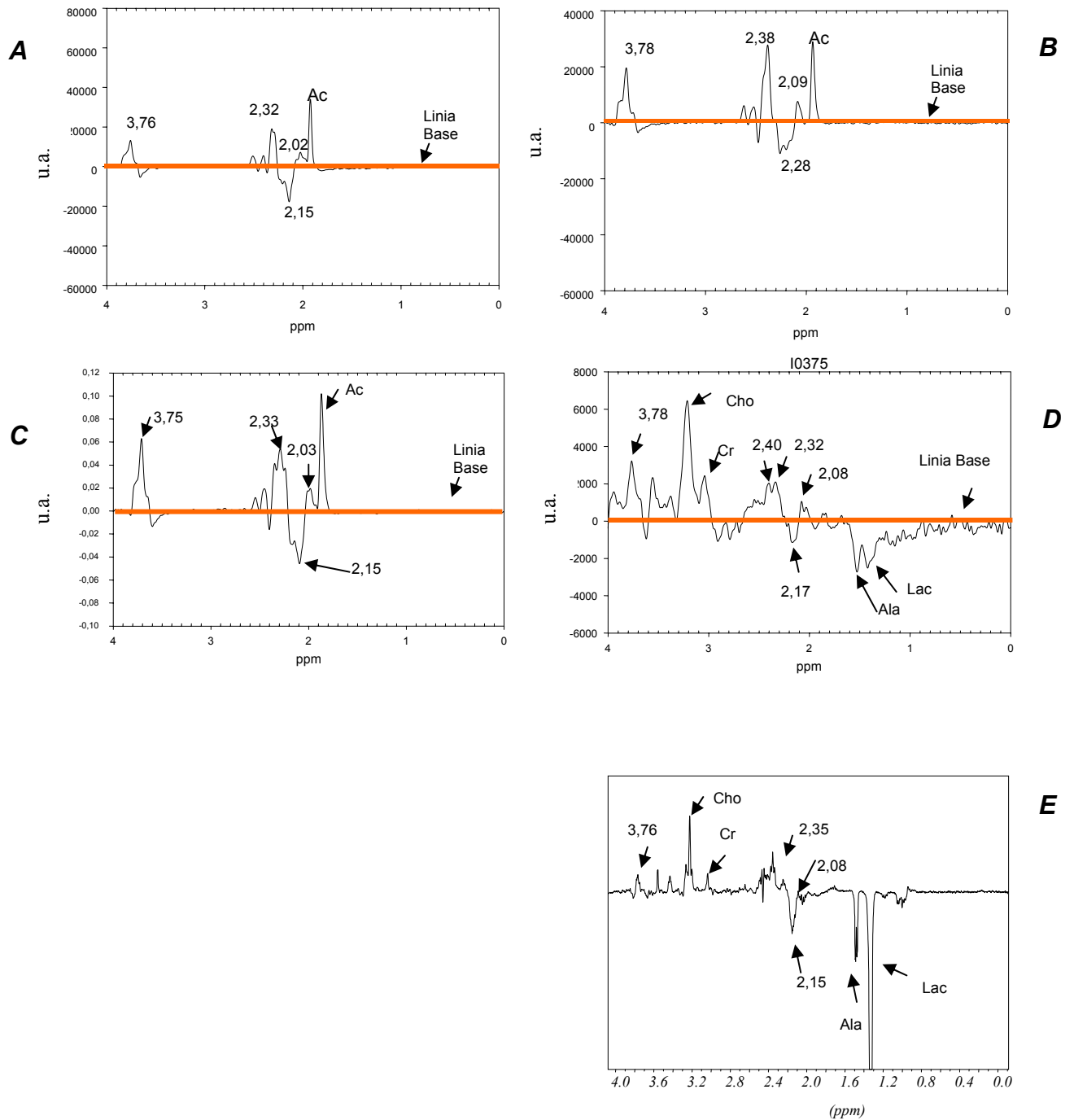


Figura 4.53: Espectres de dissolucions model realitzats a 1,5T amb seqüència PRESS a 136 ms amb A) glutamat i acetat, B) glutamina i acetat. C) Espectre promig realitzat amb la suma dels dos anteriors. D) Espectre *in vivo* amb la mateixa seqüència realitzat al pacient I0375, diagnosticat de meningioma. E) Espectre de l'extracte PCA realitzat amb la biòpsia del pacient I0375. Cal fixar-se en la disminució del component a 2,08 ppm. (u.a.= unitats arbitràries). Les dissolucions model tenien acetat (Ac) a 20 mM (veure taula 4.14 per assignacions).

#### 4.3.3.2 ESTUDIS *IN VITRO*

##### **GABA, glutamina i glutamat**

Els valors obtinguts en la quantificació de GABA, glutamina i glutamat als extractes PCA es mostra en la figura 4.54 (en les mostres adquirides prèviament a aquesta Tesi, el GABA no va ser quantificat). La discriminació entre els valors normals i els tumorals no ha estat estadísticament significativa per cap dels metabòlits. En una comparació bilateral dels meningiomes amb els altres tipus tumorals, la glutamina ha estat estadísticament significativa ( $p < 0,001$ ). El GABA, per als casos on estava disponible la quantificació, ha presentat tendència a la significació ( $p = 0,065$ ), el que dóna la idea de que aquests metabòlits podrien ser importants en discriminacions diferencials en que participessin meningiomes. Comparacions bilaterals dels meningiomes amb cadascun dels tipus tumorals han presentat diferents resultats: la glutamina va presentar diferències significatives entre meningioma vs oligodendroglioma, neurinoma, glioblastoma, metàstasis i medul·loblastoma ( $p < 0,05$ ), i va presentar tendència a la significació en la discriminació entre meningioma i astrocitoma III ( $p = 0,056$ ). El glutamat va presentar significació en la discriminació entre meningioma i oligodendroglioma i neurinoma ( $p < 0,05$ ). El GABA no va assolir significació estadística en aquestes comparacions bilaterals per als casos que disposaven d'aquest valor.

El GABA és un neurotransmissor inhibitor; concentracions alterades d'aquest compost estan associades amb problemes neurològics. Té senyals centrats a 1,89, 2,28 i 3,01 ppm, presentant solapament amb molts altres metabòlits (glutamat, creatina) (Govindaraju i col, 2000). Augmenta la seva concentració a parènquima cerebral, i potencialment en tumors, en condicions isquèmiques.

El glutamat és l'aminoàcid més abundant al cervell humà normal. Actua com a principal neurotransmissor excitatori (Alberts i col, 1989), però se li atribueixen altres funcions. El sistema de spin del glutamat resulta en un espectre complex de pics de baixa intensitat aparent a temps d'eco llarg (135/136 ms) encara que la seva concentració sigui alta. *In vivo*, hi ha un gran solapament amb les ressonàncies de GABA, NAA i glutamina (depenent del grup funcional considerat), el que dificulta la seva identificació específica en absència de seqüències d'edició espectral o bidimensionals. Els estudis *in vitro* col·laboren amb aquesta elucidació ja que a altes resolucions aquestes ressonàncies són perfectament distingibles.

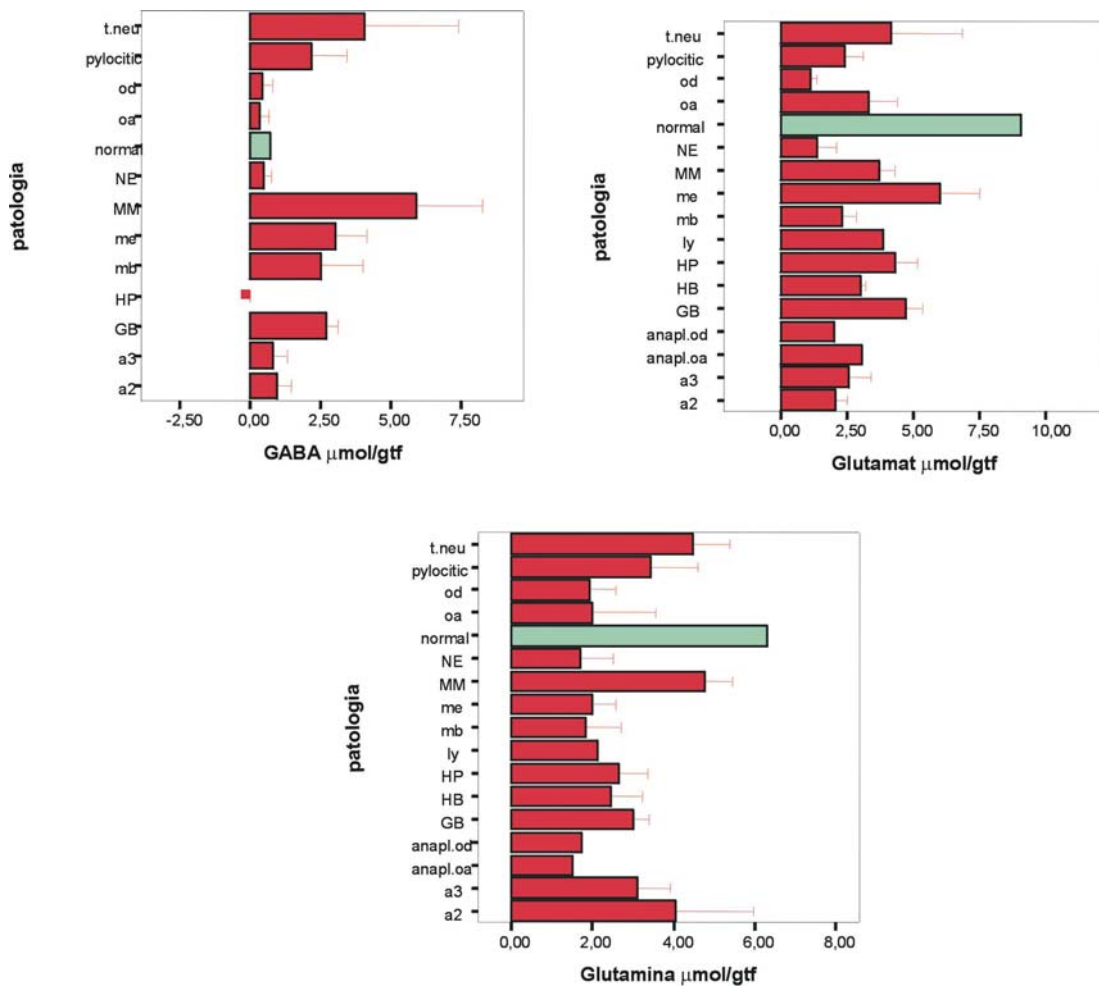


Figura 4.54: Promig  $\pm$  SEM dels valors de glutamat, glutamina i GABA per als diferents tipus tumorals. El GABA no ha estat quantificat a les mostres de oligodendroglioma anaplàstic i oligoastrocitoma anaplàstic (mostres analitzades prèviament a aquesta tesi dins del grup), per això no surt representat. Acrònims com a la figura 4.20.

La glutamina és un precursor i una forma d'emmagatzemament transitori de glutamat que participa al seu cicle de reciclatge entre neurones i glia al sistema nerviós. S'observen elevacions de la glutamina quan hi ha alteracions d'aquest cicle glutamat/glutamina, sent un eficient indicador de encefalopatia hepàtica. És estructuralment similar al glutamat, sent difícil la separació de les ressonàncies dels dos compostos als camps utilitzats habitualment per humans *in vivo*, per això s'acostuma descriure el pic sencer com glx (Govindaraju i col, 2000). Roda i col (2000) comenten que hi ha un metabolisme augmentat de la glutamina als tumors glials que podria ser responsable dels menors nivells detectats.

Florian i col (1995), estudiant extractes PCA de cultius cel·lulars de línies de tumors humans, van descriure que el contingut de glutamina en la línia tumoral de meningioma<sup>17</sup> era significativament més elevat que a les altres línies estudiades<sup>18</sup>. Els valors obtinguts en aquesta tesi també són significativament diferents al comparar meningiomes i glioblastomes ( $p < 0,05$ ) amb una concentració de glutamina més elevada als primers. Els mateixos autors també han trobat diferències significatives per glutamat i GABA, però els resultats obtinguts a aquesta Tesi no han assolit diferències estadísticament significatives, i la tendència del GABA ha estat la d'augment als meningiomes on s'ha quantificat aquest metabòlit, contràriament a Florian i col (1995) que reportaven una disminució.

Respecte a l'elevació de glx en meningiomes, Howe i Opstad (2003), afirmen que aquesta elevació es podria deure a una alteració en el metabolisme energètic, involucrant desamidació parcial de la glutamina (una font bastant comú d'energia per als tumors) a glutamat. Aquest glutamat acumulat seria necessari per l'acció de la transaminasa que, a partir del piruvat, generaria l'alanina, una característica espectral bastant típica de meningiomes (Manton i col, 1995).

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

##### **4.3.3.3.1 Discriminació entre astrocitomes, oligodendrogliomes i oligoastrocitomes**

##### **L'oligoastrocitoma presenta un patró espectral intermedi entre oligodendroglioma i astrocitoma ?**

Aquesta pregunta és difícil de respondre, perquè són tipus tumorals bastant propers. A més, un tumor oligoastrocític pot perfectament presentar més part astrocítica o oligodendrogliàl segons el lloc d'on s'obtingui la biòpsia (Kleihues i Cavenee 1997c), causant un error inherent a la tècnica. La figura 4.55 presenta *boxplots* dels valors trobats per a diferents metabòlits quantificats en oligodendrogliomes, oligoastrocitomes i astrocitomes de grau II. És interessant la diferència de patrons espectrals en el cas d'alanina, taurina, glutamat i NAA. La presència de NAA en oligodendrogliomes està d'acord amb dades de la

<sup>17</sup> Línies de meningiomes: IN1067, IN1069, IN1981, IN1114, IN1123, IN1239.

<sup>18</sup> Línies de glioblastomes: IN1351, IN1411, IN1510, IN2469, D54-MG; Línies de neuroblastomes: SK-N-MC, SK-N-SH, LAN-5.

bibliografia que comenta la seva presència en cèl·lules de precursors d'oligodendrocits (Bhakoo i Pearce, 2000) i també hipotetitza que els oligodendrocits *in vivo* podrien expressar aquest metabòlit. El GABA presenta força diferències entre un i altre tipus tumoral, però es podria deure parcialment a un efecte d'isquèmia.

Tot i que realment la ressonància glx sembla ser molt important en la discriminació d'aquests tipus tumorals, els estudis *in vitro* no han presentat diferències estadísticament significatives entre ells. Això possiblement es deu a que, *in vivo*, i sobretot a TE curt, aquesta zona presenta també ressonàncies de macromolècules que no s'extreuen per la tècnica de PCA.

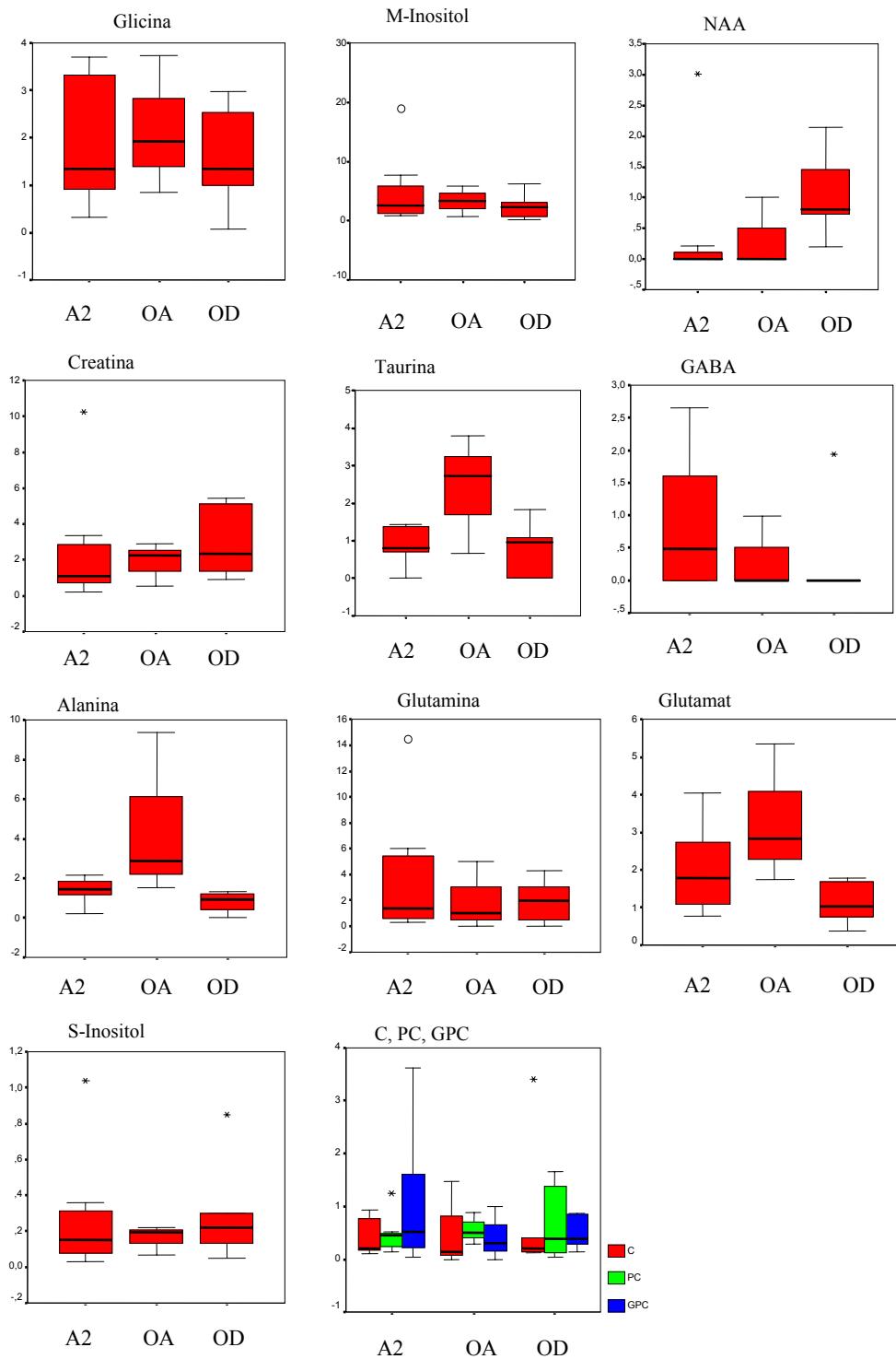


Figura 4.55: *Boxplots* dels valors de metabòlits calculats ( $\mu\text{mol/gtf}$ ) per astrocitomes de grau II, (a2, n=7) oligodendrogliomes (od, n=6) i oligoastrocitomes (oa, n=3). Detalls de la representació dels *boxplots* a la figura 4.9.

La zona de representació conjunta de GABA, glutamat i glutamina sembla ser bastant útil, combinada potser a la de m-Ino i gly, a la hora de discriminar entre tumors glials de baix

grau *in vivo* (astrocitomes grau II, oligoastrocitomes i oligodendroglomes), encara que la contribució del GABA *in vivo* és discutible degut a la possiblement baixa concentració. Aquests tipus tumorals poden ser de difícil discriminació *in vivo*. En el prototip científic INTERPRET hi ha emmagatzemats alguns representants del grup oligoastrocític que, com l'oligodendroglioma, no és molt nombrós. La figura 4.56A presenta una pantalla on es representen els tumors astrocítics de baix grau, oligodendroglials i oligoastrocítics. La representació es fa usant la ressonància a 3,57 ppm en la ordenada i la ressonància a 2,38 (glx, macromolècules) en l'abscissa. Es comencen a veure la formació de grups localitzats per cadascun dels tumors, però clarament no hi ha suficients dades per validar la possible utilitat discriminatòria de la representació gràfica emprada. A la figura 4.56B, es representen només els astrocitomes de grau II i oligodendroglomes, i la discriminació es fa utilitzant l'alçada a 2,77 ppm en l'abscissa. Totes les alçades són dels espectres a TE curt (20-32ms).

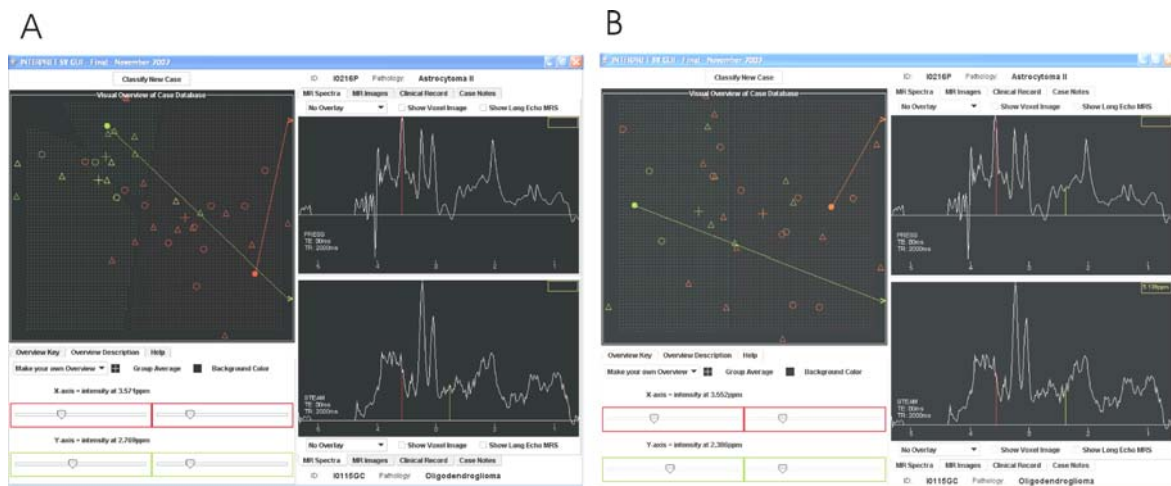


Figura 4.56: Pantalles del prototip científic INTERPRET on es representen A) els tumors astrocítics (punts vermells), oligodendroglials (punts verds) oligoastrocítics (punts gros) i B) astrocítics més oligodendroglials. A dalt es presenta un espectre d'astrocitoma i a baix, un d'oligodendrogloma. La representació es fa utilitzant A) alçada a 3,55 ppm en l'ordenada i a 2,38 en l'abscissa i B) alçada a 3,57 ppm en l'ordenada i 2,77 ppm en l'abscissa.

A la figura 4.57 es mostren els gràfics comparatius de valors trobats per astrocitomes de grau II i oligodendroglomes amb els valors de la literatura. No ha estat possible fer la comparació per a tots els metabòlits perquè no tots els autors quantifiquen els mateixos metabòlits analitzats en aquesta tesi. Als astrocitomes de grau II, es veu elevació d'alanina i de glutamina (en relació a glutamat). Hi ha bona coincidència entre els valors de NAA i creatina, disminuïts en relació al cervell normal.



Respecte als oligodendrogliomes, comparats als astrocitomes de grau II, no s'observa en aquests un augment tan elevat de la glutamina en relació al glutamat i en alguns valors no s'ha observat tanta coincidència. El nombre de casos era  $n=7$  per A2 i  $n=6$  per OD, tot i que seria millor treballar amb una  $n$  més elevada. Els tumors de baix grau, sobretot els astrocitomes de grau II, no sempre requereixen intervenció quirúrgica, disminuint així la seva representació en aquest univers.

No s'han trobat estudis a la literatura que es puguin fer servir per comparar els valors obtinguts amb els extractes d'oligoastrocitomes *in vitro*.

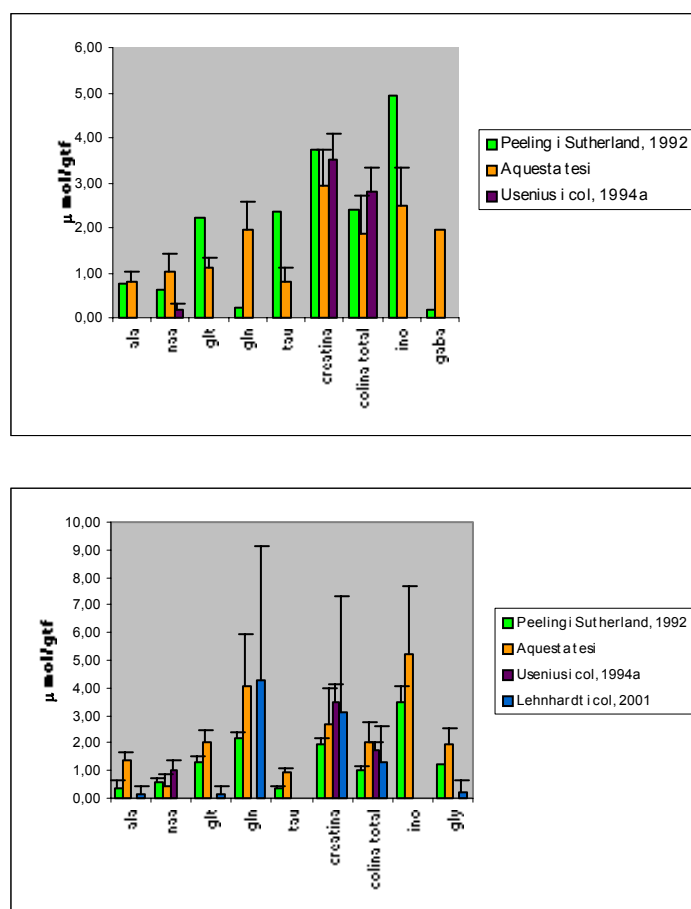


Figura 4.57: Comparació entre els valors obtinguts en aquesta tesi i a la literatura. A dalt, oligodendrogliomes. A baix, astrocitomes de grau II. Els valors són mitja +/- SEM, excepte per Lehnhardt i col, 2001 (mitja +/- SD).

La heterogeneïtat dels tumors infiltrants, com per exemple l'astrocitoma de grau II, pot influir en les característiques espectrals i també en la quantificació dels metabòlits. La tendència de presentar característiques intermèdies  $a2 \rightarrow oa \rightarrow od$  es verifica en molts casos, però no per alanina, taurina i glutamat, el que podria reflexar que és possible que realment hi

hagi un patró intermedi, o bé diferències rellevants entre les tres patologies segons el metabòlit observat. Els oligoastrocitomes, però, estan representats amb un nombre molt petit de mostres (n=3) i, si es vol establir un patró característic per a aquest tipus tumoral, en seran necessàries més.

#### 4.3.3.4 RECONeixEMENT DE PATRONS *IN VITRO*

##### 4.3.3.4.1 Astrocitomes grau II vs oligodendroglomes vs oligoastrocitomes

**Els oligoastrocitomes presenten un patró espectral intermedi entre astrocitomes i oligodendroglomes?**

Amb aquest anàlisi, el programa ha triat tan sols la variable NAA. La discriminació obtinguda amb aquesta variable no té un percentatge d'encert massa alt, situant-se a 62,5% per als casos agrupats i per LOO. Aquest valor se situa una mica per sobre de l'atzar i no es considera un bon resultat. S'ha intentat introduir glutamat i glutamina, donada la seva importància en la discriminació d'aquests tipus tumorals *in vivo*. El percentatge d'encert per validació creuada no es modifica, i el percent dels casos agrupats originals puja a 75%, però segueix havent-hi molta superposició entre astrocitomes II i oligoastrocitomes. La pantalla de representació de les puntuacions discriminants es mostra a la figura 4.58.

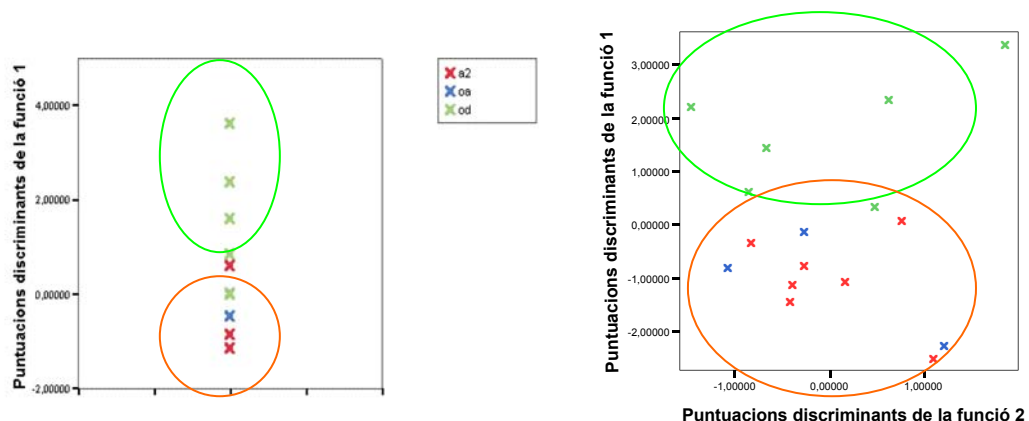


Figura 4.58: Representació gràfica de les puntuacions obtingudes en l'anàlisi discriminant d'astrocitomes, oligodendroglomes i oligoastrocitomes *in vitro*. Esquerra, anàlisi amb lliure tria de variables; el programa només dóna una funció i la separació es fa a l'eix de les Y. dreta, anàlisi amb NAA, glutamat i glutamina. Els òvals indiquen aproximadament la regió ocupada per cada tipus tumoral, indicant bastant superposició dels casos d'oligoastrocitoma amb els astrocitomes de grau II.

#### 4.3.4 Altres metabòlits i correlacions *in vivo/in vitro*

##### 4.3.4.1 N-ACETIL ASPARTAT (NAA)

Els valors obtinguts per la quantificació de NAA als extractes de biòpsies s'ensenya a la figura 4.59. El valor per a cervell normal és decididament superior; tots els altres tipus tumorals tenen concentracions disminuïdes o bé indetectables de NAA. El test de Mann-Whitney de cervell normal *versus* tots els tumors agrupats resulta estadísticament significatiu amb  $p < 0,05$ . El mateix test en comparacions bilaterals de normal *versus* cada tipus tumoral dóna estadísticament significatiu per a glioblastoma, meningioma i hemangiopericitoma ( $p < 0,05$ ). Hi ha tendència a la significació ( $0,05 < p < 0,1$ ) per normal, comparat a astrocitoma grau II, neurinoma i hemangioblastoma. El NAA està present al cervell normal en concentracions relativament altes. És un marcador neuronal (Castillo i col, 1998), però la funció d'aquest compost no està clara (Danielsen i Ross, 1999). És possible que funcioni com osmolit, com una forma d'emmagatzemament d'aspartat, precursor de N-acetil aspartat glutamat (NAAG), entre altres funcions (Govindaraju i col, 2000; Baslow, 1999).

La detecció de NAA en un extracte PCA pot ser resultant de parènquima normal infiltrat pel tumor, o bé resultat de l'expressió de marcadors metabòlics neuronals per cèl·lules astrocítiques tumorals (Carpinelli i col, 1996). Segons Castillo i col (1998), tumors no neuroectodèrmics (com els meningiomes) no presenten NAA.

En general, el NAA està disminuït en pràcticament totes les situacions patològiques, excepte certes malalties, com la malaltia de Canavan (Danielsen i Ross, 1999). Alteracions en la concentració de NAA sense assumir un patró clarament tumoral es poden donar en casos com el de gliomatosis cerebrí (Galanaud i col, 2003, figura 4.60), una patologia molt difosa i que afecta als dos lòbuls cerebrals simultàniament.

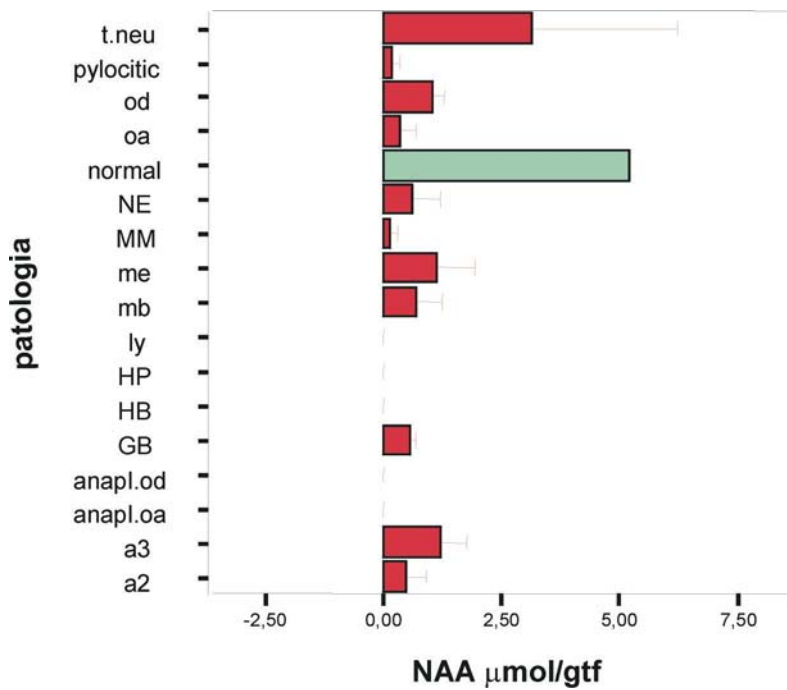


Figura 4.59: Promig  $\pm$  SEM dels valors de NAA per als diferents tipus tumorals. Acrònims com a la figura 4.20

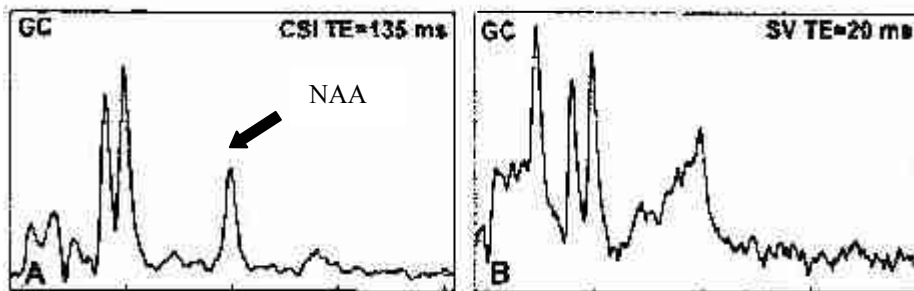


Figura 4.60: Espectres a TE llarg (A) i curt (B) de gliomatosis cerebrí. Adaptat de Galanaud et al, 2003

#### 4.3.4.2 CREATINA

Els valors obtinguts per a creatina en extractes PCA al laboratori GABRMN es mostren al gràfic de barres de la figura 4.61. El comportament general s'assembla a l'observat al NAA, amb el valor de parènquima normal sent superior als valors de tumors, encara que la disminució no sigui tan evident com la de NAA. Els tests estadístics de comparació de mitges no han donat resultats estadísticament significatius per a cervell normal *versus* altres tipus de tumors.

Degut a l'alta probabilitat d'hidròlisi de la fosfocreatina a creatina abans de l'extracció PCA degut al temps d'isquèmia, el senyal observat *in vitro* a 3,03 i 3,93 ppm es deu únicament a creatina (Gill i col, 1990). Segons Kinoshita i Yokota (1997), la concentració *in vitro* de la creatina podria ser superior a la concentració *in vivo*. Això s'explicaria per la "visibilitat" limitada de la creatina per RMN *in vivo* degut a la seva associació transitòria amb proteïnes o membranes. La disminució o absència de creatina als tumors és un fet acceptat i característic d'aquests. La fosfocreatina actua com una reserva per a la generació d'ATP, estant altament relacionada amb el sistema de subministrament i esmorteïment de la demanda energètica a la cèl·lula (Danielsen i Ross, 1999). Aquest pic és un singlet que no modula amb el temps d'eco i per això és usat com a referència a la hora de calcular moltes quocients, com és el cas de la quocient 3,55/3,03 abastament comentada en aquesta tesi.

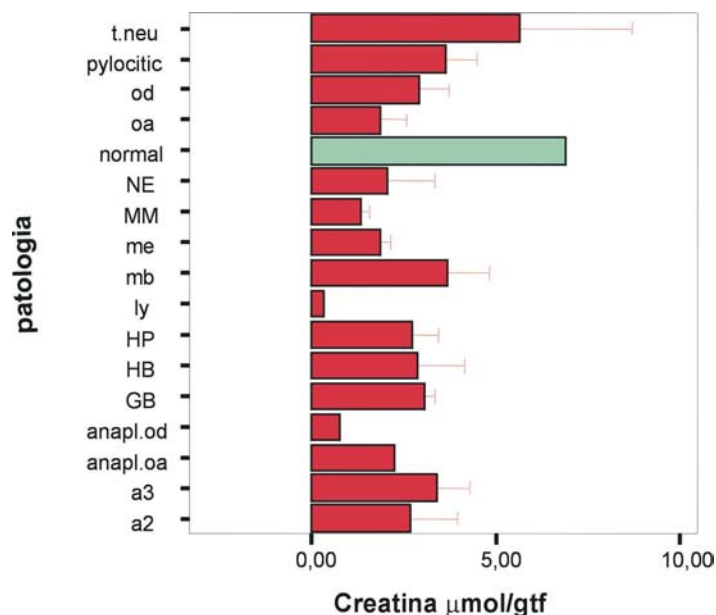


Figura 4.61: Promig  $\pm$  SEM dels valors de creatina per als diferents tipus tumorals. Acrònims com a la figura 4.20.

Comparant els valors obtinguts en aquesta tesi amb alguns dels valors citats per la literatura, ens trobem que en la majoria dels casos la literatura cita valors més baixos, però també han fet servir una 'n' en molts casos inferior a la nostra. A més, normalment no es fan controls interns de les pèrdues durant el procés d'extracció amb PCA, cosa que si s'ha fet en aquesta Tesi.

La figura 4.62 ensenya la comparació gràfica entre els valors aquí calculats i els obtinguts per Czernicki i col, 2000; com aquest autor ha analitzat genèricament 'gliomes d'alt

grau' i meningiomes, a efectes de comparació s'han promitjat els valors dels astrocitomes de grau III i glioblastomes.

#### 4.3.4.2.5 NAA, Creatina i la classificació tumor *versus* no tumor

El NAA i la creatina són característiques espectrals molt importants a la hora de fer la distinció entre cervell normal i cervell tumoral. La figura 4.63 ensenya una pantalla de visualització del prototip científic desenvolupat en el projecte INTERPRET. Aquí es poden fer visualitzacions personalitzades com aquesta, que és una representació bidimensional de l'alçada a 2,00 (NAA) ppm i 3,03 ppm (creatina), on clarament es veu un grup format pels punts de voluntaris normals (a la dreta, punts blancs) i un grup format pels casos de tumors (a l'esquerra). Casos localitzats en la zona limítrofa haurien de ser investigats com a possible parènquima cerebral anòmal però no tumoral.

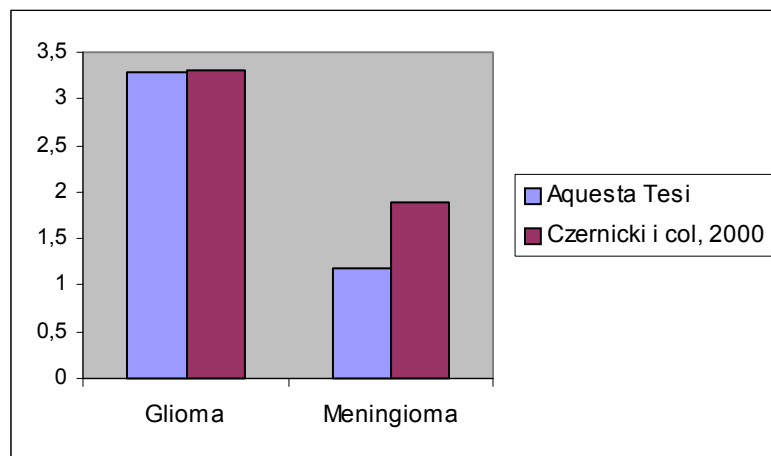


Figura 4.62: Comparació entre els valors obtinguts en aquesta tesi per creatina ( $\mu\text{mol/gtf}$ ) amb valors de la literatura.

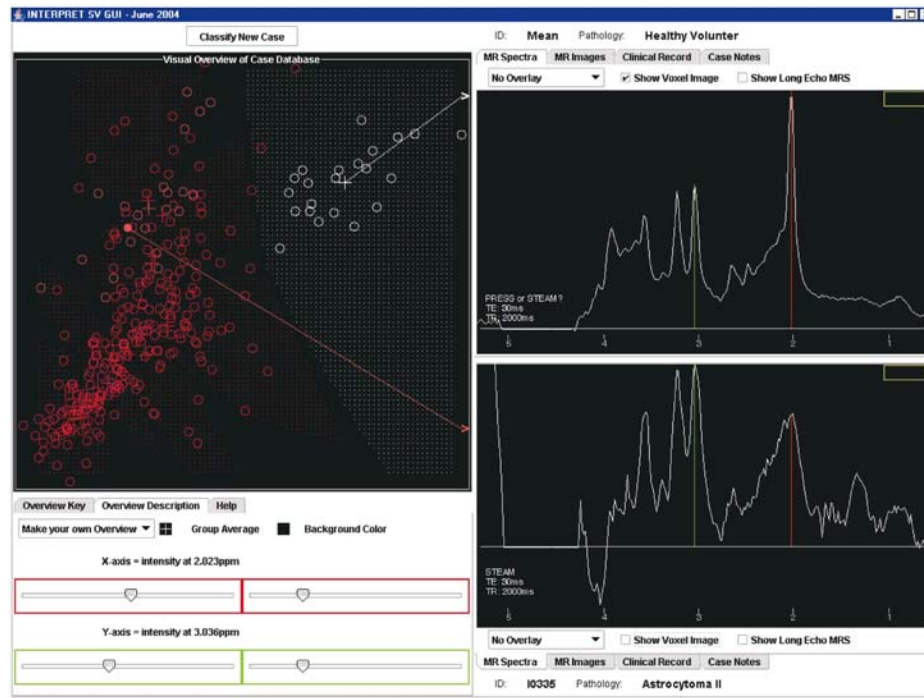


Figura 4.63: Exemple de pantalla del prototip INTERPRET i la representació alçada NAA vs. alçada creatina. A dalt, s'ensenya un espectre d'un voluntari de cervell normal i a baix, un espectre d'un cas d'astrocitoma grau II.

#### 4.3.4.3 ALANINA

La figura 4.64 reflexa els valors observats als diferents tipus tumorals per a alanina. Sense excepció, tots els valors de tumors són superiors als valors esperats per a cervell normal. El test de Mann Withney comparant cervell normal amb cada tipus de tumor ha indicat tendència a la significació estadística en els casos de normal *versus* meningioma i glioblastoma, ambdós amb  $0,05 < p < 0,1$ . Els meningiomes tenen indiscutiblement valors més alts *in vitro* quan comparats als glioblastomes; els tests estadístics de meningiomes *versus* altres tipus de tumors han donat significatius amb  $p < 0,05$  per a oligodendroglioma, astrocitoma grau III i neurinoma, i tendència a la significació per a la discriminació entre meningioma i cervell normal ( $p=0,094$ ).

Altres tumors amb elevació de l'alanina són metàstasis, glioblastomes, oligoastrocitomes i tumors neuroectodèrmics. Roda i col (2000) utilitzen l'alanina com a discriminador entre metàstasis i astrocitomes d'alt grau, combinada amb la ressonància de la glutamina, taurina i colina. Aquests mateixos autors presenten, al seu estudi, valors d'alanina superiors per astrocitomes d'alt grau quan comparat a neurinomes. Els promitjos en aquesta

tesi són de  $3,24 \pm 0,54$   $\mu\text{mol/gtf}$  per als astrocitomes d'alt grau (A3+GB,  $n=67$ ) i  $1,25 \pm 0,31$  per als neurinomes ( $n=5$ ), estadísticament significatiu amb un  $p < 0,01$ . Peeling i Sutherland (1992), contràriament, troben valors de  $0,92 \pm 0,13$   $\mu\text{mol/gtf}$  per astrocitomes d'alt grau ( $n=14$ ) i 1,16 per neurinomes, però que ha resultat d'una 'n' molt petita ( $n=1$ ), mentre els valors d'aquesta tesi provenen d'un conjunt de 5 mostres.

Les comparacions bilaterals dels valors de metàstasis vs altres tipus de tumors han resultat en diferències significatives per a oligodendroglioma ( $p=0,036$ ) i astrocitoma grau III ( $p=0,031$ ).

L'alanina és un aminoàcid no essencial detectable per RMN en forma de doblet a 1,48 ppm. i quadruplet a 3,77 ppm. S'observen valors elevats *in vivo* en meningiomes i després d'isquèmia (Govindaraju i col, 2000). Florian i col (1995), en un estudi amb cultius cel·lulars seguits d'extracció PCA, diuen que l'alanina està més elevada a la línia cel·lular de meningioma que a les altres línies estudiades (glioblastoma, neuroblastoma), obtenint una diferència estadísticament significativa. Els valors obtinguts en aquest treball no permeten una separació amb diferència estadísticament significativa entre els valors de glioblastomes i meningiomes ( $p=0,533$ ). Peeling i Sutherland (1992) suggereixen que una disminució del flux a través del cicle dels àcids tricarboxílics (TCA) en les cèl·lules tumorals pot induir a una major activitat de la glicólisis anaeròbia amb la conseqüent formació de piruvat. L'acció de l'enzim transaminasa sobre el piruvat seria, en última instància, responsable per l'augment de l'alanina.

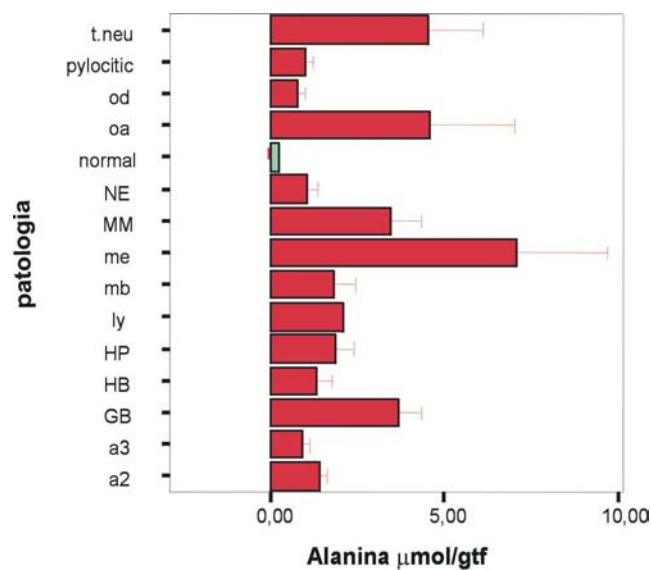


Figura 4.64: Promig  $\pm$  SEM dels valors d'alanina per als diferents tipus tumorals. Acrònims com a la figura 4.20.



#### 4.3.4.4 COLINA I COMPOSTOS RELACIONATS

La quantificació dels components del pic de colina<sup>19</sup>, contràriament al que passa *in vivo*, és possible *in vitro* gràcies a una millor resolució i separació dels diferents components. Els valors obtinguts per a aquestes mostres estan representats a la figura 4.65. La comparació dels valors per a cervell normal *versus* els altres tipus de tumors no ha assolit diferències estadísticament significatives. La comparació bilateral d'astrocitomes de diferent grau, però, ha resultat significativa per a la discriminació entre astrocitoma de grau III i glioblastoma (colina,  $p=0,003$ ; fosfocolina,  $p=0,001$ ). També hem dividit els tumors entre més i menys proliferatius, formant dos grups com es mostra a la taula 4.24. Una comparació bilateral entre aquests dos grups no dóna, però, estadísticament significativa per als metabòlits de colina.

Grup	Patologies incloses
Molta proliferació	Glioblastoma, metàstasis, medul·loblastoma, hemangiopericitoma, astrocitoma grau III, oligodendroglioma i oligoastrocitoma anaplàstics, limfoma, tumor neuroectodèrmic
Poca proliferació	Astrocitoma pilocític, astrocitoma grau II, oligodendroglioma, oligoastrocitoma, neurinoma, meningioma.

Taula 4.24: Grups formats segons la capacitat proliferativa del tumor per a la comparació del contingut en metabòlits de colina.

És controvertida la discussió respecte als components del pic de colina *in vivo*. Hi ha consens respecte a la presència de colina, fosfocolina i glicerofosfocolina. Usenius i col (1994b) observen que, encara que realment hi ha un augment en la ressonància de colina en molts tipus tumorals, pot haver-hi una participació en el origen de la ressonància de colina detectada *in vivo* per metabòlits contenint colina però no extraïbles per PCA, fet igualment comentat per Roda i col (2000).

No és possible fer la distinció *in vivo* entre els possibles orígens moleculars de la ressonància de “colina”, així que en general es fa referència a ‘colina total’. Aquesta ressonància *in vivo* també pot tenir contribucions d’una de les ressonàncies de la taurina

<sup>19</sup> *In vivo*, fa referència a la ressonància que engloba els compostos de trimetilamina.

(3,22 ppm) i també d'una de les ressonàncies de fosfoetanolamina. Les principals contribucions al pic de colina (3,21 ppm), en cervell normal, són de PC i GPC, havent-hi poca contribució del pic de colina lliure. La colina lliure, però, pot augmentar de manera significativa als tumors (Govindaraju i col, 2000). La colina és necessària per a la síntesi del neurotransmissor acetilcolina i també per a la síntesi de fosfatidilcolina, principal constituent de les membranes. Les interpretacions bioquímiques del pic de la colina *in vivo* són complexes ja que hi ha contribució dels tres components; l'estudi *in vitro* ajuda a entendre i interpretar els resultats. Canvis en aquests valors estan generalment associats amb alteracions de la composició de membrana, observant-se valors augmentats en tumors i malalties neurodegeneratives (Govindaraju i col, 2000).

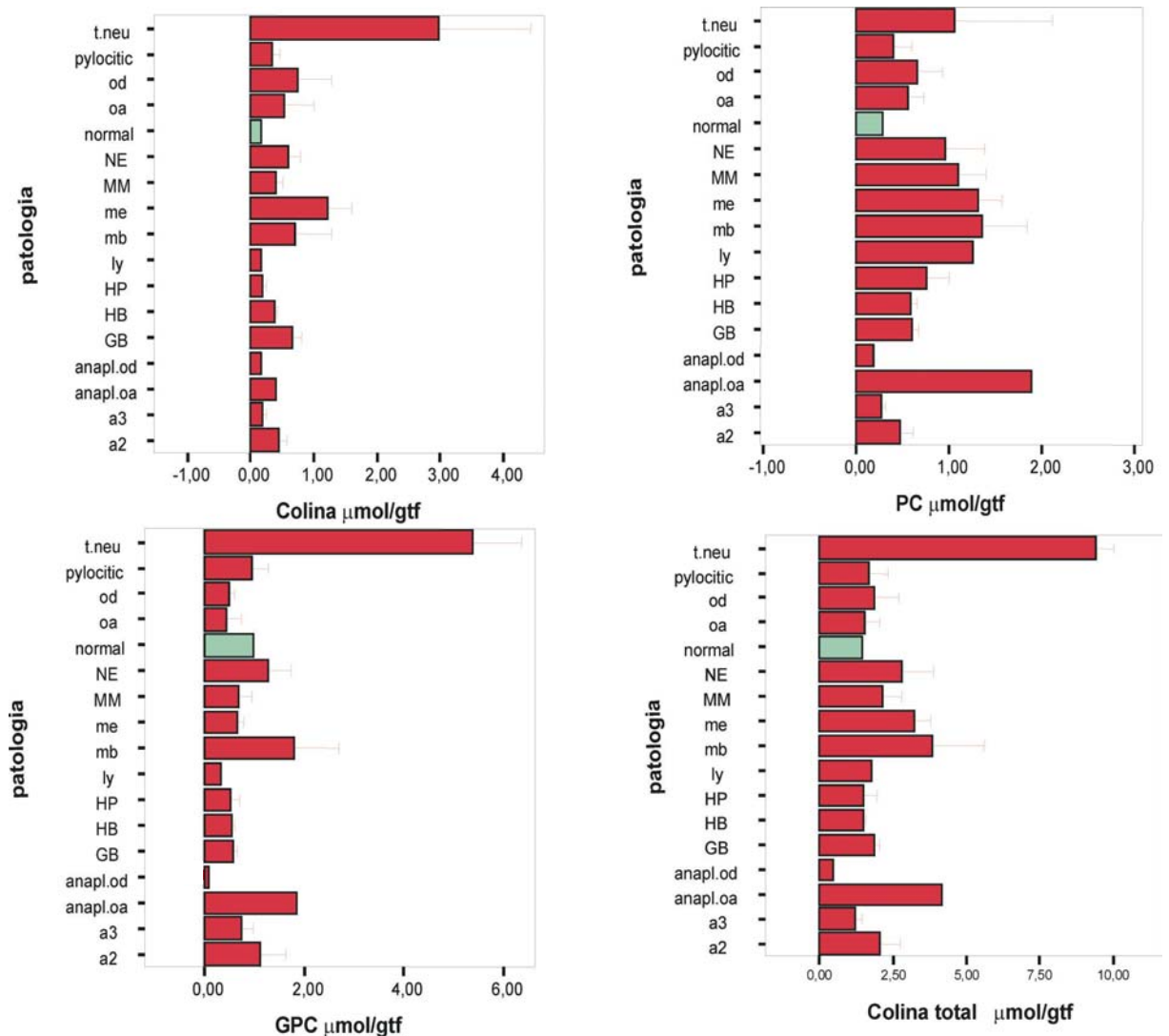


Figura 4.65: Promig  $\pm$  SEM dels valors de colina lliure, fosfocolina, glicerofosfocolina i colina total per als diferents tipus tumorals. Acrònims com a la figura 4.20.

Sabatier i col (1999) descriuen la variabilitat del patró dels metabòlits de colina al comparar tumors astrocítics de baix i alt grau. Als tumors d'alt grau, hi troben percentatges semblants de les tres (C, PC, GPC), mentre que als tumors de més baix grau predomina el GPC. Una comparació dels valors d'aquesta tesi amb els del citat autor es veu a la figura 4.66. Els percentatges esperats per a cervell normal són predominantment GPC (79%), amb poca contribució de C (14%) i PC (7%).

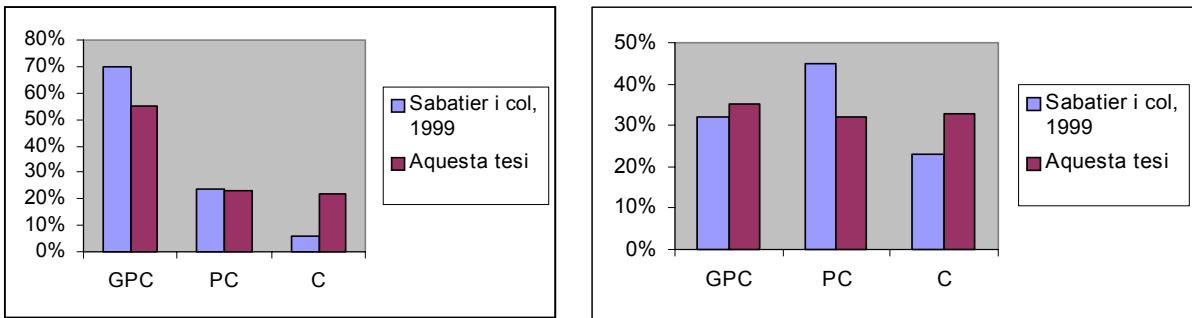


Figura 4.66: Comparació dels percentatges de la “colina total” obtinguts pels diferents metabòlits de colina per tumors astrocítics de baix grau (grau II, esquerra) i alt grau (grau III + GB, dreta) entre els valors obtinguts en aquest treball i els valors citats per la literatura.

Aquesta distribució característica dels metabòlits pot ser explicada en part pel diferent origen que tenen la PC i GPC en les vies de degradació i síntesi de membrana (figura 4.67), com també han reportat Usenius i col (1994b). Cheng i col (2000), en estudis de HR-MAS també han relacionat l'alta concentració de PC i C amb la quantitat de teixit tumoral analitzat, posteriorment confirmat per histologia.

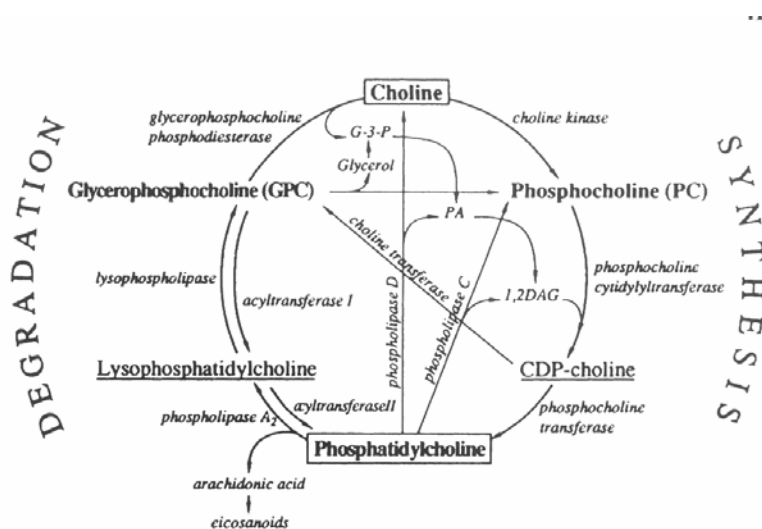


Figura 4.67: Esquema de via metabòlica amb els diferents rols de PC i GPC en la síntesi i degradació de la fosfatidilcolina de les membranes biològiques.(reproduïda de Danielsen i Ross, 1999)

#### **4.4 Anàlisi de proteïnes al sediment d'extracció PCA.**

Els valors obtinguts per a l'anàlisi de proteïnes als sediments d'extracció PCA es mostren tabulats a la taula 4.25 i gràficament, en forma de *boxplot*, a la figura 4.68.

L'anàlisi de proteïnes es va fer per a totes les mostres recollides durant aquesta tesi i també mostres processades anteriorment al GABRMN. Aquest anàlisi ens pot donar una mesura tant de les pèrdues (ja controlades, per altra banda, per l'estàndard intern) com també ens pot donar indicació del grau de necrosi del teixit. Valors molt baixos de proteïna ens poden donar més eines a la hora d'interpretar l'espectre d'extracte PCA quant a concentracions baixes de metabòlits extrets.

Entre els tumors sòlids, a part del contingut de tendència decreixent en proteïna als tumors astrocítics segons augmenta el grau (observat sobretot entre a3 i gb) vista amb més detall a la figura 4.70, reflexant una possible quantitat variable de teixit necròtic present a la mostra, no s'observen tendències de variabilitat extraordinàries. Encara que es veu tendència de disminució de la proteïna amb l'augment del grau tumoral, no va presentar diferències estadísticament significatives.

Aquesta observació es veu reforçada per dades no publicades del nostre grup (Valverde, 2004) que relacionen la quantitat de proteïna detectada a les cèl·lules C6 i la seva fase de la corba de proliferació. La quantitat de proteïna detectada a la fase post-confluent, que podria mimetitzar una fase quiescent de poca proliferació (astrocitoma grau II) és superior a la quantitat de proteïna detectada a una fase de proliferació elevada com la fase log.

Els valors oscil·len bastant però és notable la disminució de proteïna observada als líquids cístics quan comparats als tumors sòlids. Comparant de manera general 'tumors sòlids' i 'líquids cístics', obtenim la figura 4.69, on s'observen diferències estadísticament significatives ( $p < 0,001$ ).

Patologia	Proteïna mg/gtf (promig $\pm$ SEM)
A2 (n=7)	96,8 $\pm$ 22,4
A3 (n=8)	94,3 $\pm$ 13,1
A.pilo (n=3)	92,5 $\pm$ 13,4
GB (n=59)	81,1 $\pm$ 24,1
OA (n=3)	59,7 $\pm$ 15,7
OD (n=6)	63,4 $\pm$ 12,1
MB (n=6)	69,9 $\pm$ 14,4
HB (n=3)	94,0 $\pm$ 13,2
HP (n=4)	112,3 $\pm$ 17,4
NE (n=5)	117,9 $\pm$ 14,0
ME (n=18)	99,8 $\pm$ 13,7
MM (n=29)	83,6 $\pm$ 5,0
LY (n=2)	95,5 $\pm$ 13,4
DT (n=2)	86,2 $\pm$ 33,7
ODa (n=1)	90,95
OAA (n=1)	52,44
Total tumors (n=157)	89,56 $\pm$ 4,27

Taula 4.25: Valors de proteïna mg/gtf per a les diferents patologies analitzades en aquesta tesi (n=97). S'han considerat, per als promitjos, els valors de totes les mostres, incloses les processades prèviament al GABRMN(n=60).

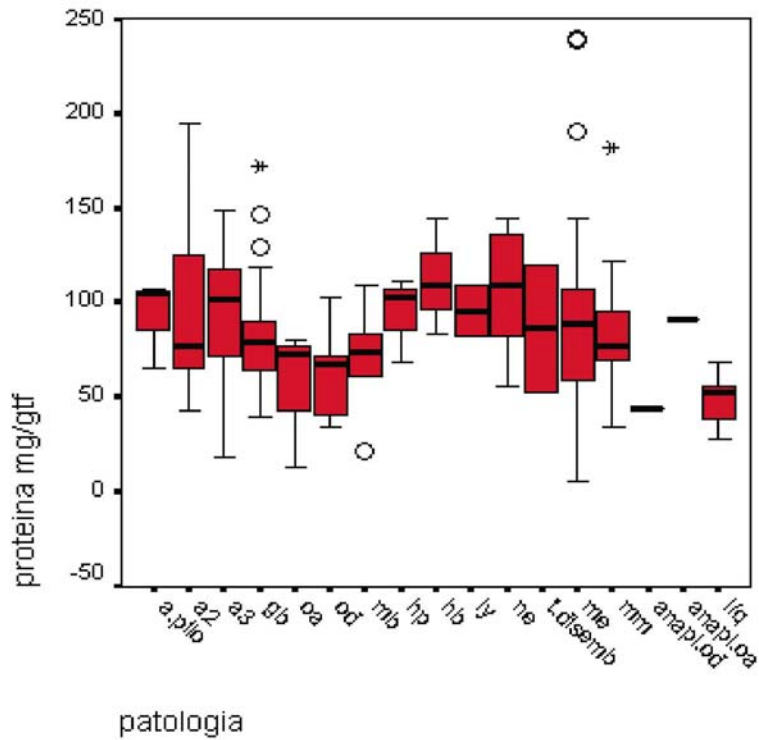


Figura 4.68: *Boxplot* dels valors per a proteïna quantificada en sediment residual després de l'extracció amb PCA<sup>20</sup>. Detalls de la representació dels *boxplots* a la figura 4.9. Acrònims com a la figura 4.20

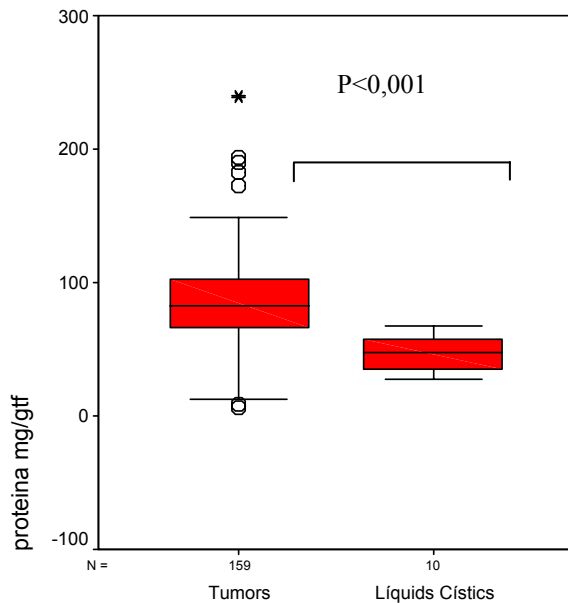


Figura 4.69: *Boxplot* dels valors de proteïnes de tots els tumors sòlids *versus* els líquids cístics. La diferència és estadísticament significativa. Detalls sobre els *boxplots* a la figura 4.9.

<sup>20</sup> Entre aquests valors, també son considerades mostres de les quals s'ha fet la mesura al GABRMN abans d'aquesta tesi.

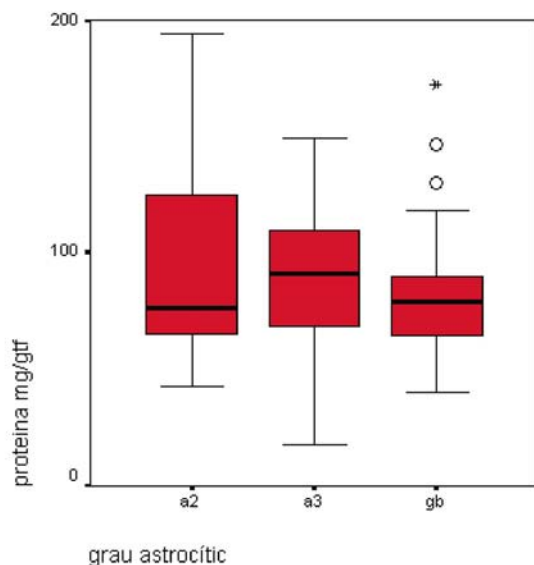


Figura 4.70: *Boxplot* relacionant la quantitat de proteïna mg/gtf amb el grau astrocític. Detalls sobre els *boxplots* a la figura 4.9

Com en alguns casos la dispersió observada era força gran, s'ha fet una prova per comprovar el coeficient de variació observat analitzant diverses parts d'un tumor gran i reconegudament homogeni com per exemple un meningioma. En una de les mostres on la mida permetia, s'ha tallat la mostra en 5 parts i fet extracció PCA i anàlisi de proteïnes al sediment de les 5 parts. Els valors obtinguts, així com la desviació estàndard i l'error estàndard estan llistats a la taula 4.26.

El coeficient de variació obtingut en aquest test s'ha considerat acceptable, tenint en compte les característiques de la mostra.

Mostra	Proteïna mg/gtf
1	83,36
2	63,07
3	81,51
4	71,53
5	63,06
promig	72,51
SD	8,69
Coef. variació	11,9%
SEM	3,89

Taula 4.26: Valors trobats en el test de proteïnes realitzat amb 5 parts diferents d'un mateix meningioma. SD= desviació estàndard, SEM= error estàndard.

Basant-nos en treballs que relacionen la cel·lularitat tumoral amb el coeficient de difusió aparent i relacionant el moviment de l'aigua amb la quantitat de cèl·lules presents (Gauvain i col, 2001), vam separar també els grups tumorals segons la informació de la seva cel·lularitat habitual. L'objectiu era investigar la possible relació d'aquest paràmetre amb la concentració de proteïnes al sediment d'extracció. No es van aconseguir informacions de tots els tipus tumorals, ja que molts d'ells presenten histologies variades segons la variant estudiada. La cel·lularitat atribuïda a cada tumor es representa a la taula 4.27. No s'han assolit diferències estadísticament significatives entre els grups, tot i que el grup de cel·lularitat moderada en relació al grup de cel·lularitat alta ha presentat  $p=0,088$ , que podria indicar tendència a la significació estadística. La normalització dels metabòlits per la concentració de proteïna és un procés bastant utilitzat, sobretot per als treballs amb cultius cel·lulars però aquí no ha donat resultats consistents.

Cel·lularitat	Tipus tumoral
Alta	Limfoma, astrocitoma grau II, astrocitoma grau III, medul·loblastoma, hemangiopericitoma, neurinoma
Moderada	Oligodendroglioma, oligoastrocitoma, meningioma
Baixa	Glioblastoma, astrocitoma pilocític, oligoastrocitoma i oligodendroglioma anaplàstics
Variable o sense informació	Hemangioblastoma, metàstasis, tumor neuroectodèrmic

Taula 4.27: Graus de cel·lularitat atribuïts als diferents tumors, segons Kleihues i Cavenee, 1997.



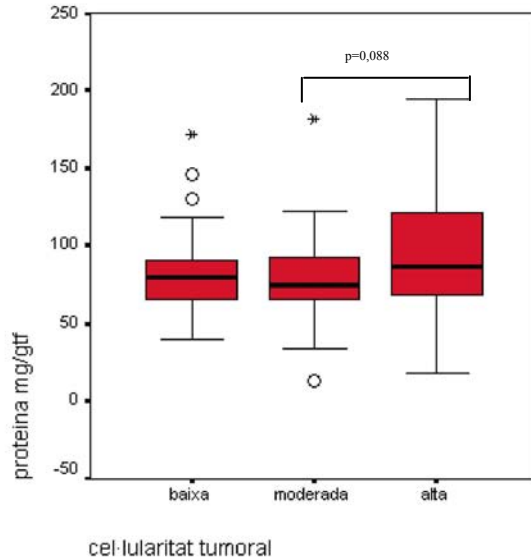


Figura 4.71: *Boxplot* relacionant la quantitat de proteïna detectada i el grau de cel·lularitat del tumor. Detalls sobre els *boxplots* a la figura 4.9.

#### 4.5 Resultats de la col·laboració amb el projecte INTERPRET

La col·laboració amb el projecte INTERPRET tenia la finalitat en primer lloc de participar en la preparació de la base de dades que contindria els espectres i dades clíniques necessaris per desenvolupar el sistema d'auxili al diagnòstic clínic basat en reconeixement de patrons.

La ipDB (INTERPRET *preliminary database*) ha servit com a base de dades inicial i també era capaç de fer exportacions de conjunts d'espectres organitzats en un arbre de directoris amb tota la informació necessària per utilitzar-los. Posteriorment, s'han migrat les dades retrospectives de la ipDB a la iDB (base de dades definitiva) on ha estat disponible pels col·laboradors responsables del reconeixement de patrons (*pattern recognition*, PR). El nombre final de casos exportats va ser de 388. Exemples de pantalla es mostren a la figura 4.72 i 4.73.

Degut a que no totes les dades espectrals eren de suficient qualitat per a desenvolupar classificadors automàtics, s'ha posat en marxa un sistema semiautomàtic de classificació espectral segons la qualitat, desenvolupat per UAB i UMCN a partir de 200 espectres que van servir com a *training set* per dissenyar un classificador per anàlisi discriminant. S'han definit dos grups (acceptables i descartats) i el pas següent va ser definir el llindar entre els dos grups, amb l'ús de dues característiques fàcilment mesurables als espectres (relació

senyal/soroll i amplada a mitja alçada de la ressonància de l'aigua). Altres artefactes com contaminació amb greix subcutani, moviments del pacient i altres, poden no ser detectats per aquest mètode.

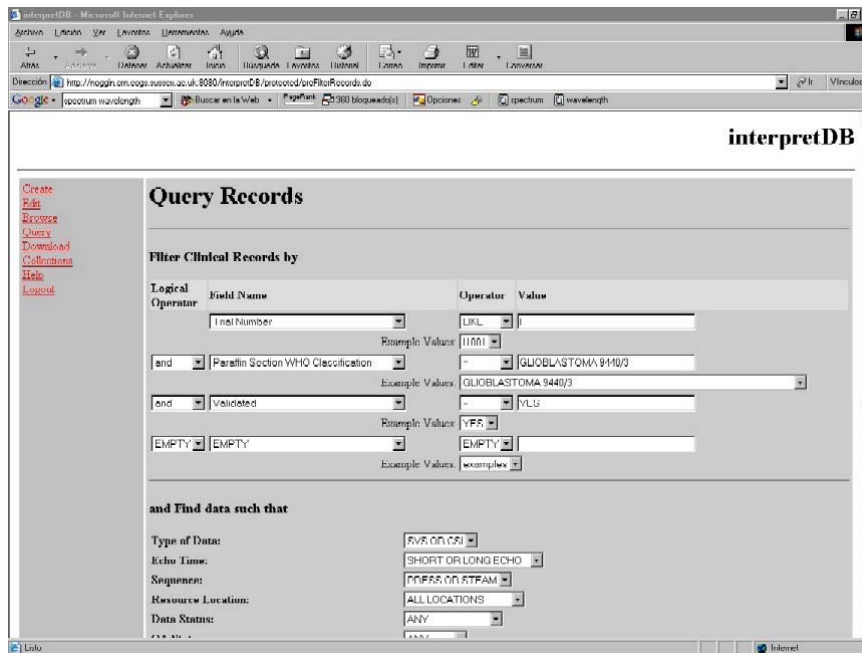
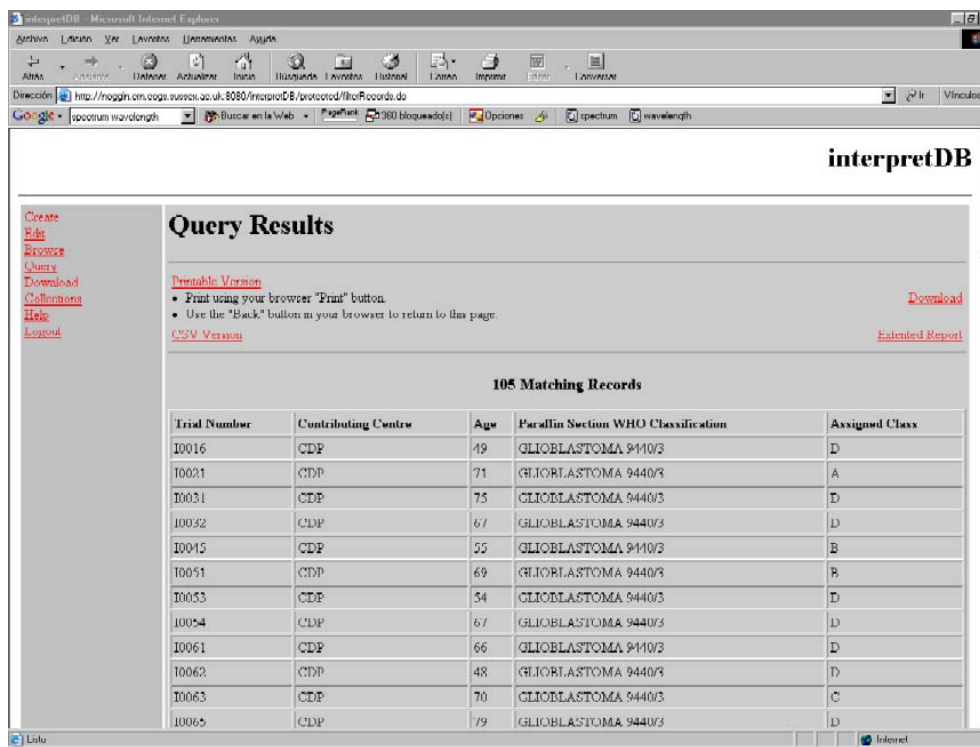


Figura.4.72: Exemple de pantalla de la iDB (base de dades definitiva), amb un exemple de consulta segons els criteris que determina l'usuari.

No tots els casos de la iDB han estat utilitzats per desenvolupar els classificadors automàtics, ja que es passaven filtres de qualitat i també de validació clínica de les dades.

El prototip científic d'ajuda a la decisió clínica és resultat però de la col·laboració directa o indirecta de totes les persones participants al projecte INTERPRET (<http://carbon.uab.es/INTERPRET>). El desenvolupament dels classificadors automàtics utilitzats al prototip ha estat possible però gràcies als casos emmagatzemats i validats en aquesta base de dades.

El control de qualitat realitzat amb les dades i que es descriu a la figura 3.16 de mètodes ha resultat en errors inferiors al 10%, que han estat corregits i s'ha considerat el resultat satisfactori i no necessari per tant un nou mostreig.



interpretDB

Create  
Edit  
Browse  
Query  
Download  
Classifications  
Help  
Logout

### Query Results

[Printable Version](#)  
• Print using your browser "Print" button.  
• Use the "Back" button in your browser to return to this page.  
[Download](#)

[CSV Version](#) [Extended Report](#)

**105 Matching Records**

Trial Number	Contributing Centre	Age	ParaIn Section WHO Classification	Assigned Class
I0016	CDP	49	GLIOBLASTOMA 9440/3	D
I0021	CDP	71	GLIOBLASTOMA 9440/3	A
I0031	CDP	75	GLIOBLASTOMA 9440/3	D
I0032	CDP	67	GLIOBLASTOMA 9440/3	D
I0045	CDP	55	GLIOBLASTOMA 9440/3	B
I0051	CDP	69	GLIOBLASTOMA 9440/3	B
I0053	CDP	54	GLIOBLASTOMA 9440/3	D
I0054	CDP	67	GLIOBLASTOMA 9440/3	D
I0061	CDP	66	GLIOBLASTOMA 9440/3	D
I0062	CDP	48	GLIOBLASTOMA 9440/3	D
I0063	CDP	70	GLIOBLASTOMA 9440/3	C
I0065	CDP	79	GLIOBLASTOMA 9440/3	D

Figura 4.73: Pantalla de la iDB: resultat de la consulta que s'ensenya a la figura anterior.



## ***CONCLUSIONS***



## 5. Conclusions

5.1 ESTUDI DE LÍQUIDS CÍSTICS DE TUMORS HUMANS, *IN VIVO*, *EX VIVO* I *IN VITRO*. DESENVOLUPAMENT DE CLASSIFICADORS PROTOTÍPICS PER A UNA EINA D'AJUDA DE DECISIÓ CLÍNICA

5.1.1 S'han analitzat 10 mostres de líquids cístics per anàlisis químics (àcid siàlic, hexurònic, concentració de proteïna), RMN *in vivo*, *ex vivo*, i *in vitro* (extracció PCA).

5.1.2 Els estudis amb els líquids cístics han permès demostrar una contribució promig majoritària (93,4%) de grups N-acetil associats a macromolècules a la ressonància NAC detectable per RMN de  $^1\text{H}$  a 2,03 ppm. La contribució principal correspon a àcid siàlic (64,3%) i compostos que contenen hexurònic (29,2%), possiblement GAGs.

5.1.3 La concentració de lactat als líquids cístics de tumors malignes es significativament més alta ( $p=0,001$ ) que la de tumors benignes.

5.1.4 S'han desenvolupat classificadors preliminars mitjançant anàlisis LDA dels patrons espectrals de líquids cístics i abscessos que permeten orientar la discriminació entre tumor benigne, maligne i abscess amb un encert (test 'leave-one-out') de 88,9%. Aquests classificadors s'han incorporat a un prototip d'interfície gràfica derivat de la produïda al projecte INTERPRET.

5.1.5 S'han desenvolupat també classificadors a TE llarg per comprovar el posicionament del vòxel en zones tumorals, de teixit normal o de líquid cístic, en els casos de dubte, amb un grau d'encert del 96,3%.

5.2 ESTUDIS AMB DISSOLUCIONS MODEL A CAMPS CLÍNICS. CORBES DE CALIBRACIÓ PER A LA CORRELACIÓ *IN VITRO/IN VIVO*

5.2.1 S'ha desenvolupat una corba de calibració amb solucions model de concentració variable de m-Ino/gly que permet el càlcul d'aquest quocient de concentracions a partir d'espectres de tumors *in vivo* a dos temps d'eco. A partir d'aquesta corba, hem pogut establir un sistema de càlcul de les concentracions relatives de m-Ino i gly *in vivo* i comparar-les amb les dades *in vitro* per a tumors glials. Aquest protocol pot ser aplicat a la caracterització d'altres tipus de tumors com els neurinomes i hemangiopericitomes, on també hi ha una forta contribució de m-Ino a la ressonància de 3,57 ppm.

5.2.2 S'han realitzat estudis amb solucions model simulant les condicions d'adquisició espectral utilitzades per al pacient. La taurina mostra una modulació del seu patró espectral força característica, cosa que pot permetre la seva identificació temptativa en patrons *in vivo*.

### 5.3 ESTUDIS D'EXTRACTES DE BIÒPSIES DE TUMORS CEREBRALS HUMANS I COMPARACIÓ AMB DADES *IN VIVO*

5.3.1 S'han analitzat les dades obtingudes de 156 biòpsies de tumors cerebrals humans i s'han quantificat 14 metabòlits en cadascun dels seus extractes PCA mitjançant RMN de  $^1\text{H}$  *in vitro* a 9,4 T.

5.3.2 Les dades obtingudes als extractes PCA han permès donar resposta a algunes preguntes prèviament plantejades a més de possibilitar la explicació de la contribució de diferents parts de l'espectre *in vivo* al desenvolupament de possibles classificadors. Així, al nostre cas s'ha comprovat que:

- Meningiomes i neurinomes poden ser raonablement discriminats a partir de la quantificació de m-Ino *in vitro*, amb tendència a la significació estadística ( $p=0,089$ ). El reconeixement de patrons *in vitro* reforça aquesta idea, ja que el possible classificador desenvolupat (97,1% d'encert per LOO) considera el m-Ino entre les variables per discriminar aquestes dues patologies.
- Astrocitomes de grau II i oligodendrogliomes no presenten diferències estadísticament significatives quant a la seva concentració de m-Ino, encara que la representació en *boxplot* indiqui una tendència a una menor concentració de m-Ino als oligodendrogliomes. El quocient  $\text{RmI}_{\text{gly}}/\text{Cr}$  *in vivo*, mesura indirecta de la relació m-Ino/gly, tampoc presenta diferències estadísticament significatives. El possible classificador desenvolupat per reconeixement de patrons *in vitro* arriba al 100% d'encert per validació creuada usant glutamat i NAA.
- Els tumors astrocítics de diferents graus no presenten diferències significatives quant a la seva concentració de m-Ino, encara que *in vivo* aquest sembla ser un factor important en la gradació astrocítica amb el quocient  $\text{RmI}_{\text{gly}}/\text{Cr}$  presentant significació estadística entre glioblastomes vs oligodendrogliomes ( $p<0,001$ ), vs astrocitomes de grau II ( $p<0,001$ ) i vs astrocitomes de grau III ( $p<0,05$ ). Els intents de desenvolupament de classificadors automàtics *in vitro* han resultat en un percentatge d'encert de 89,2% de tots els casos i 75,7% dels casos per LOO, que



s'ha modificat quan s'ha introduït el quocient [m-Ino]/[gly] (87,8% dels casos i 81,1% dels casos per LOO).

- Els PNETs i astrocitomes de grau II presenten tendència a la significació estadística ( $p=0,086$ ) quan comparats bilateralment quant a la seva concentració de taurina, apuntant a que aquest metabòlit pot ser important per a la discriminació bilateral *in vivo*. El classificador desenvolupat per a la discriminació *in vitro* amb totes les variables té un percentatge d'encert de 100% per a tots els casos però només un 42,6% per als casos en LOO, el que suggereix un sobreentrenament del sistema ja que les variables s'han introduït totes forçosament i sobrepassen el nombre recomanat.
- Els oligoastrocitomes semblen presentar un patró intermedi entre oligodendrogliomes i astrocitomes de grau II per a alguns metabòlits *in vitro* (gaba, m-Ino, NAA, gln) mentre que per altres el patró es diferent però no intermedi (ala, tau, glu). El NAA és el metabòlit triat en una LDA amb el programa SPSS per a separar aquests 3 tipus tumorals *in vitro* (però el grau d'encert no és satisfactori, situant-se al 62%). *In vivo*, es reforça la idea de la importància de la zona glx, ja que és una zona important en la discriminació temptativa d'oligodendrogliomes.
- Els glioblastomes *in vitro* presenten formació de dos possibles grups pel que fa a valors de m-Ino. Un grup més nombrós amb valors baixos de concentració d'aquest metabòlit, i un grup amb valors més elevats, que es podria correspondre amb els glioblastomes secundaris. Els valors de quocients [m-Ino]/[gly] presenten bastant correspondència tant *in vivo* com *in vitro*, indicant que la mesura dels quocients és una bona aproximació per a aquest càlcul.
- Els glioblastomes van ser correctament separats de les metàstasis en un 77,6 i 75,3% dels casos mitjançant el classificador que s'ha desenvolupat amb els metabòlits de taurina i glutamina.

5.3.3 La comparació de les dades del quocient m-Ino/gly *in vitro* i *in vivo* per tumors astrocítics de grau II, III i IV suggereix una menor detecció de gly *in vivo* de la esperada a partir d'extractes a tumors de grau II. Una possible explicació seria una associació de la gly amb estructures macromoleculares *in vivo* que es trencaria durant l'extracció PCA. El percentatge de la glicina total afectada per aquesta interacció disminuiria força a

aastrocitomes de grau III i IV, permetent que el quocient  $RmI_{gly}/Cr$  sigui discriminatori *in vivo* però no *in vitro*.

#### 5.4 CONTRIBUCIÓ AL DESENVOLUPAMENT I MILLORES DEL PROTOTIP D'AJUDA A LA CLASSIFICACIÓ DE TUMORS CEREBRALS HUMANS *IN VIVO* (PROJECTE INTERPRET)

5.4.1 El control de qualitat de les dades finals clíniques i espectroscòpiques presentades a la base de dades validada (<http://azizu.uab.es:8090/iFrozenDB/index.jsp>) va detectar errors inferiors al 10% que van ser corregits abans de fer accessible la base de dades final i el prototip científic de DSS reentrenat (<http://carbon.uab.es/INTERPRET>).

5.4.2 S'han adquirit els coneixements necessaris per introduir noves variables al prototip d'interfície gràfica d'ajuda a la decisió clínica desenvolupat a INTERPRET, i per analitzar en quina mesura aquestes variables són significatives (veure 5.1.4).

5.4.3 L'intent d'introducció del quocient  $RmI_{gly}/Cr$  als dos temps d'eco al classificador automàtic no ha resultat en una millora de la classificació dels tipus tumorals principals presents al prototip. Això pot ser degut a que a) ja partíem d'un alt percentatge d'encert i b) és un classificador que pot tenir utilitat per ajudar a discriminar el grau entre tumors astrocítics, mentre el classificador automàtic també contempla casos de meningiomes i metàstasis.

5.4.4 La classificació temptativa de glioblastomes *versus* metàstasis, basant-se en la presència de  $m\text{-Ino}/gly$  i absència de lípids ha resultat en una millora de la classificació dels glioblastomes, en aproximadament 22% dels casos (sense lípids/necrosi i amb  $m\text{-Ino}/gly$  elevat)

## ***BIBLIOGRAFIA***



## Bibliografia

- Adany R., Heimer R., Caterson B., Sorrell J.M., Iozzo R.V. (1990) Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma. *J Biol Chem* 265: 11389-11396.
- Agar N.S., Raf C.D., Chapman B.E., Kuchel P.W. (1991)  $^1\text{H}$  NMR spectroscopic survey of plasma and erythrocytes from selected marsupials and domestic animals of Australia. *Comp Biochem Physiol* 99: 575-597.
- Ala-Korpela M., Posio P., Mattila S.; Korhonen A., Williams S.R. (1996) Absolute quantification of phospholipid metabolites in brain-tissue extracts by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *J Magn Reson B* 113: 184-189.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1989) *Molecular Biology of the Cell* 2<sup>nd</sup>ed. Chapter 19: The nervous system pp 1059-1136. Garland Publishing Inc. New York.
- Badcock G., Pigott C., Goepel J., Andrews P. (1999) The human embryonal carcinoma marker antigen TRA-1-60 is a sialylated keratan sulfate proteoglycan. *Cancer Res* 59: 4715-4719.
- Bárány M., Glonek T. (1982) Phosphorus 31 Nuclear magnetic resonance of contractile systems. *Methods Enzymol* 85: 624-676.
- Barba I., Moreno A., Martínez-Pérez I., Tate A.R., Cabañas M.E., Baquero M., Capdevila A., Arús C. (2001) Magnetic resonance spectroscopy of brain hemangiopericytomas: high myoinositol concentrations and discrimination from meningiomas. *J Neurosurg* 94: 55-60.
- Barton S.J., Howe F.A., Tomlins A.M., Cudlip S.A., Nicholson J.K., Bell B.A., Griffiths J.R. (1999) Comparison of *in vivo*  $^1\text{H}$  MRS of human brain tumours with  $^1\text{H}$  HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples *in vitro*. *MAGMA* 8: 121-128.
- Baslow M.H. (1999) The existence of molecular water pumps in the nervous system: a review of the evidence. *Neurochem Int* 34: 77-90.
- Bell J.D., Brown J.C., Nicholson J.K., Sadler P.J. (1987) Assignment of resonances for 'acute-phase' glycoproteins in high resolution proton NMR spectra of human blood plasma. *FEBS Lett* 215: 311-315.
- Bell, J.D., Brown, J.C.C., Sadler, P. (1989) NMR studies of body fluids. *NMR Biomed* 2:246-256.

- Bernstein M., Berger M.S. (2000a) Neuro-oncology- the essentials. Chapter 1: Epidemiology pp 2-17. Thieme Medical Publishers Inc., New York.
- Bernstein M., Berger M.S. (2000b) Neuro-oncology- the essentials. Chapter 9: Magnetic resonance spectroscopy pp 99-113. Thieme Medical Publishers Inc., New York.
- Bernstein M., Berger M.S. (2000c). Neuro-oncology: the essentials. Chapter 38: Meningiomas pp 384-389 Thieme Medical Publishers Inc, New York.
- Bernstein M., Berger M.S. (2000d). Neuro-oncology: the essentials pp 311, 330, 385, 413. Thieme Medical Publishers Inc, New York.
- Bhakoo K.K., Pearce, D. (2000). In vitro expression of N-acetyl aspartate by oligodendrocytes: implications for proton magnetic resonance spectroscopy signal in vivo. *J Neurochem* 74: 254-262.
- Bitter T., Muir H.M. (1962) A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* 4: 330-334.
- Borsig L., Wong R., Feramisco J., Nadeau D.R., Varki N.M., Varki A. (2001) Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3352-3357.
- Brief E.E., Whittall K.P., Li D.K.B., MacKay A. (2003) Proton T<sub>1</sub> relaxation times of cerebral metabolites differ within and between regions of normal human brain. *NMR Biomed* 16: 503-509.
- Brown J.C., Mills G.A., Sadler P.J., Walker V. (1989) <sup>1</sup>H NMR studies of urine from premature and sick babies. *Magn Reson Med* 11: 193-201.
- Bunton C.A., Shimer V.J. (1961) Isotope effects in Deuterium oxide solution. *J Am Chem Soc* 83: 42-47.
- Bruhn H., Frahm J., Gyngell M.L., Merboldt K.D., Hänicke W., Sauter R., Hamburger C. (1989) Noninvasive differentiation of tumors with use of localized H-1 MR spectroscopy *in vivo*: initial experience in patients with cerebral tumors. *Radiology* 172: 541-548.
- Burtscher I.M., Holtås S. (1999) *In vivo* proton MR spectroscopy of untreated and treated brain abscesses. *AJNR Am J Neuroradiol* 20:1049-1053.
- Burtscher I.M., Holtås S. (2001) Proton magnetic resonance spectroscopy in brain tumours: clinical applications. *Neuroradiology* 43: 345-352.
- Campbell I.D., Dwek, R.A. (1984) Biological Spectroscopy. Chapter 6: Nuclear Magnetic Resonance pp 127-177. The Benjamin/Cummings Publishing Company, California.
- Candiota A.P. (2001) Introducció d'un estàndar intern per control de pèrdues al protocol d'extracció de teixits per àcid perclòric: estudis per RMN i aplicació a biòpsies de tumors

- cerebrals humans. Treball de recerca de mestratge del programa de Doctorat en Bioquímica i Biologia Molecular, UAB.
- Carpinelli G., Carapella C.M., Palombi L., Raus L., Caroli F., Podo, F. (1996) Differentiation of glioblastoma multiforme from astrocytomas by *in vitro*  $^1\text{H}$  MRS analysis of human brain tumors. *Anticancer Res* 16: 1559-1563.
- Carson P.A., Dent N.J. (1990) *Good Laboratory and Clinical Practices: techniques for the quality assurance professional*. Chapter: Statistics for QA auditors of good laboratory practices and good clinical practices studies. Heinemann Newnes, Oxford
- Castillo M., Kwock L., Scatliff J., Mukherji S.K. (1998) Proton MR spectroscopy in neoplastic and non-neoplastic disorders. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 6: 1- 20.
- Castillo M., Smith J.K., Kwock L. (2000) Correlation of Myo-Inositol levels and grading of cerebral astrocytomas. *AJNR Am J Neuroradiol* 21: 1645-1649.
- Chang C., Chen G.C., Jang T. (1995) A critical assessment of brain metabolites: analysis of perchloric acid extracts using proton nuclear magnetic resonance. *Neurosci Lett* 196: 134-136.
- Chang K.-H., Song I.C., Kim S.H., Han M.H., Kim H.D., Seong S.O., Jung H.W. and Han M.C. (1998) *In vivo* single voxel proton MR spectroscopy in intracranial cystic masses. *AJNR Am J Neuroradiol* 19: 401-405.
- Cheng L.L., Chang I.-W., Louis D.N., Gonzalez R.G. (1998) Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens. *Cancer Res* 58: 1825-1832.
- Cheng L.L., Anthony D.C., Comite A.R., Black P.M., Tzika A.A., Gonzalez R.G. (2000) Quantification of microheterogeneity in glioblastoma multiforme with *ex vivo* high-resolution magic angle spinning (HRMAS) proton magnetic resonance spectroscopy. *Neuro-Oncol* 2: 87-95.
- Cho Y.-D., Choi G.-H., Lee S.-P., Kim J.-K. (2003)  $^1\text{H}$  MRS metabolic patterns for distinguishing between meningiomas and other brain tumors. *Magn Reson Imaging* 21: 663-672.
- Condeelis J., Segall J.E. (2003) Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 3: 921-930.
- Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L. (1990) *Patología estructural y funcional*. Vol. I, 4<sup>a</sup> ed. Capítulo 6: Neoplasias pp 247-316. Interamericana – McGraw Hill, Madrid.

- Czernicki Z., Horsztyński D, Jankowski W., Grieb P., Walecki J. (2000). Malignancy of brain tumors evaluated by proton magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$ -MRS) *in vitro*. *Acta Neurochir Suppl* 76: 17-20.
- Danielsen E.R., Ross B. (1999) Magnetic resonance spectroscopy diagnosis of neurological diseases. Marcel Dekker Inc, New York.
- De Edelenyi F.S., Rubin C., Esteve F., Grand S., Décorps M., Lefournier V., Le Bas J.F., Remy C. (2000). A new approach for analysing proton magnetic resonance spectroscopic images of brain tumors: nosologic images. *Nat Med* 6: 1287-1289.
- Demaerel P., Johannik K., Van Hecke P., Van Ongeval C., Verellen S., Marchal G., Wilms G., Plets C., Goffin J., Van Calenbergh F., Lammens M., Baert, A.L. (1991) Localized  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy in fifty cases of newly diagnosed intracranial tumors. *J Comput Assist Tomogr* 15: 67-76.
- De Vita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds.) (2001) Cancer- Principles & practice of oncology. 6<sup>a</sup> ed. on CD-ROM. ISBN 0-7817-2229-2. Chapter 43: Neoplasms of the central nervous system; Chapter 45.5 Primary central nervous system lymphoma. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Ferlay J., Bray F., Sankila R., Parkin D.M. (1999) EUCAN Cancer incidence, mortality and prevalence in the European Union. IARC Press, Lyon (CD-ROM). <http://www.iarc.fr>.
- Florian C.L., Preece N.E., Bhakoo K.K., Williams S.R., Noble M. (1995) Characteristic metabolic profiles revealed by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy for three types of human brain and nervous system tumours. *NMR Biomed* 8:253-264.
- Frahm J., Bruhn H., Gyngell M.L., Merboldt K.D., Hänicke W., Sauter R. (1989) Localized proton NMR spectroscopy in different regions of the human brain *in vivo*. Relaxation times and concentrations of cerebral metabolites. *Magn Reson Med* 11: 47-63.
- Friebolin, H. (1993) Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy. 2<sup>a</sup> ed. Verlagsgesellschaft (VCH) mbH. Germany.
- Gadian D.G. (1982) Nuclear magnetic resonance and its applications to living systems. Clarendon Press. Oxford.
- Gadian D.G.; Bates T.E.; Williams S.R.; Bell J.D.; Austin S.J.; Connelly A. (1991) Approaches to editing, assignment and interpretation of proton spectra. *NMR Biomed* 4:85-89.
- Galanaud D., Chinot O., Nicoli F., Confort-Gouny S., Le Fur Y.K, Barrié-Attarian M., Ranjeva J.-P., Fuentès S., Viout P., Figarella-Branger D., Cozzone P.J. (2003) Use of



- proton magnetic resonance spectroscopy of the brain to differentiate gliomatosis cerebri from low-grade glioma. *J Neurosurg* 98: 269-276.
- Gauvain K.M., McKinstry R.C., Mukherjee P., Perry A., Neil J.J., Kaufman B.A., Hayashi R.J. (2001) Evaluating pediatric brain tumor cellularity with diffusion-tensor imaging. *AJR Am J Roentgenol* 177:449-454.
- Gili Planas J., Capdevila Cirera A. (1992a) Resonancia Magnética. Capítulo 5: La relajación nuclear pp 24-33. Centre Diagnòstic Pedralbes DL. Barcelona.
- Gili Planas J., Capdevila Cirera A. (1992b) Resonancia Magnética. Capítulo 12: Espectroscopia por resonancia magnética nuclear pp 57-79. Centre Diagnòstic Pedralbes DL. Barcelona.
- Gill S.S., Thomas D.T., Van Bruggen N., Gadian D.G., Peden C.J., Bell J.D., Cox I.J., Menon D.K., Iles R.A., Bryant D.J., Coutts G.A. (1990) Proton MR spectroscopy of intracranial tumours: *in vivo* and *in vitro* studies. *J Comput Assist Tomogr* 14: 497-504.
- Go K.G., Hew J.M., Kamman R.L., Molenaar W.M., Pruijm J., Blaauw E.H. (1993) Cystic lesions of the brain. A classification based on pathogenesis, with consideration of histological and radiological features. *Eur J Radiol* 17: 69-84.
- Govindaraju V., Young K., Maudsley A.A. (2000) Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed* 13: 129-153.
- Gowda D.C., Goossen B., Margolis R.K., Margolis U. (1989) Chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans of PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 264: 11436-11443.
- Grand S., Passaro G., Ziegler A., Esteve F., Boujet C., Hoffmann D., Rubin C., Segebarth C., Décorps M., Le Bas J.F., Rémy C. (1999) Necrotic tumor versus brain abscess: importance of amino acids detected at  $^1\text{H}$  MR spectroscopy-initial results. *Radiology*. 213:785-793.
- Grant D.M., Harris R.K. (eds) (1996) Encyclopedia of nuclear magnetic resonance vol. 4. . "Magic Angle Spinning" pp 2891-2900. John Wiley & Sons, Chichester.
- Griffiths J.R., McSheehy P.M.J., Robinson S.P., Troy H., Chung Y-L., Leek R.D., Williams K.J., Stratford I.J., Harris A.L., Stubbs M. (2002) Metabolic changes detected by *in vivo* magnetic resonance studies of HEPA-1 wild-type tumors and tumors deficient in hypoxia-inducible factor-1 $\beta$  (HIF-1 $\beta$ ): evidence of an anabolic role for the HIF-1 pathway. *Cancer Res* 62: 688-695.
- Günther H. (1995) NMR spectroscopy: basic principles, concepts and applications in chemistry. 2<sup>a</sup> ed, John Wiley & Sons. England.

- Hagberg G., Burlina A.P., Mader I., Roser W., Radue E.W., Seelig J. (1995) *In vivo* proton MR spectroscopy of human gliomas: definition of metabolic coordinates for multi-dimensional classification. *Magn Reson Med* 34: 242-252.
- Hagberg G. (1998) From magnetic resonance spectroscopy to classification of tumors. A review of pattern recognition methods. *NMR Biomed* 11: 148-156.
- Hanstock C.C., Rothman D.L., Howseman A., Lantos G., Novotny E.J., Petroff O.A.C., Prichard J.W., Shulman R.G. *In vivo* determination of NAA concentration in the human brain using the proton aspartyl resonance (abstr) (1989). *In: Book of abstracts: Society of Magnetic Resonance in Medicine 1989* pp 442. Society of Magnetic Resonance in Medicine, Berkeley, California.
- Heaney-Kieras J., Bystryk J.-C. (1986) Identification and purification of 115- and 125-Kilodalton cell surface human melanoma-associated antigens. *J Natl Cancer Inst* 77: 643-648.
- Hollingsworth M.A., Swanson B.J. (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 4: 45-60.
- Hore P.J. (1995) Nuclear Magnetic Resonance. Chapter 1: Introduction. Oxford University Press, Oxford.
- Hornak J.P. (1996) "The Basics of MRI". <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/>
- Howe F.A., Maxwell R.J., Saunders D.E., Brown M.M., Griffiths J.R. (1993) Proton spectroscopy *in vivo*. *Magn Reson Q* 9: 31-59.
- Howe FA, Opstad KS. (2003)  $^1\text{H}$  MR spectroscopy of brain tumours and masses. *NMR Biomed* 16:123-131.
- Jourdan G.W., Dean L., and Roseman S. (1971) The sialic acids. XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *J Biol Chem* 246: 430-435.
- Jungreis C.A., Chandra R., Kricheff I., Chuba J.V. (1988) *In vitro* magnetic resonance properties of CNS neoplasms and associated cysts. *Invest Radiol* 23:12-16.
- Kauppinen R.A., Niskanen T., Hakumaki J., Williams S.R. (1993) Quantitative analysis of  $^1\text{H}$  NMR detected proteins in the rat cerebral cortex *in vivo* and *in vitro*. *NMR Biomed* 6: 242-247.
- Kaye A.H., Laws Jr E.R. (2001a) Brain tumors, an encyclopedic approach. 2<sup>a</sup> ed. Chapter 11: Clinical, imaging and laboratory diagnosis of brain tumors. pp 217-248. Churchill Livingstone. Philadelphia.

- Kaye A.H., Laws Jr E.R. (2001b) Brain tumors, an encyclopedic approach. 2<sup>a</sup> ed. Chapter 4: Epidemiology of brain tumors and factors in prognosis pp 51-70. Churchill Livingstone. Philadelphia.
- Kaye A.H., Laws Jr E.R. (2001c) Brain tumors, an encyclopedic approach. 2<sup>a</sup> ed. Appendix: WHO classification of brain tumors pp 1027-1031. Churchill Livingstone. Philadelphia.
- Kim J.-S., Qian T., Lemasters J.J. (2003) Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology* 124: 494-503.
- Kinoshita Y., Kajiwara H., Yokota A., Koga Y. (1994) Proton magnetic resonance spectroscopy of brain tumors: an *in vitro* study. *Neurosurgery* 35: 606-614.
- Kinoshita Y., Yokota A. (1997) Absolute concentrations of metabolites in human brain tumors using *in vitro* proton magnetic resonance spectroscopy. *NMR Biomed* 10: 2-12.
- Kleihues P., Cavenee W.K. (eds). (1997a) Pathology and genetics – Tumours of the Nervous System. International Agency for Research of Cancer, Lyon.
- Kleihues P., Cavenee W.K. (eds). (1997b) Pathology and genetics – Tumours of the Nervous System. Chapter 11: Meningeal tumours pp 133-152. International Agency for Research of Cancer, Lyon.
- Kleihues P., Cavenee W.K. (eds). (1997c) Pathology and genetics – Tumours of the Nervous System. Chapter 2: Oligodendroglial tumours and mixed gliomas pp 37-48. International Agency for Research of Cancer, Lyon.
- Kleihues P., Ohgaki H. (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-Oncology* 1: 44-51.
- Kreis R. (1997) Quantitative localized <sup>1</sup>H MR spectroscopy for clinical use. *Journal of progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 31: 155-195.
- Kuesel A.C., Donnelly S.M., Halliday W., Sutherland G.R., Smith I.C.P. (1994) Mobile lipids and metabolic heterogeneity of brain tumours as detectable by *ex vivo* <sup>1</sup>H MR spectroscopy. *NMR Biomed* 7: 172-180.
- Kugel H., Heindel W., Ernestus R.-I., Bunke J., du Mesnil R., Friedmann G. (1992) Human brain tumors: spectral patterns detected with localized H-1 MR spectroscopy. *Radiology* 183: 701-709.
- Li X., Jun H., Lu Y., Oh J., Chang S., Nelson S.J. (2004) Identification of MRI and <sup>1</sup>H MRSI parameters that may predict survival for patients with malignant gliomas. *NMR Biomed* 17: 10-20.

- Lilienthal J.L., Zierler K.L., Folk B.P., Buka R., Riley M.J. (1950) A reference base and system for analysis of muscle constituents. *J Biol Chem* 182: 501-508.
- Liu D., Pearlman E.K, Diaconu E.K, Guo K., Mori H., Haqqi T., Markowitz S., Willson J., Sy M.-S. (1996) Expression of hyaluronidase by tumor cells induces angiogenesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7832-7837.
- Lizasoain L., Joaristi L. (1997) SPSS para windows. Capítulo 17: Correlación lineal. pp 323-336. Editorial Paraninfo, Madrid.
- Lohle P.N.M., Wurzer H.A.L., Seelen P.J., Kingma L.M., Go K.G. (1998a). The pathogenesis of cysts accompanying intra-axial primary and metastatic tumors of the central nervous system. *J Neurooncol* 40: 277-285.
- Lohle P.N.M., Wurzer H.A.L., Seelen P.J., Kingma L.M., Go K.G. (1998b) Analysis of fluid in cysts accompanying various primary and metastatic brain tumours; proteins, lactate and pH. (1998) *Acta Neurochir (Wien)* 140: 14-19.
- López-Escobar Fernández M. (2000) Iniciación a la Neurocirugía. Capítulos V: Lesiones Intracraneales Supratentoriales pp 65-92; VI: Lesiones Intracraneales Infratentoriales pp 93-106; VII: Lesiones del Cráneo y de la órbita pp 107-120. Universidad de Cádiz, Servicio de Publicaciones, Cádiz.
- Louis C. J. (1978) Tumours - Basic principles and clinical aspects. Chapter 22: Tumours of the nervous system pp 285-299. Churchill Livingstone. Edinburg.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin- Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Mahon M.M., Williams A.D., Soutter W.P., Cox I.J., McIndoe G.A., Coutts G.A., Dina R., de Souza N.M. (2004)  $^1\text{H}$  magnetic resonance spectroscopy of invasive cervical cancer: an *in vivo* study with *ex vivo* corroboration. *NMR Biomed* 17: 1-9.
- Majós C., Cucurella G., Aguilera C., Coll S., Pons L.C. (1999) Intraventricular meningiomas: MR Imaging and MR spectroscopic findings in two cases. *AJNR Am J Neuroradiol* 20: 882-885.
- Majós C., Alonso J., Aguilera C., Serrallonga M., Acebes J.J., Arús C., Gili J. (2002) Adult primitive neuroectodermal tumor: proton MR spectroscopic findings with possible application for differential diagnosis. *Radiology* 225: 556-566.
- Majós C., Alonso J., Aguilera C., Serrallonga M., Pérez-Martin J., Acebes J.J., Arús C., Gili J. (2003) Proton magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$  MRS) of human brain tumours: assessment of differences between tumour types and its applicability in brain tumour categorisation. *Eur Radiol* 13: 582-591.

- Manton D.J., Lowry M., Blackband S.J., Horsman A. (1995) Determination of proton metabolite concentrations and relaxation parameters in normal human brain and intracranial tumours. *NMR Biomed* 8: 104-112.
- Martin M.L., Martin G.J., Delpuech, J.-J. (1980) Practical NMR spectroscopy. Chapter 7: Relaxation time determinations pp 244-290. Heyden & Son, Great Britain.
- Martínez-Bisbal M.C. (2003) Aplicaciones de la RMN al estudio molecular de enfermedades del sistema nervioso central. Tesis Doctoral, Universitat de València.
- Martínez-Pérez I., Moreno A., Alonso J., Aguas J., Conesa G., Capdevila A., Arús C. (1997) Diagnosis of brain abscess by magnetic resonance spectroscopy. Report of two cases. *J Neurosurg* 86: 708-713.
- Martínez-Pérez I. (1998) Aplicación de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón al diagnóstico *in vivo* de tumores cerebrales humanos. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Masllorens Sibils L. (1998) Gestió d'una base de dades d'espectres i imatges de ressonància magnètica nuclear. Projecte fi de carrera d'Informàtica, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Maxwell R.J., Martínez-Pérez I., Cerdán S., Cabañas M.E., Arús C., Moreno A., Capdevila A., Ferrer E., Bartomeus F., Aparicio A., Conesa G., Roda J.M., Carceller F., Pascual J.M., Howells S.L., Mazucco R., Griffiths J.R. (1998). Pattern recognition analysis of  $^1\text{H}$  NMR spectra from perchloric acid extracts of human brain tumor biopsies. *Magn Reson Med* 39: 869-877.
- Meiboom S., Gill D. (1958) Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev Sci Instrum* 29: 688-691.
- Michaelis T., Merboldt K.-D., Hänicke W., Gyngell M.L., Bruhn H., Frahm J. (1991) On the identification of cerebral metabolites in localized  $^1\text{H}$  NMR spectra of human brain *in vivo*. *NMR Biomed* 4: 90-98.
- Michaelis T., Helms G., Merboldt K.-D., Hänicke W., Bruhn H., Frahm J. (1993) Identification of *scyllo*-inositol in proton NMR spectra of human brain *in vivo*. *NMR Biomed* 6: 105-109
- Molist A., Romarís M., Lindahl U., Villena J., Touab M., Bassols A. (1998) Changes in glycosaminoglycan structure and composition of the main heparan sulphate proteoglycan from human colon carcinoma cells (perlecan) during cell differentiation. *Eur J Biochem* 254: 371-377.

- Moreno A. (1996) Recerca i caracterització de marcadors tumorals mitjançant l'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear de protó en el cas del càncer del budell gruixut. Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Murphy M., Loosemore A., Clifton A.G., Howe F.A., Tate A.R., Cudlip S.A., Wilkins P.R., Griffiths J.R., Bell B.A. (2002) The contribution of proton magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$ MRS) to clinical brain tumour diagnosis. *Br J Neurosurg* 16: 329-334.
- Nadler J.V., Cooper J.R. (1972) N-acetyl-L-aspartic acid content of human neural tumours and bovine peripheral nervous tissues. *J Neurochem* 19: 313-319.
- Negendank W.G., Sauter R., Brown T.R., Evelhoch J.L., Falini A., Gotsis E.D., Heerschap A., Kamada K., Lee B.C.P., Mingeot M.M., Moser E., Padavic-Shaller K.A., Sanders J.A., Spraggins T.A., Stillman A.E., Terwey B., Vogl T.J., Wicklow K., Zimmerman R.A. (1996) Proton magnetic resonance spectroscopy in patients with glial tumors: a multicenter study. *J Neurosurg* 84: 449-458.
- Newcomb E.W., Cohen H., Lee S.; Bhalla S.K., Bloom J., Hayes R.L., Miller D.C. (1998) Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol* 8: 655-667.
- Newton H.B. (1994) Primary brain tumors: review of etiology, diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 49: 787-797.
- Nicholson J.K., Buckingham M.J., Sadler P. (1983) High resolution  $^1\text{H}$  NMR studies of vertebrate blood and plasma. *Biochem J* 211: 605-615.
- Nicholson J.K., Foxall P.J.D. (1995) 750MHz  $^1\text{H}$  and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal Chem* 67: 793-811.
- Ohyama C., Tsuboi S., Fukuda M. (1999) Dual roles of sialyl Lewis X oligosaccharides in tumor metastasis and rejection by natural killer cells. *EMBO J* 18: 1516-1525.
- Opstad K.S., Murphy M.M., Wilkins P.R., Bell B.A., Griffiths J.R., Howe F.A. (2004) Differentiation of metastases from high-grade gliomas using short echo time  $^1\text{H}$  spectroscopy. *J Magn Reson Imaging* 20:187-192.
- Ott D., Hennig J., Ernst T. (1993) Human brain tumors: assessment with *in vivo* proton MR spectroscopy. *Radiology* 186: 745-752.
- Pasternack S.G., Veis A., Breen M. (1974) Solvent-dependent changes in proteoglycan subunit conformation in aqueous guanidine hydrochloride solutions. *J Biol Chem* 249: 2206-2211.
- Pearce E.I., Major G.N. (1978) The colorimetric analysis of sialic acid in human saliva and bovine salivary mucin. *J Dent Res* 57: 995-1002.

- Peeling J., Sutherland G. (1992) High-resolution  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy studies of extracts of human cerebral neoplasms. *Magn Reson Med* 24: 123-136.
- Perry T.L., Hansen S., Gandham S.S. (1981) Postmortem changes of amino compounds in human and rat brain. *J Neurochem* 36: 406-410.
- Plateau P., Guéron M. (1982) Exchangeable proton NMR without base-line distortion, using new strong-pulse sequences. *J Am Chem Soc* 104: 7310-7311.
- Poongodi G.L., Suresh N., Gopinath S.C.B., Chang T., Inoue S., Inoue Y. (2002) Dynamic change of neural cell adhesion molecule polysialylation on human neuroblastoma (IMR-32) and rat pheochromocytoma (PC-12) cells during growth and differentiation. *J Biol Chem* 277: 28200-28211.
- Poptani H., Gupta R.K., Jain V.K., Roy R., Pandey R. (1995) Cystic intracranial mass lesions: possible role of *in vivo* MR spectroscopy in its differential diagnosis. *Magn Reson Imaging* 13: 1019-1029.
- Preul M.C., Caramanos Z., Leblanc R., Villemure J.G., Arnold D.L. (1998) Using pattern analysis of *in vivo* proton MRSI data to improve the diagnosis and surgical management of patients with brain tumors. *NMR Biomed* 11: 192-200.
- Renkonen J., Paavonen T., Renkonen R. (1997) Endothelial and epithelial expression of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A in lesions of breast carcinoma. *Int J Cancer* 74: 296-300.
- Registre del Càncer de Tarragona. Dades relatives al quinquenni 1993-1997.
- Rèmy C., Arús C., Ziegler A., Sam Lai E., Moreno A., Le Fur Y., Dècorps M. (1994) *In vivo*, *ex vivo* and *in vitro* one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy of an intracerebral glioma in rat brain: assignment of resonances. *J Neurochem* 62: 166-179.
- Ricci P.E., Pitt A., Keller P.J., Coons S.W., Heiserman J.E. (2000) Effect of voxel position on single-voxel MR spectroscopy findings. *AJNR Am J Neuroradiol.* 21:367-374.
- Rijkema M., Schuurung J., van der Meulen Y., van der Graaf M., Bernsen H., Boerman R, van der Kogel A., Heerschap A. (2003) Characterization of oligodendrogliomas using short echo time  $^1\text{H}$  MR spectroscopic imaging. *NMR Biomed* 16: 12-18.
- Roda J.M., Pascual J.M., Carceller F., González-Llanos F., Pérez-Higueras A., Solivera J., Barrios L., Cerdán S. (2000) Nonhistological diagnosis of human cerebral tumors by  $^1\text{H}$  magnetic resonance spectroscopy and amino acid analysis. *Clin Cancer Res* 6: 3983-3993.
- Rojo M. I. (1995) *Biología molecular del cáncer. Capítulo 1: Conceptos básicos sobre el cáncer*, pp 15-40. Editorial Síntesis. Madrid.

- Ross B.D. (1991) Biochemical considerations in  $^1\text{H}$  spectroscopy. Glutamate and glutamine; *myo*-Inositol and related metabolites. *NMR Biomed* 4: 59-63
- Rutter A., Hugenholtz H., Saunders J.K., Smith I.C.P. (1995) Classification of brain tumors by *ex vivo*  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *J Neurochem* 64: 1655-1661.
- Sabatier J., Gilard V., Malet-Martino M., Ranjeva J.-P., Terral C., Beril S., Delisle M.-B., Manelfe C., Tremoulet M., Berry I. (1999) Characterization of choline compounds with *in vitro*  $^1\text{H}$  magnetic resonance spectroscopy for the discrimination of primary brain tumors. *Invest Radiol* 34: 230-235.
- Schellock F.G. (1996a). Magnetic resonance bioeffects, safety, and patient management. 2<sup>a</sup>ed. Chapter 3: Bioeffects of radiofrequency electromagnetic fields pp 25-45. Lippincott-Raven. Philadelphia.
- Schellock F.G. (1996b). Magnetic resonance bioeffects, safety, and patient management. 2<sup>a</sup>ed. Chapter 2: Bioeffects of gradient magnetic fields pp 13-23. Lippincott-Raven. Philadelphia.
- Schiller J., Arnhold J., Sonntag K., Arnold K. (1996) NMR studies on human, pathologically changed synovial fluids: role of hypochlorous acid. *Magn Reson Med* 35: 848-853.
- Segebarth C.M., Baleriaux D.F., Luyten P.R., den Hollander J.A. (1990) Detection of metabolic heterogeneity of human intracranial tumors *in vivo* by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopic imaging. *Magn Reson Med*. 13: 62-76.
- Sener R.N. (2003) The glycine peak in brain diseases. *Comput Med Imaging Graph* 27: 297-305.
- Shukla-Dave A., Gupta R.K., Roy R., Husain N., Paul L., Venkatesh S.K., Rashid M.R., Chhabra D.K., Husain M. (2001) Prospective evaluation of *in vivo* proton MR spectroscopy in differentiation of similar appearing intracranial cystic lesions. *Magn Reson Imaging* 19:103-110.
- Sutton L.N., Wehrli S.L., Gennarelli L., Wang Z., Zimmerman R., Bonner K., Rorke L.B., (1994) High-resolution  $^1\text{H}$ -magnetic resonance spectroscopy of pediatric posterior fossa tumors *in vitro*. *J Neurosurg* 81: 443-448.
- Szliwowski H.B., Cumings J.N. (1961). The diagnostic value of the chemical examination of cerebral cyst fluids. *Brain* 84: 204-211.
- Tappaz M., Almarghini K., Legay F., Remi A. (1992) Taurine biosynthesis enzyme cysteine sulfinate decarboxylase (CSD) from brain: the long and tricky trail to identification. *Neurochem Res* 9: 849-859.



- Tate A.R. (1997) Statistical pattern recognition for the analysis of biomedical magnetic resonance spectra. *J Magn Reson Anal* 3: 63-68.
- Tate A.R., Griffiths J.R., Martinez-Perez I., Moreno A., Barba I., Cabanas M.E., Watson D., Alonso J., Bartumeus F., Isamat F., Ferrer I., Vila F., Ferrer E., Capdevila A., Arús C. (1998) Towards a method for automated classification of  $^1\text{H}$  MRS spectra from brain tumours. *NMR Biomed* 11: 177-91.
- Tate A.R., Majós C., Moreno A., Howe F.A., Griffiths J.R., Arús C. (2003) Automated classification of short echo time in In Vivo  $^1\text{H}$  brain tumor spectra: a multicenter study. *Magn Reson Med* 49: 29-36.
- Torri G.M., Torri J., Gulian J.M., Vion-Dury J., Viout P., Cozzone P.J. (1999) Magnetic resonance spectroscopy of serum and acute-phase proteins revisited: a multiparametric statistical analysis of metabolite variations in inflammatory, infectious and miscellaneous diseases. *Clin Chim Acta* 279: 77-96.
- Touab M., Villena J., Barranco C., Arumí-Uría M., Bassols A. (2002) Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *Am J Pathol* 160: 549-557.
- Usenius J.-P., Kauppinen R.A., Vainio P.A., Hernesniemi J.A., Vapalahti M.P., Paljärvi, L.A., Soimakallio, S. (1994a) Quantitative metabolite patterns of human brain tumors: detection by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy *in vivo* and *in vitro*. *J Comput Assist Tomogr* 18: 705-713.
- Usenius, J.-P., Vainio P., Hernesniemi J., Kauppinen R.A. (1994b) Choline-containing compounds in human astrocytomas studied by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy *in vivo* and *in vitro*. *J Neurochem* 63: 1538-1543.
- Valverde, D. (2004) Identificació de marcadors de proliferació cel·lular detectables per espectròscopia de RMN en cèl·lules C6 de glioma de rata. Treball de recerca de mestratge del programa de Doctorat en Bioquímica i Biologia Molecular, UAB.
- van den Boogaart A., van Ormondt D., Pijnappel W.W.F., de Beer R., Ala-Korpela M. (1994). *In: Mathematics in Signal Processing III*, (J.G. McWhirter, Ed.), pp. 175-195, Clarendon Press, Oxford.
- van der Graaf M., Rijpkema M., van der Meulen Y., Majós C., Moreno A., Ziegler A., Howe F.A., Opstad K., Heerschap A. (2002) System quality assurance in INTERPRET, a multicenter study on brain tumor MR spectroscopy. *MAGMA* 15 (suppl 1): 245.
- Veerman E.C., Go K.G., Molenaar W.M., Niew Amerongen A.V., Vissink A. (1998) On the chemical characterization of colloid cyst contents. *Acta Neurochir (Wien)* 140: 303-307.

- Walker A.E., Robins M., Weinfeld F.D. (1985) Epidemiology of brain tumors: the national survey of intracranial neoplasms. *Neurology* 35: 219-226.
- Wilms G., Balériaux D. (1999). *Imaging of cerebral tumors*. 2<sup>a</sup>ed. Lasion Europe, N.V. ISBN 90-74512-58-5/'99. <http://sme.kpn.be/lasion/omri3.htm>
- Wu Y., Zhang Y., Cao L., Chen L., Lee V., Zheng P-S., Kiani C., Adams M.E., Ang L.C., Paiwand F., Yang B.B. (2001) Identification of the motif in versican G3 domain that plays a dominant-negative effect on astrocytoma cell proliferation through inhibiting versican secretion and binding. *J Biol Chem* 276: 14178-14186.
- Zhang Y., Cao L., Yang B.L., Yang B.B. (1998) The G2 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs. *J Biol Chem* 273: 21342-21351.
- Zülch K.J. (1980) Principles of the New World Health Organization (WHO) Classification of brain tumors. *Neuroradiology* 19: 59-66.

***ANNEXOS***



**ANNEX I: Classificació WHO dels tumors del sistema nerviós central (2000)**

<b>TUMORS OF THE NEUROEPITHELIAL TISSUE</b>
<i>Astrocytic tumors</i>
1. Diffuse astrocytoma 9400/3 fibrillary astrocytoma 9420/3 protoplasmic astrocytoma 9410/3 gemistocytic astrocytoma 9411/3
2. Anaplastic astrocytoma 9401/3
3. Glioblastoma 9440/3 giant cell glioblastoma 9441/3 gliosarcoma 9442/3
4. Pylocytic astrocytoma 9421/1
5. Pleomorphic xanthoastrocytoma 9424/3
6. Subependymal giant cell astrocytoma 9384/1
<i>Oligodendroglial tumors</i>
1. Oligodendroglioma 9450/3
2. Anaplastic oligodendroglioma 9451/3
<i>Mixed gliomas</i>
1. Oligoastrocytoma 9382/3
2. Anaplastic oligoastrocytoma 9382/3**
<i>Ependymal tumors</i>
1. Ependymoma 9391/3 cellular 9391/3** papillary 9393/3 clear cell 9391/3** tanycytic 9391/3**
2. Anaplastic ependymoma 9392/3
3. Myxopapillary ependymoma 9394/1
4. Subependymoma 9383/1
<i>Choroid plexus tumors</i>
1. Choroid plexus papilloma 9390/0
2. Choroid plexus carcinoma 9390/3
<i>Glial tumors of uncertain origin</i>
1. Astroblastoma 9430/3
2. Gliomatosis cerebri 9381/3
3. Chordoid glima of the third ventricle 9444/1
<i>Neuronal and mixed neuronal-glial tumors</i>
1. Gangliocytoma 9492/0

2. Dysplastic gangliocytoma of the cerebellum 9493/0**
3. Desmoplastic infantile astrocytoma/ganglioma 9412/1**
4. Dysembryoplastic neuroepithelial tumor 9413/0**
5. Ganglioglioma 9505/1
6. Anaplastic ganglioglioma 9505/3
7. Central neurocytoma 9506/1
8. Cerebellar liponeurocytoma 9506/1**
9. Paraganglioma of the filum terminale 8680/1
<i>Neuroblastic tumors</i>
1. Olfactory neuroblastoma 9522/3
2. Olfactory neuroepithelioma 9523/3
3. Neuroblastoma of the adrenal gland and sympathetic nervous system 9500/3
<i>Pineal parenchymal tumors</i>
1. Pineocytoma 9361/1
2. Pineoblastoma 9362/3**
3. Pineal parenchymal tumor of intermediate differentiation 9362/3
<i>Embryonal tumors</i>
1. Medulloepithelioma 9501/3
2. Ependymoblastoma 9392/3
3. Medulloblastoma 9470/3 desmoplastic medulloblastoma 9471/3 large cell medulloblastoma 9474/3** medullomyoblastoma 9472/3 melanocytic medulloblastoma 9470/3
4. Supratentorial primitive neuroectodermal tumor (PNET) 9473/3 neuroblastoma 9500/3 ganglioneuroblastoma 9490/3
5. Atypical teratoid/rhabdoid tumor 9508/3
<b>TUMORS OF PERIPHERAL NERVES</b>
<i>Schwannoma</i> (neurilemmoma; neurinoma) 9560/0
1. Cellular 9560/0**
2. Plexiform 9560/0**
3. Melanotic 9560/0**
<i>Neurofibroma</i> 9540/0
1. Plexiform 9550/0
<i>Perineurioma</i> 9571/0
1. Intraneural perineurioma 9571/0
2. Soft tissue perineurioma 9571/0
<i>Malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST)</i> 9540/3

1. Epithelioid 9540/3
2. MPNST with divergent mesenchymal and/or epithelial differentiation 9540/3
3. Melanotic 9540/3
4. Melanotic psammomatous 9540/3
<b>TUMORS OF THE MENINGES</b>
<i>Tumors of meningotheial cells</i>
1. Meningioma 9530/0 meningotheial 9531/0 fibrous (fibroblastic) 9532/0 transitional (mixed) 9537/0 psammomatous 9533/0 angiomatous 9534/0 microcystic 9530/0** secretory 9530/0** lymphoplasmacyte-rich 9530/0** metaplastic 9530/0** clear cell 9538/1** chordoid 9538/1** atypical 9539/1** papillary 9538/3** rhabdoid 9538/3** anaplastic meningioma 9530/3
<i>Mesenchymal non-meningotheial tumors</i>
1. Lipoma 8850/0
2. Angiolipoma 8861/0
3. Hibernoma 8880/0
4. Liposarcoma (intracranial) 8850/3
5. Solitary fibrous tumor 8815/0**
6. Fibrosarcoma 8810/3
7. Malignant fibrous histiocytoma 8830/3
8. Leiomyosarcoma 8890/3
10. Rhabdomyoma 8900/0
11. Rhabdomyosarcoma 8900/3
12. Chondroma 9220/0
13. Chondrosarcoma 9220/3
14. Osteoma 9180/0
15. Osteosarcoma 9180/3
16. Osteochondroma 9210/0
17. Hemangioma 9120/0

18. Epithelioid hemangioendothelioma 9133/1
19. Angiosarcoma 9120/3
20. Kaposi sarcoma 9140/3
21. Hemangiopericytoma 9150/1
<i>Primary melanocytic tissue</i>
1. Diffuse melanocytosis 8728/0
2. Melanocytoma 8728/1**
3. Malignant melanoma 8720/3
4. Meningeal melanomatosis 8728/3**
<i>Tumors of uncertain histogenesis</i>
1. Hemangioblastoma 9161/1
<b>LYMPHOMAS AND HEMOPOIETIC NEOPLASMS</b>
1. Malignant lymphoma 9590/3
2. Plasmacytoma 9731/3
3. Granulocytic sarcoma 9930/3
<b>GERM CELL TUMORS</b>
1. Germinoma 9064/3
2. Embryonal carcinoma 9070/3
3. Yolk sac tumor 9071/3
4. Choriocarcinoma 9100/3
5. Teratoma 9080/1 mature 9080/0 immature 9080/3 teratoma with malignant transformation 9084/3
6. Mixed germ cell tumors 9085/3
<b>TUMORS OF THE SELLAR REGION</b>
1. Craniopharyngioma 9350/1 adamantinomatous 9351/1** papillary 9352/1**
2. Granular cell tumor 9582/0**
<b>METASTATIC TUMOURS 8000/6</b>



INTERPRET NUMBER \_\_\_\_\_

**ANNEX II: Full d’entrada de dades a la base de dades preliminar INTERPRET**

	OPERADOR	DATA	COMENTARIS	Noms i ruta arxius FID originals	Noms i ruta arxius FID en database
Dades pacient + paràmetres adquisició					
Anatomia patològica					
FID short echo time					
FID long echo time					
Espectre processat short echo time					
Espectre processat long echo time					
Imatges .jpeg					
Imatges DICOM					
Casella validació dades clíniques					
Casella validació anatomia patològica					



**ANNEX III: Descripció de les dades avaluades en control de qualitat per la certificació del prototip industrial INTERPRET**

Critical data	Main data	Other data
	Contributing centre	
Trial number		
	Age	
	Sex	
	Date of spectroscopy	
		Week since 1st symptom
		Epileptic fit
		Neurological deficit
		Coma
		Steroids
		Anticonvulsant
	Gadolinium	
		Anaesthetic agent
	Mannitol	
		Bleed in tumour
	Tumour location	
	Tumour size	
	Radiological diagnosis	
		Site of operation
	Total tumour removal	
	Subtotal tumour removal	
		Stereotactic biopsy
	Date of biopsy	
Paraffin section WHO class.		
Daumas-Duport Astro.grade		
Histopathology validated		
		Chemotherapy drug used
		Radiotherapy dose given
	Outcome score at 3 months	
	Outcome score at 2 years	
		Date (post mortem)
		Post mortem histopathology WHO class.
	Primary tumour detected	

Critical data	Main data	Other data
		Spectral localization image
Assigned class		
Validated		
		Other

## **ANNEX IV: Full de consentiment informat per obtenció de biòpsies**

### HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PROYECTO DE ESTUDIO IN VITRO DE LESIONES CEREBRALES.

En breve se le practicará una operación quirúrgica que usted deberá autorizar. La muestra de tejido obtenida será sometida a análisis en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital.

Nuestro hospital participa conjuntamente con la Universidad Autónoma de Barcelona en un estudio europeo llamado INTERPRET que pretende una mejora de los métodos de diagnóstico en enfermedades como la suya. Para ello querríamos solicitarle que autorizara que la parte de la biopsia que no sea necesaria para el análisis por Anatomía patológica pueda ser utilizada para ser analizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de dicha Universidad. Dicho estudio no le supondrá ningún inconveniente ni afectará la asistencia que reciba aunque puede ayudar a mejorar el diagnóstico futuro en otros pacientes. Sus datos serán utilizados de forma totalmente confidencial y anónima.

Su participación es totalmente voluntaria y si se niega a participar no se verá afectada la calidad de la atención que reciba.

Una vez dado su consentimiento puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que explicar sus motivos y sin que ello afecte a la asistencia que reciba.

Estamos a su disposición para cualquier pregunta o aclaración que desee.

Si acepta participar en el estudio, le rogamos firme el modelo que se adjunta.

Proyecto Estudio de lesiones cerebrales

Yo,

---

*He leído la hoja de información que se me ha entregado.  
He podido hacer preguntas sobre el estudio.  
He recibido suficiente información sobre el estudio.*

*He hablado con*

---

*Comprendo que mi participación es voluntaria.*

*Comprendo que puedo retirarme del estudio:*

*1) Cuando quiera; 2) Sin tener que dar explicaciones; 3) Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.*

***Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.***

***Fecha:***

***Firma:***

---



## **ANNEX V: Full de consentiment informat previ a l'exploració IRM/ERM**

### **HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PROYECTO INTERPRET**

En breve le va a ser practicado un estudio de Resonancia Magnética, dentro del cual se incluye la realización de una espectroscopía. Técnicamente la espectroscopía no es diferente del resto de la exploración, lo que la diferencia es la información que se obtiene.

Nuestro centro participa en un estudio europeo llamado INTERPRET que pretende conseguir un mejor conocimiento de la utilidad de la espectroscopía en enfermedades como la suya. Es por esto que vamos a solicitar su autorización para utilizar los datos de la exploración en el estudio. No le va a suponer ningún inconveniente (no va a tener que permanecer más tiempo en el interior de la máquina, no se le va a tener que practicar ningún procedimiento molesto para usted, no existe mayor riesgo de efectos adversos). Sus datos serán utilizados de forma totalmente confidencial.

Su participación es totalmente voluntaria y si se niega a participar no se verá afectada la calidad de la atención que reciba.

Una vez dado su consentimiento puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que explicar sus motivos y sin que ello afecte a la asistencia que reciba.

Estamos a su disposición para cualquier pregunta o aclaración que desee.

Si acepta participar en el estudio le rogamos firme el modelo que se adjunta.

---

Proyecto "INTERPRET"

Yo, \_\_\_\_\_

*He leído la hoja de información que se me ha entregado.*

*He podido hacer preguntas sobre el estudio.*

*He recibido suficiente información sobre el estudio.*

*He hablado con \_\_\_\_\_*

*Comprendo que mi participación es voluntaria.*

*Comprendo que puedo retirarme del estudio:*

*1º Cuando quiera; 2º Sin tener que dar explicaciones; 3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos*

*Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.*

*Fecha*

*Firma*





## ANNEX VI: Càlculs teòrics per la planificació de les dissolucions model de m-Ino i gly

### Amplitud d'un senyal

L'amplitud d'un senyal de RMN ( $a_k$ ) és directament proporcional a la concentració molar del metabòlit  $k$  ( $\rho_k$ ), al nombre de protons del metabòlit  $k$  que contribueixen al senyal ( $N_{p,k}$ ), al volum observat ( $v$ ), a la sensibilitat de la bobina ( $S$ ) i al factor de càrrega de la bobina ( $Q$ ).

$$a_k = \rho_k N_{p,k} v S Q \quad (\text{eq.1})$$

Aquesta proporcionalitat es veu modificada per:

- La saturació del senyal per efecte del temps de relaxació  $T_1$  durant els temps de reciclatge de la seqüència (TR),
- L'atenuació del senyal per efecte del temps de relaxació  $T_2$  durant els temps d'eco (TE) que hi pugui haver en la seqüència,
- L'atenuació del senyal per efecte del temps de relaxament  $T_1$  durant els temps de mescla (TM) que hi pugui haver en la seqüència,

$$a_k = \rho_k N_{p,k} v S Q (1 - e^{-TR/T_1,k}) (e^{-TM/T_1,k}) (e^{-TE/T_2,k}) \quad (\text{eq.2})$$

Per conveniència, definim una nova variable  $atten_k$  que agrupa els termes d'atenuació:

$$atten_k = (1 - e^{-TR/T_1,k}) (e^{-TM/T_1,k}) (e^{-TE/T_2,k})$$

I simplifiquem l'equació 2 a :

$$a_k = atten_k \rho_k N_{p,k} v S Q \quad (\text{eq.3})$$

Per altra banda, si el perfil del senyal es veu distorsionat a causa de la modulació per efecte de la constant o constants d'acoblament durant la seqüència de polsos, tindrem que l'àrea mesurable del senyal distorsional ( $a'_k$ ) serà diferent de l'àrea del senyal, existint un factor de proporcionalitat  $x_k$  característic que depèn de la seqüència emprada i de la durada dels intervals TE i TM:

$$\begin{aligned}
 a'_k &= x_k a_k \\
 &= x_k \text{atten}_k \rho_k N_{p,k} \text{vSQ}
 \end{aligned}
 \tag{eq. 4}$$

Per a aquests càlculs en concret, per tal de calcular el coeficient de visibilitat, s'han fet servir espectres adquirits anteriorment al grup amb m-Ino i NAA als dos temps d'eco. Usant els valors de  $T_1$ ,  $T_2$  i de paràmetres d'adquisició, s'han calculat els valors esperats i obtinguts per m-Ino, i a partir d'aquí s'ha deduït el factor de visibilitat aproximat.

### Senyal suma de dos senyals que co-ressonen

Suposem el cas d'un senyal que és suma de dos senyals que co-ressonen i que s'originen de dues molècules diferents. En aquest cas podem expressar l'amplitud del senyal resultant  $a'_{1+2}$  com la suma dels senyals individuals  $a'_1$  i  $a'_2$  de cadascuna de les molècules.

$$\begin{aligned}
 a'_{1+2} &= a'_1 + a'_2 \\
 &= x_1 \text{atten}_1 \rho_1 N_{p,1} \text{vSQ} + x_2 \text{atten}_2 \rho_2 N_{p,2} \text{vSQ}
 \end{aligned}
 \tag{eq. 5}$$

### Normalització del senyal suma respecte un tercer senyal

Si ara normalitzem aquest senyal per un altre senyal adquirit en el mateix espectre i procedent d'una tercera molècula, obtenim que:

$$\begin{aligned}
 \frac{a'_{1+2}}{a_3} &= \frac{a'_1 + a'_2}{a_3} \\
 &= \frac{x_1 \text{atten}_1 \rho_1 N_{p,1} \text{vSQ}}{x_3 \text{atten}_3 \rho_3 N_{p,3} \text{vSQ}} + \frac{x_2 \text{atten}_2 \rho_2 N_{p,2} \text{vSQ}}{x_3 \text{atten}_3 \rho_3 N_{p,3} \text{vSQ}}
 \end{aligned}
 \tag{eq.6}$$

que es simplifica a :

$$\frac{a'_{1+2}}{a_3} = \frac{x_1 \text{atten}_1 \rho_1 N_{p,1}}{x_3 \text{atten}_3 \rho_3 N_{p,3}} + \frac{x_2 \text{atten}_2 \rho_2 N_{p,2}}{x_3 \text{atten}_3 \rho_3 N_{p,3}}
 \tag{eq.7}$$

### Senyal suma de glicina i m-Ino normalitzat respecte a creatina

En aquest cas,

- el senyal 1 correspon a un singlet de glicina que no presenta modulació durant la seqüència ( $x_1=1$ ), i que té dos protons ( $N_{p,1}=2$ )

- el senyal 2 és un multiplet de m-Ino que presenta modulació i que s'origina de quatre protons ( $N_{p,2}=4$ )
- el senyal 3 es un singlet de creatina que tampoc presenta modulació ( $x_3=1$ ). En aquest cas, el nombre de protons que originen el senyal és de tres ( $N_{p,3}=3$ )

Així, el senyal suma donat per l'equació 7 esdevé:

$$\frac{a'_{1+2}}{a_3} = \frac{(atten_1 \rho_1 2) + x_2 atten_2 \rho_2 4}{atten_3 \rho_3 3} \quad (\text{eq.8})$$

### Quocient del senyal (gly+m-Ino)/cr adquirit a dos temps d'eco

Si fem el quocient d'aquests senyals suma normalitzats adquirits a dos temps d'eco (TE) i i j, obtenim que :

$$\frac{a'_{1+2,i} / a'_{3,i}}{a'_{1+2,j} / a'_{3,j}} = \frac{(atten_{1,i} \rho_1 2 + x_{2,i} atten_{2,i} \rho_2 4) / atten_{3,i} \rho_3 3}{(atten_{1,j} \rho_1 2 + x_{2,j} atten_{2,j} \rho_2 4) / atten_{3,j} \rho_3 3} \quad (\text{eq.9})$$

Que es simplifica a:

$$\frac{a'_{1+2,i} / a'_{3,i}}{a'_{1+2,j} / a'_{3,j}} = \frac{(atten_{1,i} \rho_1 2 + x_{2,i} atten_{2,i} \rho_2 4) atten_{3,j}}{(atten_{1,j} \rho_1 2 + x_{2,j} atten_{2,j} \rho_2 4) atten_{3,i}} \quad (\text{eq.10})$$

Per tal de veure com varia aquest índex respecte al quocient de concentracions [m.-Ino]/[gly], caldrà que el posem en funció de  $\rho_2/\rho_1$ . Per conveniència definim les igualtats,

$$\begin{aligned} m_i &= atten_{3,j} atten_{1,i} \\ m_j &= atten_{3,i} atten_{1,j} \\ n_i &= atten_{3,j} 4x_{2,i} atten_{2,i} \\ n_j &= atten_{3,i} 4x_{2,j} atten_{2,j} \end{aligned}$$

d'on:

$$\frac{a'_{1+2,i} / a'_{3,i}}{a'_{1+2,j} / a'_{3,j}} = \frac{m_i \rho_1 + n_i \rho_2}{m_j \rho_1 + n_j \rho_2} \quad (\text{eq. 11})$$

i definim una nova variable  $r = \rho_2/\rho_1$  que és el quocient de concentracions [m-Ino]/[gly].

Si posem l'equació 11 en funció d'aquesta nova variable tenim que ( $\rho_2 = r\rho_1$ )

$$\begin{aligned} \frac{a'_{1+2,i} / a'_{3,i}}{a'_{1+2,j} / a'_{3,j}} &= \frac{m_i \rho_1 + n_i r \rho_1}{m_j \rho_1 + n_j r \rho_1} \\ &= \frac{m_i + n_i r}{m_j + n_j r} \end{aligned} \quad (\text{eq.12})$$

### Valor límit de l'índex per valors elevats de [m-Ino]/[gly]

El límit de la funció 12 quan  $r = \rho_2 / \rho_1 \rightarrow \infty$  és:

$$\begin{aligned} \lim_{r \rightarrow \infty} &= \frac{m_i + n_i r}{m_j + n_j r} = \frac{n_i}{n_j} \\ &= \frac{\text{atten}_{3,j} x_{2,i} \text{atten}_{2,i}}{\text{atten}_{3,i} x_{2,j} \text{atten}_{2,j}} \end{aligned}$$

és a dir, a concentracions elevades de m-Ino respecte a la concentració de glicina, el valor límit del quocient a dos temps d'eco del senyal a 3,5 ppm normalitzat respecte a la creatina depèn exclusivament de:

- la visibilitat *atten3* – és a dir, la combinació de concentració i atenuació – del senyal de creatina emprat en la normalització en els dos temps d'eco emprats,
- la visibilitat *atten2* – és a dir, la combinació de concentració i atenuació del senyal de m-Ino emprat en la normalització en els dos temps d'eco emprats,
- el factor de proporcionalitat *x2* que ens dóna la pèrdua d'àrea causada per la modulació del senyal de m-Ino durant la seqüència de polsos i per uns paràmetres d'adquisició determinats.

Aquest valor ha estat calculat a partir d'espectres adquirits prèviament al CDP i comparant els valors esperats (per càlcul en base a  $T_1$ ,  $T_M$ ,  $T_2$  i paràmetres d'adquisició) per m-Ino i els valors obtinguts.

### Valor límit de l'índex per valors baixos de [m-Ino]/[gly]

El límit de la funció 12 quan  $r = \rho_2 / \rho_1 \rightarrow 0$  és:

$$\begin{aligned} \lim_{r \rightarrow 0} &= \frac{m_i + n_i r}{m_j + n_j r} = \frac{m_i}{m_j} \\ &= \frac{\text{atten}_{3,j} \text{atten}_{1,i}}{\text{atten}_{3,i} \text{atten}_{1,j}} \end{aligned}$$

és a dir, a concentracions baixes de m-Ino respecte a la concentració de glicina, el valor límit del quocient a dos temps d'eco senyal a 3,5 ppm normalitzat respecte a la creatina depèn exclusivament de

- la visibilitat  $atten_3$  – és a dir, la combinació de concentració i atenuació – del senyal de creatina emprat en la normalització en els dos temps d'eco emprats,
- la visibilitat  $atten_1$  – és a dir, la combinació de concentració i atenuació – del senyal, de glicina emprat en la normalització en els dos temps d'eco emprats.



## **ANNEX VII: Prototip científic INTERPRET**

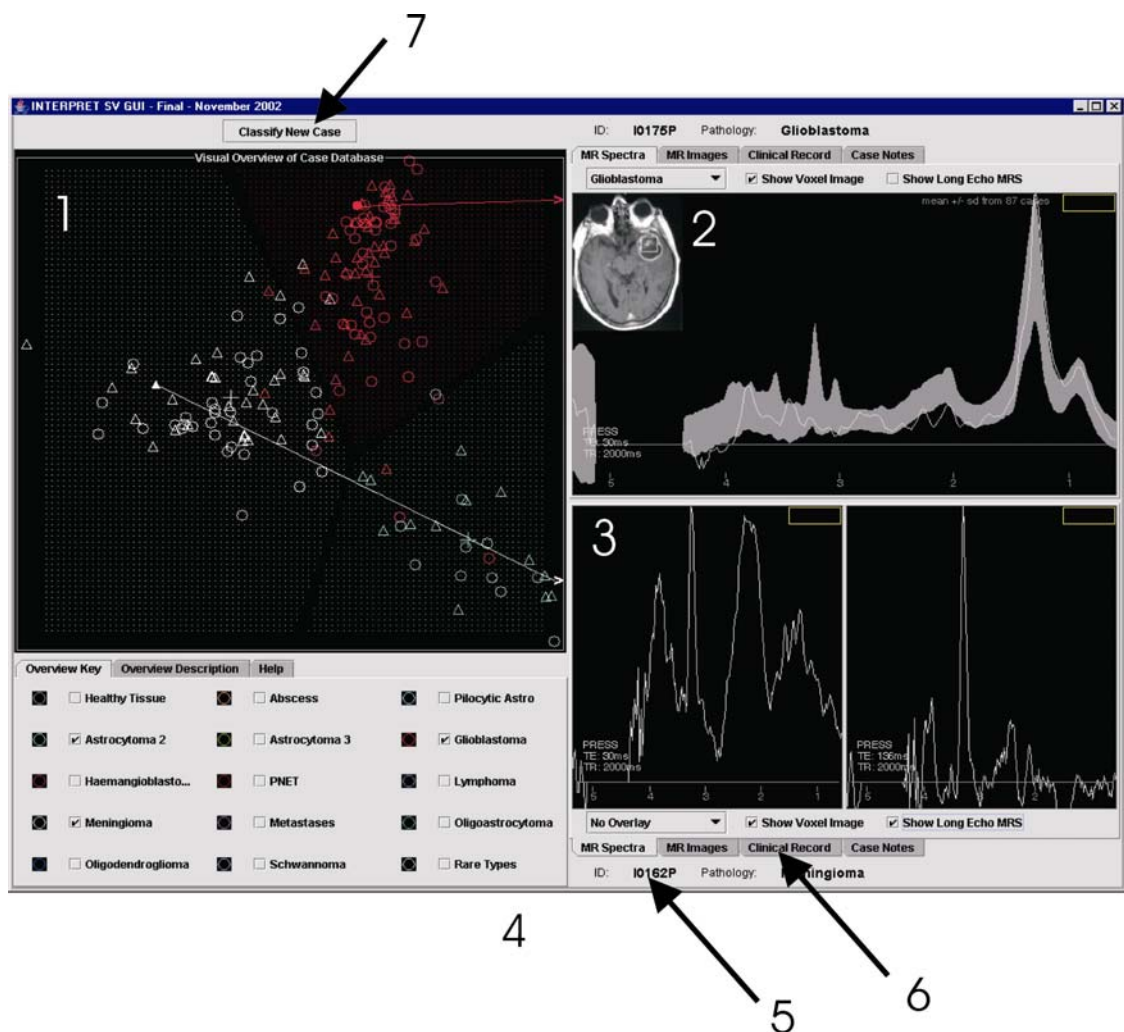
El prototip científic és una eina d'auxili al diagnòstic derivada del treball desenvolupada al projecte INTERPRET, àmpliament emprada en aquesta tesi per il·lustrar i comentar resultats. És basada en el reconeixement de patrons espectrals de tumors cerebrals humans.

Aquest annex pretén descriure breument les seves funcionalitats per a un millor enteniment de les “pantalles” emprades en aquesta tesi per visualitzar dades

Les següents figures il·lustren diferents situacions que es reflexen a les figures d'aquesta tesi. A continuació de les figures, s'explicarà el significat de les pantalles, tenint entès que les explicacions són vàlides a totes les figures del prototip científic.

Aquest programari va ser el primer pas en la direcció del prototip industrial, versió apta per a la comercialització i que ha passat per processos de certificació per part de la Comunitat Europea (<http://www.scito.com/>).

## Exemple de Pantalla I

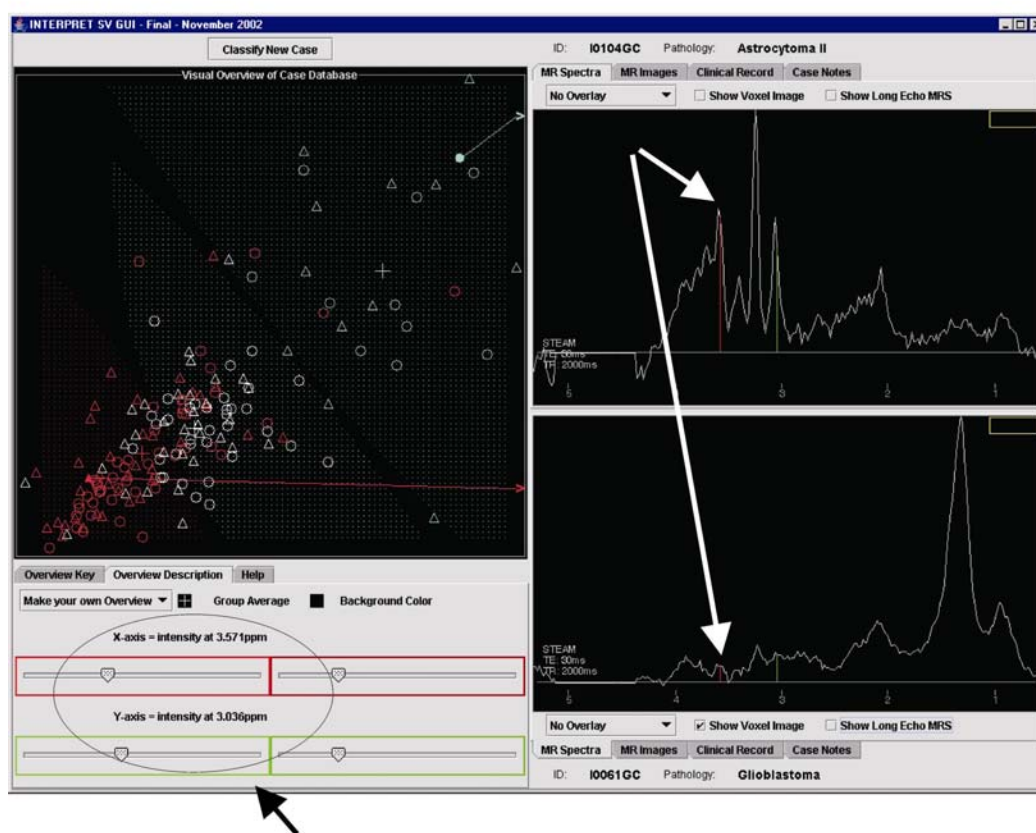


Pantalla típica del prototip científic: a l'esquerra (1) Pantalla que mostra l'espectre de cada cas transformat en un punt en un espai bidimensional on cada eix representa un "valor discriminant" calculat a partir d'una combinació lineal de les variables triades ponderades per maximitzar la separació entre les classes que interessa separar (sempre variables a TE curt). En aquest cas, es mostra la representació típica de meningiomes vs. glioblastomes vs. astrocitomes de baix grau. Les divisions en color que es veuen al fons corresponen a les *boundaries*, equivalents als límits que situen l'univers espacial ocupat pels casos d'un cert tipus tumoral. A la dreta (2) les pantalles de visualització d'espectres, imatges i dades clíniques. Pot ensenyar només un espectre de temps d'eco curt (20-32ms) com a (2) o bé els dos temps d'eco com a (3). En (2) veiem la imatge de IRM que mostra el volum d'interès (vòxel) emprat per espectroscòpia, que pot ser mostrada per als casos que tinguin aquesta informació. També veiem, en gris, la superposició de l'espectre promig +/- la desviació estàndar de la patologia en qüestió. En (3) veiem els espectres als dos TE d'un cas de



meningioma. A la dreta i a baix (4) es veu la llegenda de color de les diferents patologies que poden ser mostrades o no, segons es marca la seva casella. En (5) es veu la identificació del cas, nombre i patologia. (6) mostra les diferents pestanyes a seleccionar segons es vol veure imatges, dades clíniques o bé afegir algun comentari. Finalment, (7) mostra el botó de menú que dóna l'opció de classificar un nou cas i que aquest aparegui com un punt més a l'espai bidimensional.

## Exemple de Pantalla II



La pantalla (II) il·lustra la possibilitat que té el prototip de mostrar altres distribucions espacials personalitzades per l'usuari. Es pot atribuir a l'eix de les abscisses i ordenades l'alçada d'un punt concret de l'espectre o bé un quocient entre l'alçada de dos punts. Aquí es veu la representació personalitzada, usada moltes vegades en aquesta tesi, de l'alçada a 3,57 ppm (eix X) vs. l'alçada a 3,03 ppm (eix Y). A la dreta es mostren un espectre d'astrocitoma de grau baix (a dalt) i un glioblastoma (a baix). Els punts triats per l'usuari es marquen a l'espectre amb ratlles vermelles (abscisses) i verdes (ordenades).



**ANNEX VIII: ARTICLES**



A. P. Candiota  
C. Majós  
A. Bassols  
M. E. Cabañas  
J. J. Acebes  
M. R. Quintero  
C. Arús

## Assignment of the 2.03 ppm resonance in in vivo $^1\text{H}$ MRS of human brain tumour cystic fluid: contribution of macromolecules

Received: 15 March 2004  
Revised: 4 May 2004  
Accepted: 26 May 2004  
Published online: 31 August 2004  
© ESMRMB 2004

A. P. Candiota · M. R. Quintero  
C. Arús (✉)  
Departament de Bioquímica i  
Biologia Molecular  
Unitat de Bioquímica de Ciències  
Edifici Cs, Universitat Autònoma de  
Barcelona, 08193, Cerdanyola del Vallès  
Spain  
E-mail: carles.arus@uab.es  
Tel.: +34-93-5811257  
Fax: +34 93 5811264

C. Majós  
Institut de Diagnòstic per la Imatge (IDI)  
Hospital Duran i Reynals  
CSU de Bellvitge, Autovia de  
Castelldefels km 2.7  
08907, L'Hospitalet de Llobregat  
Barcelona, Spain

A. Bassols  
Departament de Bioquímica i  
Biologia Molecular  
Unitat de Bioquímica de  
Veterinària, Edifici V  
08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

M. E. Cabañas  
SeRMN, Edifici Cs  
Universitat Autònoma de  
Barcelona 08193, Spain

J. J. Acebes  
Department of Neurosurgery  
Hospital Princeps d'Espanya  
CSU de Bellvitge, Feixa Llarga s/n  
08907, L'Hospitalet de Llobregat  
Barcelona, Spain

**Abstract** MRI and MRS are established techniques for the evaluation of intracranial mass lesions and cysts. The 2.03 ppm signal recorded in their  $^1\text{H}$ -MRS spectra is often assigned to NAA from outer volume contamination, although it has also been detected in non-infiltrating tumours and large cysts. We have investigated the molecular origin of this resonance in ten samples of cystic fluids from human brain tumours. The NMR detected content of the 2.03 ppm resonance in 136 ms echo time spectra, assuming an *N*-CH<sub>3</sub> origin, was  $3.19 \pm 1.01$  mM. Only one third ( $34 \pm 12\%$ ) of the *N*-acetyl containing compound (NAC) signal could be extracted by perchloric acid (PCA) indicating that most of it originated in a macromolecular PCA-insoluble component. Chemical analysis of the cyst fluids showed that sialic acid bound to macromolecules would account for 64.3% and hexuronic containing compounds for 29.2% of the NMR-detectable *ex vivo* signal, 93.4% of the signal at TE 136 ms. Lactate content measured by NMR ( $6.4 \pm 4.4$  mM) and the predominance of NAC originating in sialic acid point to a major origin from tumour rather than from plasma for this 2.03 ppm resonance.

**Keywords** Brain neoplasms · Cyst · *N*-acetyl neuraminic acid · *N*-acetyl aspartate

## Introduction

Several intracranial lesions, including gliomas, metastases, craniopharyngiomas, hemangioblastomas and abscesses, among others, may appear as cystic masses on magnetic resonance and computed tomography studies of the brain [1]. Several authors have been searching for characteristic MR spectral patterns from different types of cystic lesions that could assist MRI for differential diagnosis in doubtful cases [2]. This has been most successful in the bilateral discrimination of abscesses and aggressive necrotic tumours [3–5] but has not been widely applied to help in the characterisation of human brain tumours.

Approximately 10% of those CNS tumours are accompanied by a fluid-filled cystic region. There are different hypotheses about the origin and significance of intratumoral or peritumoral cysts, as discussed elsewhere [6]. There is growing interest in characterising these tumoral cystic lesions because studying their content could provide more insight into the pathogenesis of cyst formation. Also these studies could help in the *in vivo* prediction of the aggressiveness and/or metastatic potential of the tumour [6, 7].

Accordingly, the purpose of this work has been to study the origin of the 2.03 ppm resonance, a major signal detected in  $^1\text{H}$ -MRS of cystic fluids from different human brain tumours. This signal is usually attributed to *N*-Acetyl aspartate (NAA) from brain parenchyma due to partial volume effects or healthy infiltrated tissue, both in cysts [8] and solid tumours [9], although it is also detected in non-infiltrating tumours, such as meningiomas [10, 11]. Up to now, we have studied ten cystic fluids from human brain tumours by *ex vivo* NMR and chemical assay and compared our results with *in vivo* data.

## Materials and methods

### Collection of cystic samples

Samples were collected during open surgery at the Hospital Universitari de Bellvitge (HUB), from tumours containing a cystic component as evaluated from the MRI exploration. The Institutional Review Board approved the study and patients gave signed informed consent prior to surgery. Samples were frozen in liquid nitrogen within 5 min after collection and maintained in those conditions until processing at Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). The tumour diagnostic was provided by the Anatomical Pathology department of HUB.

### *In vivo* NMR spectroscopy

MRI/MRS exploration was carried out in a Philips scanner (ASC NT) operating at 1.5 T. Spin echo (SE),  $T_1$ , proton

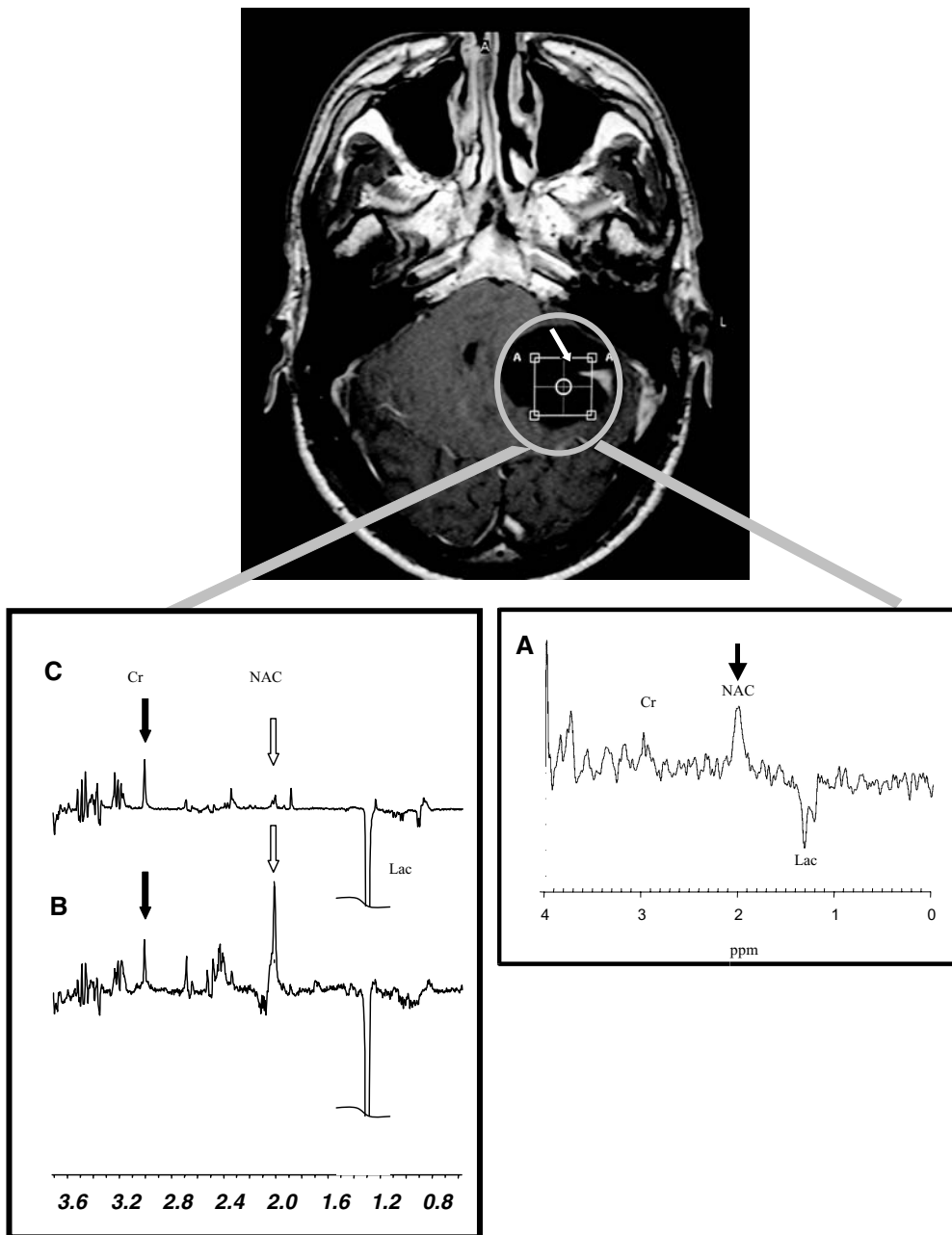
density (PD), fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) and  $T_2$ -weighted MR images were obtained in the sagittal and axial planes as part of the standard data acquisition protocol. SE  $T_1$ -weighted images after gadolinium (Magnevist; Schering, Berlin, Germany) administration at a dose of 0.1 mM per kilogram of body weight were also obtained in the axial and coronal planes. MRS measurements were carried out after contrast administration in all cases. MRS acquisition parameters were: 512 data points, SW 1,000 Hz, TR 2 s, TE 30 and 136 ms, PRESS sequence. Voxel size ranged between 3.37 and 8 cc depending on the lesion size and was centered on the necrotic/cystic area, avoiding the cellular tumour area. Criteria for defining a region as necrotic/cystic were: peripheral contrast enhancement but no enhancement of the necrotic/cystic core, and homogeneous appearance of the sampled region. Voxel position was decided by the radiologist after the evaluation of the whole set of images (weighted in  $T_1$ ,  $T_2$ , PD and FLAIR). Possible contamination from solid tumour was discarded by analysing the voxel reference image (Fig. 1) in post-contrast  $T_1$ -weighted images obtained in at least two orthogonal planes, usually axial and coronal. Number of acquisitions changed with voxel size (range 96–192 scans). Unsuppressed water reference spectra were also acquired with the same parameters except that the number of acquisitions was 16. Processing of *in vivo* spectra was carried out with MRUI, Magnetic Resonance User Interface (<http://carbon.uab.es/mrui/mruiHomePage.html>). Briefly, metabolite spectra were corrected for eddy current artefacts by means of water deconvolution [12], and residual water was removed by using HLSVD-water filtering [13]. Line broadening (1 Hz) was applied.

### Generation of mean *in vivo* spectra

Before calculating mean spectra, each *in vivo* spectrum was baseline corrected taking as a reference the average of two intervals between 9 and 11 ppm and  $-0.5$  and  $-2$  ppm; residual water between 4.33 and 5.10 ppm was brought to zero; it was normalised to unit length using the following formula (Eq. 1):

$$\frac{x}{\sqrt{\sum x^2}} \quad (1)$$

where  $x$  represents each baseline-corrected spectral point and  $\sum x^2$  is the sum of the squares of all spectral point heights in the spectral range between 7.1 and 2.7 ppm. Then, spectra were linearly interpolated at about 0.02 ppm resolution between consecutive digitised points. Frequency alignment was checked, by order of preference, using one of the following: creatine at 3.03 ppm, choline at 3.21 ppm and NAC at 2.03 ppm as internal chemical shift references. Finally, spectra in this canonical ASCII format were added and mean values ( $\pm$  SD) for each spectral point calculated for display or calculation of ratios.



**Fig. 1a–c** Magnetic resonance imaging (axial  $T_1$ -weighted, post-contrast) of patient HB2, diagnosed hemangioblastoma. The voxel for spectroscopy is centered in the cystic part of the tumour, showing no contamination from the solid part, apart from a small peduncle (white arrow). “A” at the edges of the voxel corresponds to unerasable marks provided by the software package. **a** *In vivo* spectrum (TE=136 ms, PRESS) from the cystic part of the same patient. The NAC peak at 2.03 ppm (solid arrow) is clearly visible. **b** and **c** 9.4 T spectra (TE= 136 ms) of an *ex vivo* sample (**b**) and a PCA extract spectrum (**c**) From the cystic fluid sample of the same patient scaled at constant creatine height. Tentative assignment of the main peaks: creatine at 3.03 ppm is marked with a solid arrow and NAC at 2.03 ppm with an open arrow. Note the difference in the relative heights of NAC and creatine before and after the PCA extraction. Lactate peak at 1.33 ppm is shown clipped

#### *Ex vivo* high-resolution NMR spectroscopy

The fluid samples collected at the hospital were allowed to thaw and placed in a 5 mm NMR tube (Wilmad/Lab Glass, NJ, USA). External trimethyl silyl propionic acid sodium salt (TSP) (Sigma Aldrich, Milwaukee, Wis., USA) in  $D_2O$  (concentration 2 mM,  $pH^*$ —uncorrected pH meter reading—7.2) in a coaxial capillary (outer diameter 1 mm) was used for chemical shift reference, quantification and for lock purposes. The TSP capillary (the external reference) was previously calibrated with a fumarate solution of known concentration. Pulse-and-acquire (presat- $90^\circ$ -acquisition) and jump-and-return spin echo (JRSE,

presat- $90_x^\circ - \tau - 90_{-x}^\circ$  -TE/2- $180^\circ$ -TE/2-acquisition) spectra essentially as in [14] were acquired at 298 K.

Acquisition parameters were: time domain 8 k complex points, sweep width 4854 Hz,  $90^\circ$  hard pulse (7  $\mu$ s), recycling time 10 s, echo time (in JRSE, to match *in vivo* echo time acquisition conditions) 136 and 30 ms, inter-pulse delay ( $\tau$ ) 181  $\mu$ s in JRSE, yielding a sinusoidal excitation profile with a null at carrier frequency and a maximum at 1.33 ppm [15], and water presaturation power 0.05 mW during 1 s. Number of acquisitions was 128 scans except in two cases (64 scans) in an ARX—400 spectrometer operating at 9.4 T (Bruker SADIS, Wissembourg, France). *Ex vivo* spectra were processed with FID offset correction, zero filling to 16 K and 1 Hz line broadening before Fourier transformation with WINNMR version 6.1.0.0 (Bruker Daltonik, GmbH) running on a personal computer. Peaks of interest were quantified by fitting them to Lorentzian-shaped curves.

The spin-spin relaxation time of resonances of interest in cystic fluids was measured with the Carr-Purcell Meiboom Gill method [16]. Ten spectra were acquired with pulse trains resulting in relaxation intervals between 4 and 2,000 ms, with an inter-pulse delay of 1 ms. The recycling time was 10 s (long enough to avoid  $T_1$  saturation effects on the resonances of interest, data not shown). The number of acquisitions ranged between 32–256 scans. All spectra were processed in the same way, and Lorentzian-shaped curves were fitted to the *N*-acetyl-containing compound (NAC) resonance. These areas were adjusted to a bi-exponential decay function with SIGMAPLOT version 4.00 (SPSS Inc. Chicago, Ill., USA). The output of the program was  $T_2$  value of each component A and B ( $T_{2,A}$  and  $T_{2,B}$ ) and coefficients of contribution ( $C_A$  and  $C_B$ ) at TE=0. At least one cystic fluid sample for each tumour type was analysed and, whenever possible, mean  $T_{2,A}$  and  $T_{2,B}$  values and coefficients were calculated and applied to all samples of the same tumour type. Areas at TE=0 were calculated from TE 136 ms fitted areas, as follows (Eq. 2).

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

Where ‘AreaTE136’ is the total area measured for NAC at this echo time;  $C_A$  and  $C_B$  are the coefficient of contribution for components A and B;  $T_{2,A}$  and  $T_{2,B}$  are spin-spin relaxation times measured for components A and B.

Furthermore, peak areas were corrected to account for the sinusoidal excitation profile that results from the 1:1 binomial pulse in the JRSE pulse sequence [15], by applying the  $A_{\text{corr}} = A_0/|\sin 2\pi \nu_i \tau|$ , where  $A_{\text{corr}}$  is the corrected area,  $A_0$  is the measured area,  $\nu_i$  is the peak frequency in Hz relative to the central excitation null of the spectrum, and  $\tau$  is the inter-pulse delay.

For TSP an equivalent correction was applied except that there was a single component instead of two. After carrying out these steps, we could calculate the real concentration of the NAC, by comparing its calculated area at zero echo time and that

of TSP with the relationship obtained in the calibration spectra of the TSP capillary against a fumarate solution of known concentration. Then, NAC concentration was calculated as follows (eq. 3):

$$[\text{NAC}] = [\text{fum}] \times \frac{(\text{NAC areaTE0/TSP areaTE0})}{(\text{fum area/TSP area})} \times \frac{2}{3} \quad (3)$$

Where [fum] is the fumarate concentration, fum area and TSP area are the areas obtained from these compounds in the calibration step; NAC area TE0 and TSP area TE0 are the corrected areas of these compounds from the *ex vivo* spectra acquired at TE 136 ms, considering  $T_2$  effects, as already mentioned; and [NAC] is the final concentration of NAC, assuming  $\text{CH}_3$  groups as the origin of this resonance. The 2/3 factor is necessary considering that the fumarate resonance and the NAC resonance are due to a different number of equivalent protons.

#### PCA extracts

Perchloric acid (PCA) extracts were carried out essentially as in [17], except that only one re-extraction of the PCA pellet was carried out. Briefly, 0.5 ml of the cystic fluid samples was extracted by making it 0.5 M in PCA. External fumarate (ca. 5  $\mu$ mol for each ml of fresh sample) was added as an internal standard to account for extraction process losses. Samples were centrifuged to eliminate perchlorate salts and freeze-dried. Prior to NMR acquisition, samples were resuspended in 400  $\mu$ l of  $\text{D}_2\text{O}$ . pH\* was adjusted to  $6.98 \pm 0.1$  and TSP added as chemical shift and concentration standard (final concentration of TSP=1 mM). PCA extraction of standards was made in the same manner as for samples, except that the standards were diluted in  $\text{H}_2\text{O}$  at a 100 mg/ml concentration prior to PCA addition.

#### *In vitro* high-resolution NMR spectroscopy

Perchloric-acid-extracted samples were placed in a 5 mm NMR tube. Pulse-and-acquire and jump-and-return spin echo spectra (TE 136 ms) were acquired with the same acquisition parameters used for *ex vivo* spectra. They were also processed in the same manner as *ex vivo* ones, except for the line broadening applied (0.3 Hz). Extraction losses were calculated from the expected versus found fumarate, corrected for  $T_1$  due to partial saturation using factors calculated in additional spectra with 30 s recycling time. Considering the measured fumarate  $T_1$  under PCA extract conditions ( $9.8 \pm 1.2$  s A.P. Candiota, unpublished results), a correction factor of 1.05 was applied to the fumarate area (our internal standard in those samples) before correcting for losses in extracted cyst metabolites (average extraction losses



were 24%, range 4–49%). All resonances were fitted to Lorentzian-shaped curves and quantified with respect to the TSP reference with WINNMR version 6.1.0.0 (Bruker Daltonik, GmbH) in a personal computer, and finally corrected for the percent losses observed in fumarate. PCA recovery of the peak of interest was calculated from *ratios* between the NAC and creatine (3.03 ppm), measured from the *ex vivo* and *in vitro* spectra (both jump-and-return spin echo with TE 136 ms), assuming that creatine is 100% extracted by PCA (which is a reasonable assumption provided that the PCA pellet is re-extracted at least once [18]) and calculating the expected and found area for the peak of interest.

## Chemical assays and protein analysis

### Protein assay

The cystic fluids were analysed for its protein content by the Lowry method [19] using the protein analysis kit from SIGMA. As the protein content was high, cystic fluids were diluted 1:50. The standard used was bovine serum albumin 10 g/dl, diluted 1:100.

### Hexuronic-containing compounds

Assay was carried out with the Carbazol method [20] but samples were diluted 1:10 to fit in the linear part of the calibration curve under our experimental conditions (between 0 and 80 µg/ml of glucuronic acid, data not shown). To 200 µl of sample, 1 ml of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added and the mixture kept in a boiling bath for 10 min. After cooling to room temperature, 50 µl of the Carbazol solution were added and samples were boiled again for 15 min. Absorbance was measured at 530 nm. The standard used for the calibration curve was glucuronic acid. Previously, chondroitin sulphate (polymer of repeating units of glucuronic acid and *N*-acetylgalactosamine) was also tested for calibration curve purposes and results were found to be equivalent to the hexuronic acid use. As cystic fluid samples had background colour, we carried out a sample blank for each analysis, consisting in sample, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and ethanol but without Carbazol. Chondroitin sulphate was purchased from Calbiochem (La Jolla, Calif., 92039–2087, USA).

### Sialic acid

This assay was carried out with all samples diluted 1:5. The analytical protocol was carried out as in [21], except for the standard used. Initially we considered using free sialic acid for that, but analysing our results for total and bound sialic acid, it was obvious that the majority of the sialic acid present in our samples was in the bound form. Other authors [22] did use standards other than sialic acid depending on the compounds present in their samples. We chose mucine from bovine submaxillary glands as the standard for our cystic fluid samples because of the assumed greater similarity between the mucine and *N*-acetyl compounds of the sample cyst than with free sialic acid.

Unless otherwise stated, reagents and standards used were purchased from SIGMA (St Louis, MO 63178, USA).

## Statistical analysis

Statistically significant differences were evaluated with the student's *t*-test for independent samples. The significance level was set at 0.05. For NAC/Cr ratios a nonparametric test was used to assess differences (Mann-Whitney's U test). All analyses were carried out with SPSS version 11.5.1 (SPSS Inc, Chicago, Ill., USA).

## Results

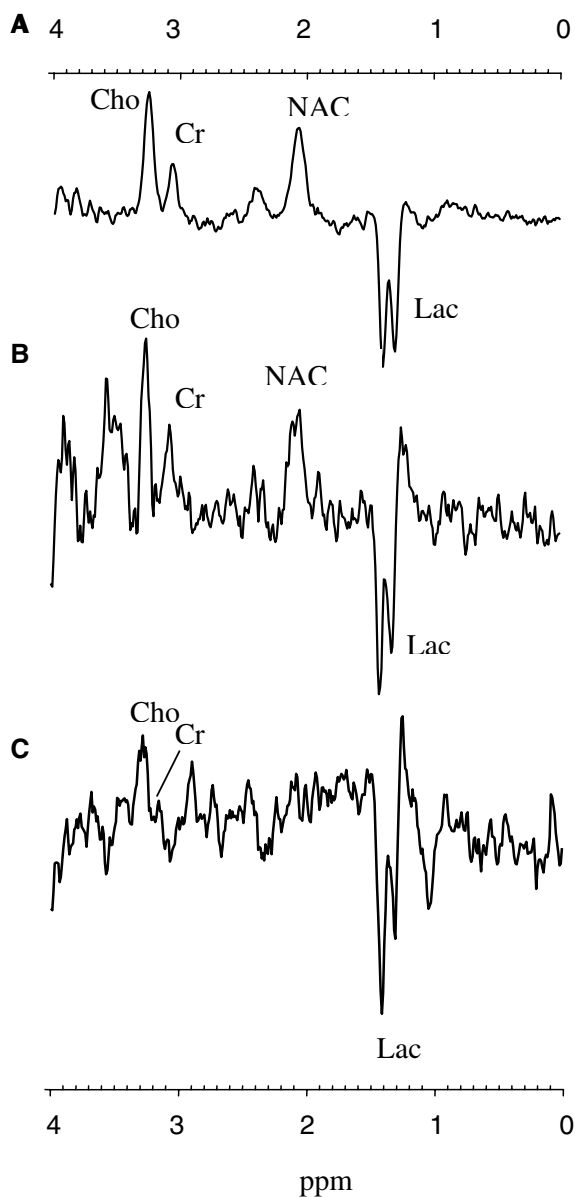
### *In vivo* spectra

Magnetic resonance imaging of a cyst in an hemangioblastoma patient shows lack of visible contamination from the solid tumour volume in the MRS sampled voxel (Fig. 1). MRS clearly shows a 2.03 singlet and a 1.33 centered doublet, quite possibly lactate. Signal-to-noise ratio (SNR) for the highest peak in this case was 13.76 (SNR defined as highest peak height in the range 0–3.4 ppm/SD of noise). Not all cases having liquid obtained at surgery had *in vivo* spectra because not all patients that underwent surgery had previous MR exploration in the scanning institution. In all cases for which *in vivo* spectra were available, the 2.03 ppm peak was present. Figure 2 shows mean *in vivo* MRS spectra (TE 136 ms, PRESS) of cystic volumes from several tumours taken from the INTERPRET database (<http://carbon.uab.es/INTERPRET>).

The average ratio of the NAC/creatine peak height was calculated to compare later on with *ex vivo* data. A value of  $2.82 \pm 2.25$  (SD) was obtained from the calculated mean spectra of all cysts available from the INTERPRET database ( $n = 19$ , ten glioblastomas, three metastasis, four low grade astrocytomas, two hemangioblastomas).

### *Ex vivo* spectra and T2 measurements

Visual inspection of the ten *ex vivo* spectra recorded demonstrated the 2.03 ppm peak in all of them (Fig. 3). The diagnoses were craniopharyngiomas ( $n = 3$ ; two of them from the same patient that underwent surgery twice), hemangioblastomas ( $n = 3$ ), glioblastomas ( $n = 2$ ), pilocytic astrocytoma ( $n = 1$ ) and metastasis ( $n = 1$ ). Besides the NAC peak, *ex vivo* spectra showed resonances compatible with lactate (1.33 ppm), trimethylamine-containing compounds (3.21 ppm), creatine (3.03 ppm), glutamate (2.35 ppm), glutamine (2.47 ppm) and other aminoacids (c.a. 0.9 ppm). The average NAC/creatine peak height ratio was  $2.43 \pm 1.01$  ( $n = 10$ ). Quantification of the NAC peak content was carried out from 136 ms echo time



**Fig. 2a–c** Mean *in vivo* spectra (TE=136 ms, PRESS) of the cystic part of several tumours. Three groups were arbitrarily made after visual inspection of each spectrum for NAC content: the NAC peak was clearly detectable (**a**,  $n=12$ ), or present but borderline (**b**,  $n=4$ ) or not detectable (**c**,  $n=2$ )

spectra, as pulse-and-acquire spectra showed broad resonances in the region of interest which caused problems when trying to fit the NAC peak. To account for  $T_2$  signal loss effects,  $T_2$  measurements were carried out in one cystic fluid per tumour type and results are shown in Table 1 and Fig. 4. Experimental points were fitted to a bi-exponential equation. The average  $T_2$  values found (Table 1) were used to extrapolate NAC peak area at zero

echo time as described in methods.  $T_2$  measurement was also carried out for the TSP resonance (value found, 2.2 s) to also correct signal loss for this signal. The NAC methyl group concentration calculated from NMR data is listed in Table 2, the mean value being  $3.19 \pm 1.01$  (range 2.38–5.56 mM).

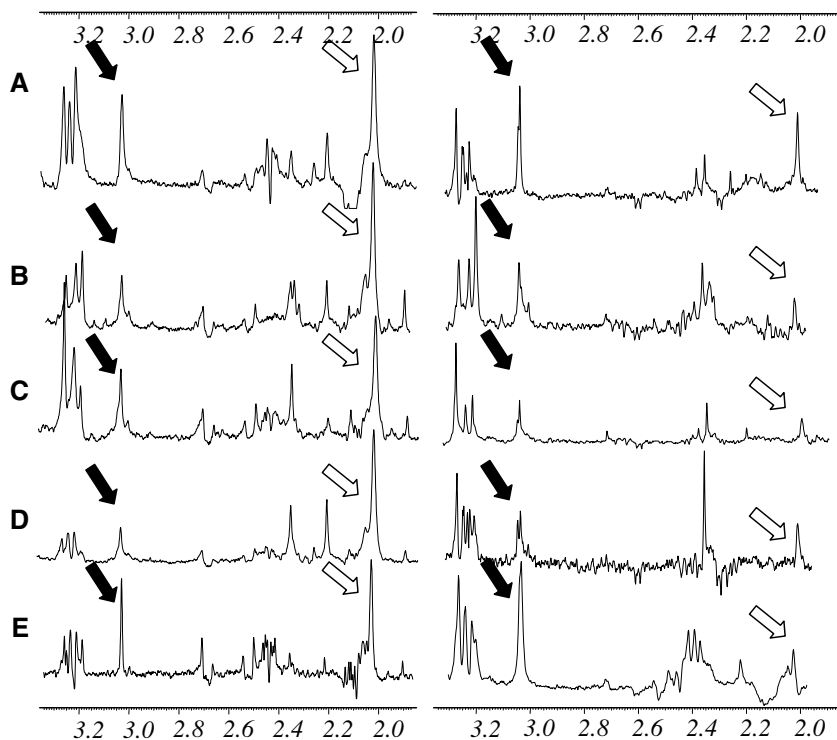
When pulse-and-acquire spectra (TE=0) were directly integrated in the  $2.03 \pm 0.07$  ppm region, a larger average NAC concentration was found,  $7.55 \pm 1.66$  mM.

#### PCA extracts of standards and cystic fluids

Perchloric acid recovery values from standards (Table 3) suggest that, as expected, large macromolecules like proteoglycans from bovine nasal septum (average molecular weight, 230 kDa [23]) are basically insoluble in PCA. Somewhat surprisingly, glucosaminoglycans, polymeric sialic acid (colominic acid) and sialylated protein (mucine) are partially soluble (34–68% PCA extraction) in PCA. Similar results have been described in the literature for the small protein thymosine (MW=4963Da), which shows an extrapolated recovery of 66.3% after PCA extraction in [24].

Cyst samples extracted with PCA were analysed by high-resolution NMR to investigate which part of the NAC signal was insoluble in PCA and thus of a macromolecular type. We have considered creatine as a fully PCA-extractable compound, like other low-molecular-weight metabolites [25–29] and used it as an internal standard to calculate the recovery of the compound of interest after PCA extraction comparing *ex vivo* and *in vitro* PCA extract NMR spectra. One example of poor PCA solubility of the NAC-containing compound is illustrated in Fig. 1 and in Table 2 (case HB2).

Perchloric acid extract spectra from different cystic fluids displayed a characteristic pattern of lactate, NAC peak, trimethylamine-containing compounds, creatine, glutamate and glutamine. Figure 4 shows spectra from cystic fluids from different tumour types before and after PCA extraction. Comparison of the two sets of spectra shows that, apart from the 2.03 ppm NAC resonance, other as yet unassigned resonances at ca. 2.2 and 2.5 ppm are partially PCA insoluble and suggest a macromolecular origin. Besides, the trimethylamine region shows also quantitative and qualitative differences among cystic fluids; compare for example samples B (ME1) and C (GB1). If these differences are reproducible, they might have diagnostic interest. It is also interesting to remark that all cystic fluids present a resonance at 3.27 ppm, that could be attributed to betaine [30], which may derive from choline and have an osmolyte function. Lactate concentration, calculated from its methyl peak area, was variable among samples analysed (range 0.15–19.30 mM) (Table 2). When values were pooled for malignant (glioblastoma, metastasis) or benign (pilocytic



**Fig. 3** Comparison of *ex vivo* (left column) and PCA extract spectra (right column) shows that, apart from the 2.03 ppm NAC resonance (empty arrow), other resonances at ca 2.2 and 2.5 ppm are partially PCA insoluble and suggest a macromolecular origin. Solid arrow points to Cr at 3.03 ppm. Abbreviations are: (A) pilocytic astrocytoma (patient AP1), (B) metastasis (patient ME1), (C) glioblastoma multiforme (patient GB1), (D) craniopharyngioma (patient CF2) and (E) hemangioblastoma (patient HB2)

**Table 1** Bi-exponential (A,B) spin-spin relaxation times measured for representative samples of each pathology and percentage of the contribution to the 2.03 ppm signal at TE=0 ms, as calculated with SIGMAPLOT

Sample codification	$T_{2,A}$ (ms)	Contribution of compound A to the signal at TE=0 (%)	$T_{2,B}$ (ms)	Contribution of compound B to the signal at TE=0 (%)
HB2	$45.6 \pm 17.5$	64.6	$705.3 \pm 50.0$	35.4
CF2	$63.2 \pm 4.8$	78.8	$583.4 \pm 75.8$	21.2
GB1	$35.6 \pm 3.0$	73.6	$547.0 \pm 80.0$	26.4
ME1	$49.2 \pm 5.2$	72.8	$762.7 \pm 122.0$	27.2
AP1	$54.6 \pm 20.1$	65.2	$837.19 \pm 336.9$	34.8
Mean $\pm$ sd	$49.6 \pm 10.3$	$71.0 \pm 6.0$	$687.1 \pm 121.4$	$29.0 \pm 6.0$

HB hemangioblastoma, CF craniopharyngioma, GB glioblastoma, ME metastasis, AP pilocytic astrocytoma

astrocytoma, hemangioblastoma, craniopharyngioma), values were  $11.9 \pm 0.9$  mM for malignant ( $n = 3$ ) and  $4.0 \pm 2.6$  mM for benign ( $n = 7$ ), differences being statistically significant ( $p=0.001$ ).

#### Chemical assays and protein analysis of the cystic fluids

Analysis of the cystic fluids for non-collagenous protein content (Table 2) gave an average concentration of  $4.8 \pm 1.3$  g/dl (range 2.8–6.78 g/dl) ( $n = 10$ ). This value is comparable with values previously described in the literature [31–33]. Lohle et al. [32] divided the tumours into two groups, benign and malignant tumours (total  $n = 39$ ;  $n$  with protein values=35). When the protein content reported in [32] is averaged for each group, we have

obtained mean protein values slightly lower in malignant ( $3.92$  g/dl,  $n = 26$ ) than in benign tumours ( $4.49$  g/dl,  $n = 9$ ). Results are similar for our samples (malignant,  $4.54$  g/dl,  $n = 3$  and benign,  $4.84$  g/dl,  $n = 7$ ), although no statistically significant differences were found between these two groups for the measured protein content.

#### Hexuronic-acid-containing compounds assay

This assay was positive in all samples. According to values listed in Table 2, the mean value found was  $0.93 \pm 0.56$  mM. The percentage of hexuronic-acid-containing compounds, with respect to the value calculated by NMR at TE 136 ms for NAC in the cystic fluid spectra, was 29.2%.

**Table 2** Individual and mean values for the *N*-methyl-content-based calculation of the NAC peak for the ten cystic fluids analysed by *ex vivo* NMR and by chemical quantification of hexuronic and sialic acid compounds

Sample	NAC (mM)	Lactate (mM)	Protein (g/dl)	Hexuronic acid (mM)	Sialic acid (mM)	Percentage of NMR signal explained by chemical assay	Percentage recovery after PCA
AP1	2.38	1.63	5.4	1.46	1.45	122.0	46.0
CF1	2.80	3.21	2.8	0.43	1.94	84.6	33.2
CF2	5.56	6.79	5.7	0.86	2.97	68.9	29.5
CF3	2.53	7.81	6.8	2.29	1.85	164.0	52.6
GB1	2.63	19.30	3.5	0.76	1.58	89.0	37.8
GB2	4.35	10.78	5.7	0.45	3.28	85.7	26.0
HB1	3.02	4.32	3.5	0.93	2.20	103.6	41.2
HB2	3.42	0.15	5.2	0.80 ± 0.02 ( <i>n</i> = 5)	2.03	83.0	18.6 ± 1.9 ( <i>n</i> = 2)
HB3	2.69	1.51	4.2	0.72	1.52	83.0	46.0
ME1	2.49	6.65	4.4	0.64	1.72	94.8	11.5
Mean ± SD	3.19 ± 1.01	6.4 ± 4.4	4.8 ± 1.3	0.93 ± 0.56	2.05 ± 0.64	93.4	34.3 ± 12.3

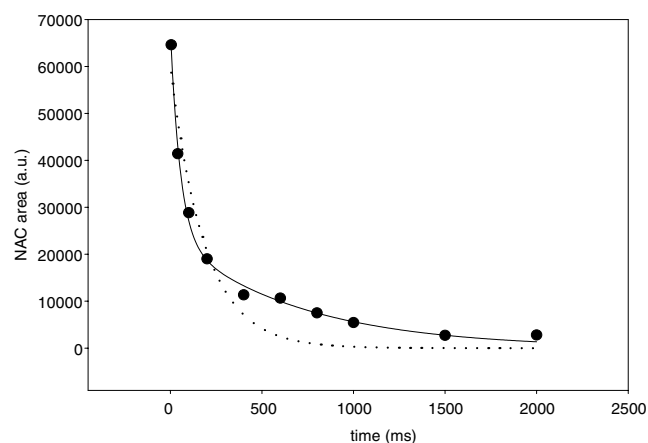
Lactate content measured by NMR from PCA-extracted cyst fluid. Protein content of the cyst fluid, percentage recovery after PCA extraction and percentage of the NMR measured signal explained by the sum of the chemically detected compounds is also tabulated. “*n*” states number of aliquots assayed if higher than one. Abbreviations as in Table 1

**Table 3** Percentage of PCA extract recovery and measured  $T_2$  for the ca 2.03 ppm signal in different standards as compared with the mean values of our cystic fluid samples

	PCA recovery (%)	$T_{2,A}$ (ms)	$T_{2,B}$ (ms) <sup>a</sup>
Chondroitin sulphate ( <i>n</i> = 2)	67.5 ± 9.1	35.4 ± 3.2	361.4 ± 36.6
Proteoglycan from bovine nasal septum ( <i>n</i> = 2)	1.4 ± 0.1	35.0 ± 4.9	585.2 ± 204.0
Colomonic acid ( <i>n</i> = 2)	48.4 ± 5.0	29.4 ± 2.8	486.7 ± 90.4
Mucine from bovine submaxillary glands ( <i>n</i> = 2)	34.3 ± 3.1	47.3 ± 17.3	523.3 ± 147.3
Sialic acid	NC	–	910.9 ± 43.6
Mean of cystic fluid samples ( <i>n</i> = 10)	34.3 ± 12.3	49.6 ± 10.3	687.1 ± 121.4

NC=not calculated

<sup>a</sup> Sialic acid  $T_2$  calculation was adjusted to a mono-exponential decay



**Fig. 4** Representative bi-exponential  $T_2$  decay fitting of the NAC peak area in arbitrary units (a.u.), obtained with sample HB2. For comparison, a mono-exponential fitting is shown with a *discontinuous line*. Individual and mean  $T_2$  values calculated are listed in Table 1

### Sialic acid assay

The mean concentration measured for total sialic acid was  $2.05 \pm 0.6$  mM which represents 64.3% of the NMR-calculated NAC concentration. Individual values for the studied samples are also listed in Table 2.

### Discussion

All *ex vivo* cystic fluids (*n* = 10) from human brain tumours analysed in this study did contain an NAC resonance at 2.03 ppm. The NAC/creatinine peak height ratio in the *ex vivo* spectra ( $2.43 \pm 1.01$ , *n* = 10) was not significantly different (Mann-Whitney’s U test) from the *in vivo* spectra ( $2.82 \pm 2.25$ , *n* = 19), suggesting that cystic fluid sampled accurately represents the *in vivo* recorded MRS pattern. A word of caution should be noted. In this work

*in vivo* and *ex vivo* data were not paired, as most cystic fluid collected did not have a matching MRS exploration of the cystic volume for the same patient.

A 2.03 ppm peak had also been described in the average spectra of 16 tumour cysts from major tumour groups although no further work was devoted to its characterisation [34]. Burtscher and Holtás [35], described the NAC resonance in a cyst from a metastasis and declared it not consistent with NAA origin. NAC was also detected in a gliopendymal cyst and attributed to “*N*-acetyl-containing compounds” by inspection of its *ex vivo* NMR pattern [36]. Furthermore, absence of a 2.04 ppm resonance was reported in the same study [36] in the cystic spectra recorded from a group ( $n = 20$ ) of cystic glioblastomas. Only cho and lip/lac were reported as being detectable and lipids were high in the *ex vivo* spectra shown. It should also be mentioned that, in previous work, the same authors [36] described the detection of “NAA” in the cystic volumes of a group of high- ( $n = 8$ ) and low-grade gliomas ( $n = 6$ ) and one meningioma [2]. This suggests that the authors in [36] could be sampling mostly necrotic core content while cystic fluid sampled from our glioblastoma patients could partially have originated from an active production of protein-rich fluid by the tumour in addition to the contribution of plasma protein exudate from blood-brain barrier (BBB) breakdown [6]. A review of the cystic lesions of the brain [37] describes that 92% of the total protein content in human brain tumours cyst fluids consists of plasma protein fractions and it is well known that some of these proteins have *N*-acetyl containing glycosidic residues (*N*-acetylated hexoses, sialic acid. . .) detectable by  $^1\text{H}$  NMR at an echo time of 136 ms [38,39]. From this, it would be reasonable to expect some contribution from such high molecular weight substances to the cyst NMR spectral pattern. The fact that only 34% of the NAC could be extracted by PCA also points to a macromolecular origin for these compounds. The PCA-soluble fraction of the cyst fluids might be explained by the contribution of low-molecular-weight compounds but also by the partial PCA solubility of polymeric glycosidic (sialic/glucosamine) compounds (Table 3).

On the other hand, the prevalent lactate content of these fluids, clearly higher than the usual plasma values (0.5–2.8 mM), suggests that the metabolism of the tumour surrounding the cyst also contributes significantly to its chemical make-up [32]. In addition, lactate content in the fluid has been described as being significantly higher in malignant versus benign cystic tumours [32]. Our results are in agreement with these data. This suggests that tumour metabolism in itself rather than breakdown of the blood-brain barrier alone may contribute to the MRS recorded pattern. In this respect, it is well known that tumour cells shed membrane-associated macromolecules that may contribute to the 2.03 resonance [7,40,41].

At present, a growing part of the MR diagnosis of tumours is based on the information provided by the metabolite fingerprint obtained by MRS, in addition to MRI information [9]. It has been our intention to characterise further the molecular origin of the 2.03 ppm resonance to typify the recorded MRS patterns of the *in vivo* cysts. This may have a future application to complement non-invasive tumour diagnosis and prognosis [10]. The chemical analysis of samples for sialic- or hexuronic-acid-containing compounds explains on average about 93.4% of the concentration measured by NMR of the *N*-acetyl groups calculated from TE 136 ms spectra extrapolated to zero echo time. Then, practically all the 2.03 ppm signal detectable in the studied cystic fluids at TE 136 ms may originate from the *N*-acetyl group of these sialic (64%) or hexuronic acid (29%) containing compounds. When spectra obtained with the pulse-and-acquire sequence (TE=0 ms) are considered, the average concentration that can be found by integration at  $2.03 \pm 0.07$  increases to  $7.55 \pm 1.66$  mM, suggesting that very short  $T_2$  components, quite possibly amino acid resonances in proteins, are contributing to it. This difference is statistically significant with  $P < 0.001$ . Nonetheless, these compounds would not be relevant for the interpretation of *in vivo* spectra obtained at the usual echo times (TE>20 ms). Additionally, lipid resonances from fatty acids ( $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ) due to a necrotic process [42] could possibly contribute to the NAC signal, but only in cysts with a clear necrotic pattern also at 1.3 ppm ( $(-\text{CH}_2)_n-$ ), because the approximate ratio of 1.3/2.0 ppm peak heights in necrotic cores is about 6.1 [42]— $6.97 \pm 1.25$ ,  $n = 10$  (unpublished results calculated from highly necrotic tumours at TE 135 ms from the INTERPRET database <http://carbon.uab.es/INTERPRET/int.Disc.FrozenDB.shtml>). The lipid pattern at 1.3 ppm was low or nonexistent in the cystic fluid samples investigated in this work. Assuming that the hexuronic acid content provides a good estimate for the *N*-acetyl groups contained in glucosaminoglycans (GAGs) (i.e. chondroitin sulphate), the ratio of sialic-originated *N*-acetyl groups and GAGs-originated ones in our cyst samples would be about 2.2 (Table 2). When we compare this ratio to that which can be calculated from data reported in [39] for plasma of patients with cancer, about 0.28, we find reasons to reinforce our belief that, for this NAC resonance, cyst fluid composition does not follow, like in the case of lactate, typical plasma values, but points to a relevant tumour derived contribution in the recorded cyst spectral pattern.

Having discussed the origin of the 2.03 ppm resonance in cystic fluids, it is worthwhile considering its possible origin in normal or pathological solid brain tissue. In this respect, Hanstock et al. [43] proposed that the 2.02 ppm NAA resonance in normal brain spectra could not be due to *N*-acetylaspartate alone because the 2.02/2.65 ppm peak ratio was larger *in vivo* than for NAA phantom

spectrum acquired under comparable conditions. Other authors [44,45] have also noted that the NAA/Cr ratio from human brain parenchyma *in vivo* is larger than what could be expected from PCA extract data, possibly reflecting a significant contribution to the *in vivo* “NAA” signal from PCA-insoluble *N*-acetyl-containing compounds. Furthermore, Nadler et al. [46] studied the NAA content of several human neural tumours and attributed any NAA found to contamination from adherent neural tissue, a view reinforced by others [47]. Furthermore, authors in [44] already hinted at the possibility that compounds other than NAA would contribute to the “NAA” peak detected in human brain tumours. This would be in agreement with data reported in this work if we assume a tumoral origin for part of the *N*-acetyl-containing macromolecules detected in the cystic fluids analysed. Indeed, it is well known that tumoral cells shed sialic-acid-containing macromolecular components to the extracellular fluid surrounding the tumour [40, 41, 48, 49]. These macromolecular components could well be NMR visible while still attached to or surrounding the tumoral cells.

In summary, we have found that all ten cystic fluids analysed *in vitro* contain a detectable 2.03 ppm resonance. The major contributor to this resonance is not *N*-acetylaspartate but macromolecule-bound sialic acid, with smaller contributions from hexuronic-containing glucosaminoglycans.

Qualitative and quantitative differences detected in cystic fluids in this work might be used in future *in vivo* studies to improve diagnostic accuracy already provided by the analysis of the solid part of the tumour by *in vivo* MRS.

**Acknowledgements** We thank Mohamed Zakari, Jordi Montero and Guillem Mercadal for providing and adapting for use the automated processing and spectra-averaging software derived from the INTERPRET project. Work funded by MEDIVO (MCYT SAF 2002-00440), Generalitat de Catalunya (2001 SGR-194 and XT2002-48) and INTERPRET (EU-IST-1999-10310). A.P.C. holds a predoctoral fellowship from MCYT.

## References

- Bernstein M, Berger MS (2000) Neuro-oncology: the essentials. Thieme Medical, New York, pp 310, 330, 385, 413
- Poptani H, Gupta RK, Jain VK, Roy R, Pandey R (1995) Cystic intracranial mass lesions: possible role of *in vivo* MR spectroscopy in its differential diagnosis. *Magn Reson Imaging* 13:1019–1029
- Martinez-Perez I, Moreno A, Alonso J, Aguas J, Conesa G, Capdevila A, Arús C (1997) Diagnosis of brain abscess by magnetic resonance spectroscopy. Report of two cases. *J Neurosurg* 86:708–713
- Grand S, Passaro G, Ziegler A, Esteve F, Boujet C, Hoffmann D, Rubin C, Segebarth C, Décorps M, Le Bas JF, Rémy C (1999) Necrotic tumor versus brain abscess: importance of amino acids detected at 1H MR spectroscopy—initial results. *Radiology* 213:785–793
- Burtscher IM, Holtás S (1999) *In vivo* proton MR spectroscopy of untreated and treated brain abscesses. *AJNR Am J Neuroradiol* 20:1049–1053
- Lohle PNM, Wurzer HAL, Seelen PJ, Kingma LM, Go KG (1998) The pathogenesis of cysts accompanying intra-axial primary and metastatic tumors of the central nervous system. *J Neurooncol* 40:277–285
- Veerman ECI, Go KG, Molenaar WM, Nieuw Amerongen AV, Vissink A (1998) On the chemical characterization of colloid cyst contents. *Acta Neurochir (Wien)* 140:303–307
- Chang K-H, Song IC, Kim SH, Han MH, Kim HD, Seong SO, Jung HW, Han MC (1998) *In vivo* single voxel proton MR spectroscopy in intracranial cystic masses. *AJNR Am J Neuroradiol* 19:401–405
- Howe FA, Opstad KS (2003) 1H MR spectroscopy of brain tumours and masses. *NMR Biomed* 16:123–131
- Tate AR, Majós C, Moreno A, Howe FA, Griffiths JR, Arús C (2003) Automated classification of short echo time in *in vivo* 1H Brain tumor spectra: a multicenter study. *Magn Reson Med* 49:29–36
- Majós C, Cucurella G, Aguilera C, Coll S, Pons LC (1999) Intraventricular meningiomas: MR Imaging and MR spectroscopic findings in two cases. *AJNR Am J Neuroradiol* 20:882–885
- Klose U (1990) *In vivo* proton spectroscopy in presence of eddy currents. *Magn Reson Med* 14:26–30
- van den Boogaart A, van Ormondt D, Pijnappel WWF, de Beer R, Ala-Korpela M (1994) In: McWhirter JG (ed.) Mathematics in signal processing III, Clarendon, Oxford, pp. 175–195
- Barba I, Cabañas ME, Arús C (1999) The relationship between nuclear magnetic resonance-visible lipids, lipid droplets and cell proliferation in cultured C6 cells. *Cancer Res* 59:1861–1868
- Gueron M, Plateau P, Décorps M (1991) Solvent signal suppression in NMR. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 20:137–209
- Meiboom S, Gill D (1958) Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev Sci Instrum* 29:688–691
- Rémy C, Arús C, Ziegler A, Sam Lai E, Moreno A, Le Fur Y, Décorps M (1994) *In vivo*, *ex vivo*, and *in vitro* one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy of an intracerebral glioma in rat brain: assignment of resonances. *J Neurochem* 62:166–179
- Le Belle JE, Harris NG, Williams SR, Bhakoo KK (2002) A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution 1H-NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 15:37–44
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin–Phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Bitter T, Muir HM (1962) A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* 4:330–334

21. Jourdan GW, Dean L, Roseman S (1971) The sialic acids. XI: a periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *J Biol Chem* 246(2):430–435
22. Pearce EIF, Major GN (1978) The colorimetric analysis of sialic acid in human saliva and bovine salivary mucin. *J Dent Res* 57(11–12):995–1002
23. Pasternack SG, Veis A, Breen M (1974) Solvent-dependent changes in proteoglycan subunit conformation in aqueous guanidine hydrochloride solutions. *J Biol Chem* 249:2206–2211
24. Kauppinen RA, Niskanen T, Hakumaki J, Williams SR (1993) Quantitative analysis of <sup>1</sup>H NMR detected proteins in the rat cerebral cortex *in vivo* and *in vitro*. *NMR Biomed* 6:242–247
25. Barány M, Glonek T (1979) Phosphorus-31 Nuclear magnetic resonance of contractile systems. *Methods enzymol* 85:624–677
26. Evanochko WT, Sakai TT, Ng TC, Krishna MR, Kim HD, Zeidler RB, Ghanta VK, Brockman RW, Schiffer LM, Braunschweiger PG, Glickson JD (1984) NMR study of *in vivo* RIF-1 tumors. Analysis of perchloric acid extracts and identification of <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P, and <sup>13</sup>C resonances. *Biochimica et Biophysica Acta* 805:104–116
27. Fan TWM, Higashi RM, Lane AN, Jardtzy O (1986) Combined use of <sup>1</sup>H-NMR and GC-MS for metabolite monitoring and *in vivo* <sup>1</sup>H-NMR assignments. *Biochimica et Biophysica Acta* 882:154–167
28. Burri R, Bigler P, Straehl P, Posse S, Colombo JP, Herschkowitz N (1990) Brain development: <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy of rat brain extracts compared with chromatographic methods. *Neurochem Res* 15:1009–1016
29. Sze DY, Jardtzy O (1990) Determination of metabolite and nucleotide concentrations in proliferating lymphocytes by <sup>1</sup>H-NMR of acid extracts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1054:181–197
30. Brown JC, Mills GA, Sadler PJ, Walker V (1989) <sup>1</sup>H NMR studies of urine from premature and sick babies. *Magn Reson Med* 11:193–201
31. Szliwowski HB, Cumings JN (1961) The diagnostic value of the chemical examination of cerebral cyst fluids. *Brain* 84:204–212
32. Lohle PNM, Wurzer HAL, Seelen PJ, Kingma LM, Go KG (1998) Analysis of fluid in cysts accompanying various primary and metastatic brain tumours: proteins, lactate and pH. *Acta Neurochir (Wien)* 140:14–19
33. Jungreis CA, Chandra R, Kricheff I, Chuba JV (1988) *In vitro* magnetic resonance properties of CNS neoplasms and associated cysts. *Invest Radiol* 23:12–16.
34. Tate AR, Griffiths JR, Martínez-Perez I, Moreno A, Barba I, Cabanas ME, Watson D, Alonso J, Bartomeus F, Isamat F, Ferrer I, Vila F, Ferrer E, Capdevila A, Arús C (1998) Towards a method for automated classification of <sup>1</sup>H MRS spectra from brain tumours. *NMR Biomed* 11:177–191
35. Burtscher IM, Holtås S (2001) Proton magnetic resonance spectroscopy in brain tumours: clinical applications. *Neuroradiology* 43:345–352
36. Shukla-Dave A, Gupta RK, Roy R, Husain N, Paul L, Venkatesh SK, Rashid MR, Chhabra DK, Husain M (2001) Prospective evaluation of *in vivo* proton MR spectroscopy in differentiation of similar appearing intracranial cystic lesions. *Magn Reson Imaging* 19:103–110
37. Go KG (1997) The normal and pathological physiology of brain water. *Adv Tech Stand Neurosurg* 23:47–142
38. Bell JD, Brown JC, Nicholson JK, Sadler PJ (1987) Assignment of resonances for ‘acute-phase’ glycoproteins in high resolution proton NMR spectra of human blood plasma. *FEBS Lett* 215:311–315
39. Torri GM, Torri J, Gulian JM, Vion-Dury J, Viout P, Cozzone PJ (1999) Magnetic resonance spectroscopy of serum and acute-phase proteins revisited: a multiparametric statistical analysis of metabolite variations in inflammatory, infectious and miscellaneous diseases. *Clin Chim Acta* 279:77–96
40. Badcock G, Pigott C, Goepel J, Andrews P (1999) The human embryonal carcinoma marker antigen TRA-1–60 is a sialylated keratan sulfate proteoglycan. *Cancer Res* 59:4715–4719
41. Heaney-Kieras J, Bystry J-C (1986) Identification and purification of 115- and 125-Kilodalton cell surface human melanoma-associated antigens. *J Natl Cancer Inst* 77:643–648
42. Kuesel AC, Sutherland GR, Halliday W, Smith IC (1994) <sup>1</sup>H MRS of high grade astrocytomas: mobile lipid accumulation in necrotic tissue. *NMR Biomed* 7:149–155
43. Hanstock CC, Rothman DL, Howseman A, Lantos G, Novotny EJ, Petroff OAC, Prichard JW, Shulman RG (1989) *In vivo* determination of NAA concentration in the human brain using the proton aspartyl resonance. In: Book of abstracts: Society of Magnetic Resonance in Medicine, Berkeley, p 442
44. Gill SS, Thomas DGT, Van Bruggen N, Gadian DG, Peden CJ, Bell JD, Cox J, Menon DK, Iles RA, Bryant DJ, Coutts GA (1990) Proton MR spectroscopy of intracranial tumours: *in vivo* and *in vitro* studies. *J Comput Assist Tomogr* 4:497–504
45. Gadian DG, Bates TE, Williams SR, Bell JD, Austin SJ, Connelly A (1991) Approaches to editing, assignment and interpretation of proton spectra. *NMR Biomed* 4:85–89
46. Nadler JV, Cooper JR (1972) *N*-acetyl-L-aspartic acid content of human neural tumours and bovine peripheral nervous tissues. *J Neurochem* 19:313–319
47. Kinoshita Y, Kajiwara H, Yokota A, Koga Y (1994) Proton magnetic resonance spectroscopy of brain tumors: an *in vitro* study. *Neurosurgery* 35:606–614
48. Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A (2001) Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3352–3357
49. Hollingsworth MA, Swanson BJ (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 4:45–60

