

# ESTUDIO DE INFILTRACIÓN PERITUMORAL EN GLIOBLA

**Tipo:** Presentación Electrónica Científica

**Autores:** Ana Azahara García Ortega, Luis González Ramos, Guillermo Carbonell López Del Castillo

## Objetivos

### INTRODUCCIÓN

La infiltración peritumoral es característica de los tumores gliales de alto grado y se produce a través de 1  
Las bases moleculares y celulares de cooptación son actualmente desconocidas.

La microvasculatura cerebral normal está compuesta de capilares sanguíneos, que consisten en células en  
respuestas anti-inflamatorias a tumores malignos como el GBM, que incluye la inhibición de la función c  
Teniendo en cuenta que las células inmunes contribuyen a la progresión tumoral, los pericitos podrían de

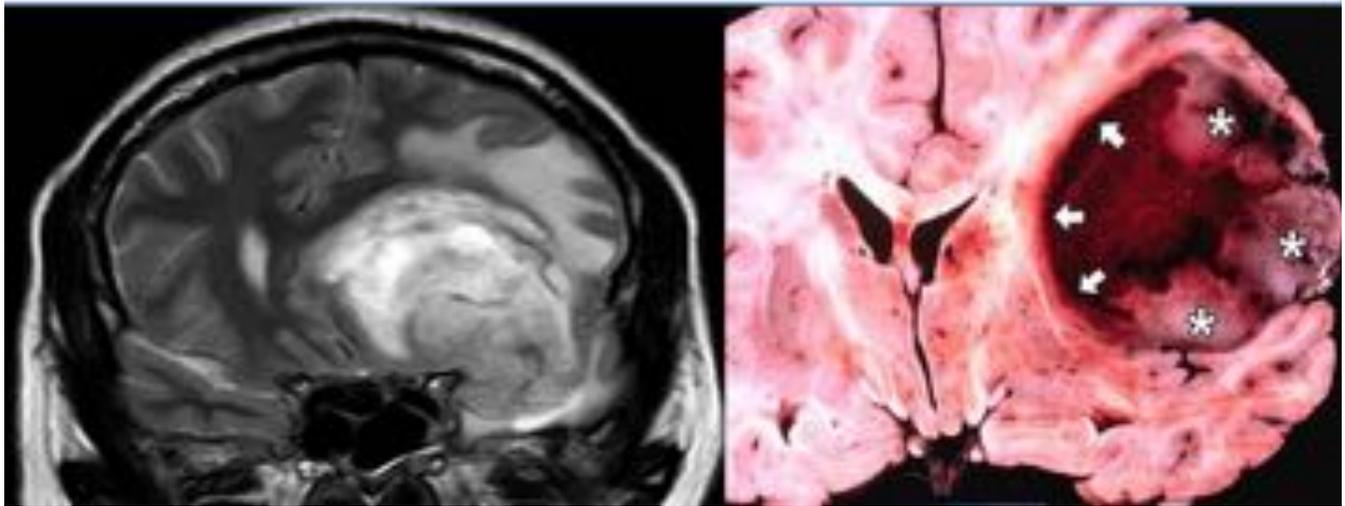
Recientemente se ha descubierto que las células madre del GBM pueden diferenciarse en pericitos tumor

En nuestro proyecto, hemos obtenido muestras de tejido peritumoral de GM en quirófano que previamen  
Las muestras de tejido se han utilizado para investigar los mecanismos celulares por los que la células de

### OBJETIVOS PREVISTOS:

1. Valorar la infiltración peritumoral de los tumores de alto grado mediante RM avanzada difusión (DWI)
2. Valorar la alteración en la microvasculatura cerebral peritumoral en relación con los **pericitos**, así cor
3. Buscar marcadores radiológicos reproducibles en la infiltración tumoral que puedan correlacionarse co

# INFILTRACIÓN PERITUMORAL EN GLIOBLASTOMAS MULTIFORMES, ESTUDIO DE LA ANGIOGENESIS TUMORAL MEDIANTE CORRELACION INMUNO-HISTO-RADIOLÓGICO



**Fig. 1:** HCUVA

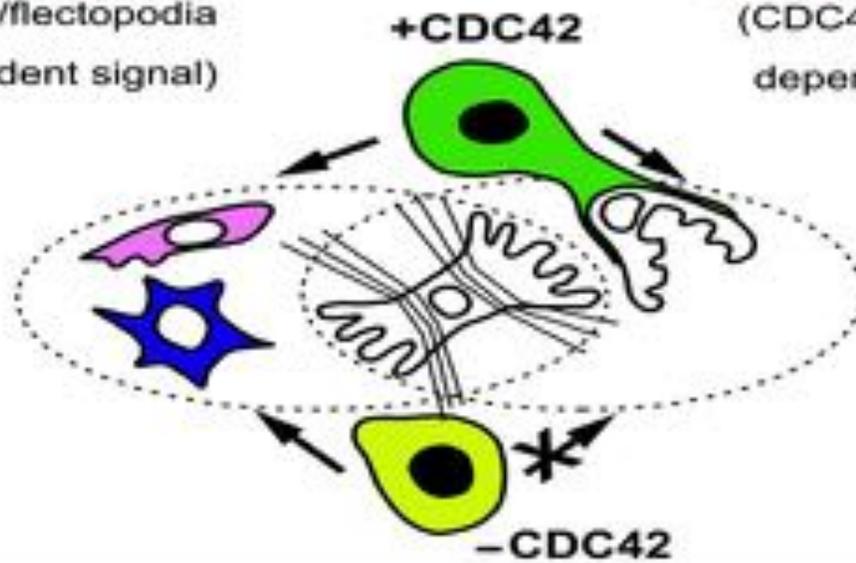
## Tumor cell co-option signals

### Signal 1

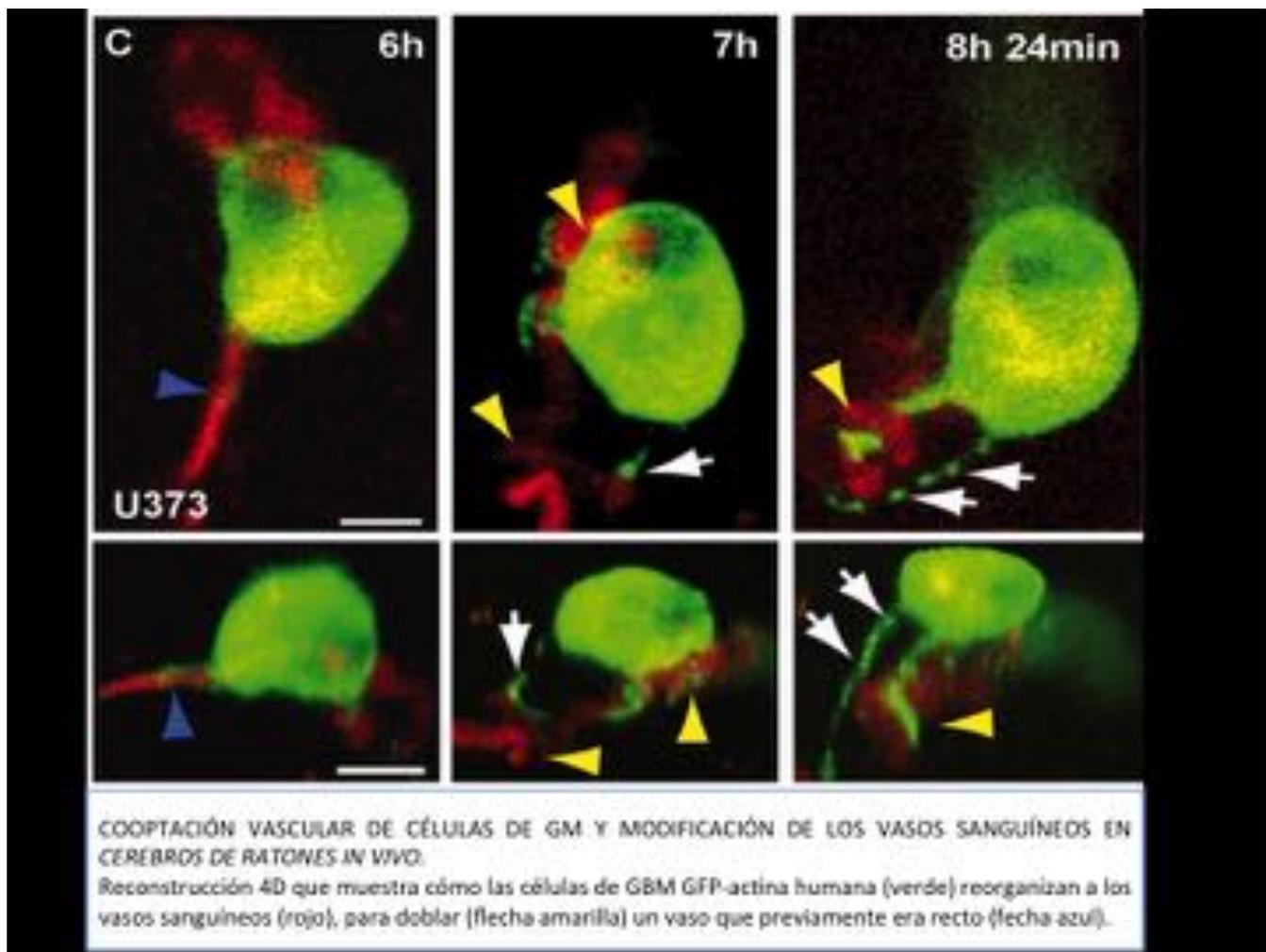
(CDC42/flectopodia independent signal)

### Signal 2

(CDC42/flectopodia dependent signal)



**Fig. 2:** Señales de cooptación en las células tumores. El modelo de doble señal explica la relación de las



**Fig. 24:** Cooptación vascular.

## Material y métodos

### Tipo de estudio

Estudio prospectivo que incluyó a 32 pacientes con diagnóstico radiológico compatible con GM evaluado. De los 32 pacientes, 30 de ellos fueron confirmados histológicamente como GM (grado IV de la OMS) y en 2 casos el diagnóstico radiológico fue no concluyente: linfoma, infarto cerebral subagudo.

### Criterios de inclusión

- Que el paciente no tomara corticoides previo a la realización del estudio de RM.
- Pacientes mayores de 11 años con diagnóstico radiológico compatible con glioblastoma multiforme.
- Pacientes que fueran a ser operados por el Servicio de Neurocirugía del HCUVA.
- Que la zona marcada radiológicamente fuera accesible para el neurocirujano y no supusiera un riesgo.
- Que se dispusiera del consentimiento informado de depósito de muestras de laboratorio de nuestro

### Criterios de exclusión:

- Que el paciente no fuera candidato a cirugía, bien por su estado basal o porque el tumor no fuese accesible quirúrgicamente o supusiese a
- Que la zona de interés marcada radiológicamente no fuese accesible quirúrgicamente o supusiese a
- Que el paciente, testigo o tutor responsable se negase a participar en el estudio.
- Revocación del consentimiento.

## **PROYECTO GLIO**

Mediante técnicas de RM avanzada se seleccionó la zona peritumoral con mayor infiltración radiológica.

### **RECOGIDA DE DATOS:**

#### **EVALUACIÓN DE LAS IMÁGENES DE RM**

Las imágenes se obtuvieron con una resonancia magnética (RM) de 1.5T (*New Intera Nova*, Philips Med **RM CEREBRAL CONVENCIONAL**). La RM cerebral incluyó las siguientes secuencias sagital T1, axial T1 y T2. En la RM convencional se analizaron los siguientes hallazgos (Figura 5).

- Localización (derecho/izquierdo, lóbulos: frontal, parietal, temporal u occipital)
- Edema
- Efecto masa
- Homogenicidad/heterogeneidad en secuencias T2
- Necrosis/quistes en su interior
- Bordes definidos en secuencia T1 con contraste iv
- Tamaño (diámetro máximo del tumor en los tres planos del espacio: axial, coronal y antero-posterior)
- Patrón infiltrativo
- Realce con contraste iv
- Áreas de vacío de señal en secuencias T2.

### **TÉCNICAS DE RM AVANZADA**

(Figuras 6 y 7)

Las diferentes técnicas de RM avanzada (difusión, perfusión, tractografía y espectroscopia multivoxel) se analizaron de la siguiente manera:

- Área Tumoral: porción sólida bien definida, con captación uniforme de contraste y alta señal en secuencias T1 con contraste iv
- Área peritumoral: región claramente delimitada de la porción sólida bien definida, sin captación de contraste iv
- Sustancia blanca contralateral. Área que no presenta realce, ni hiperseñal en secuencias T2, FLAIR

#### **1) DIFUSIÓN (DWI)**

(Figura 8)

Las imágenes en difusión se obtuvieron con secuencias axiales multicorte SE/EPI (TE= 101.3 milisegundos). Las imágenes de difusión fueron adquiridas usando valores  $b$  de 1000 y 2500  $\text{seg}/\text{mm}^2$ . Los valores de  $b$  se seleccionó un ROI de 10-15  $\text{mm}^2$  con menor valor en los mapas de ADC de la región tumoral, peritumoral y en sustancia blanca contralateral. Los valores relativos ADCr se hallaron comparando los valores con las medidas obtenidas en la sustancia blanca contralateral.

#### **2) TENSOR DE LA DIFUSIÓN (DTI)**

(Figura 9)

La imagen de la tractografía se fusionó con el 3DT1 con contraste IV y se obtuvieron valores de las regiones de interés. Se tomó el valor más bajo de FA tumoral, peritumoral y en sustancia blanca contralateral y se midió los valores relativos FAcr.

#### **3) ESPECTROSCOPIA MULTIVOXEL**

(Figuras 10, 11, 12, 13)

Se realizaron secuencias de RM protón espectroscopía multivoxel (TR = 1000 ms; TE = 35 ms y 144 ms).

La calidad del espectro fue evaluada mediante inspección visual y los que fueron considerados de mala calidad.

Para cada metabolito se seleccionó el VOI que más nos interesó estudiar:

#### ESPECTRO LARGO, MULTI 144

- CHO (3.2 ppm) tumoral. Se selecciona el VOI con mayor cociente CHO/CR tm, evitando zonas necróticas.
- NAA (2.02 ppm) tumoral. VOI con menor valor NAA/CR tm.
- CR tumoral. Es el metabolito más estable por lo que se seleccionó la media de tres VOIS escogidos.
- CHO(3.2 ppm) peritumoral. VOI con mayor valor del cociente CHO/CR peritm.
- NAA (2.02 ppm) peritumoral. VOI con menor valor del cociente NAA/CR peritm.
- CR peritumoral.
- CHO(3.2 ppm) sustancia blanca contralateral. Para todos los valores de sustancia blanca contralateral.
- NAA(2.02 ppm) sustancia blanca contralateral.
- CR sustancia blanca contralateral.

Se calcularon los cocientes:

Naa/Cr tumoral, peritumoral y sb contralateral

Cho/Cr tumoral, peritumoral y sb contralateral

Naa/Cho tumoral, peritumoral y sb contralateral

#### ESPECTRO CORTO, MULTI 35

- Mioinositol tumoral. VOI de menor valor absoluto de MIO.
- Lípido 1.3 ppm tumoral. VOI de mayor valor absoluto de lip 1.3ppm
- Lípido 0.9ppm tumoral. VOI de mayor valor absoluto de lip 0.9ppm.
- Lactato 1.33 ppm tumoral. VOI de mayor valor absoluto de lac 1.33ppm.
- Mio peritumoral. VOI de menor valor absoluto de mio
- Lípido 0.9ppm tumoral. VOI de mayor valor.
- Lípido 0.9ppm peritumoral. VOI de mayor valor.
- Lactato peritumoral. VOI de mayor valor.
- Mioinositol sustancia blanca contralateral (sbcl). Para todos los valores de sustancia blanca contralateral.
- Lípido 1.3 ppm sbcl.
- Lípido 0.9ppm sbcl.
- Lactato sbcl.

Se calculó el área bajo la curva de cada metabolito y los índices Cho/Cr, Naa/Cr, Mi/Cr, Lac/Cr y Líp/Cr. Todos los valores se calcularon respecto a la creatinina, que es el metabolito más estable.

#### **4. PERFUSIÓN**

(Figuras 14 y 15)

Para obtener las secuencias de perfusión se adquirieron imágenes dinámicas T2W EPI (T2-weighted gradient echo). Las regiones de interés fueron estudiadas con la colocación manual de ROIs en un área de 10-15 mm<sup>2</sup>, en un plano axial. Se tuvo especial cuidado para no incluir vasos peritumorales o intratumorales, así como zonas necróticas.

Con el análisis de las cuatro técnicas de RM avanzada, se seleccionó la zona de mayor infiltración peritumoral. En el momento del acto quirúrgico, el radiólogo acudía al quirófano para mostrárselo al neurocirujano. En el quirófano se introdujo la muestra en formaldehído y se trasladó al laboratorio para iniciar su procesamiento.

## **PROCESADO DEL TEJIDO.**

Se procesaron muestras obtenidas durante la intervención quirúrgica, donadas y registradas en el laboratorio.

## **OBTENCIÓN DE SECCIONES HISTOLÓGICAS**

Las muestras de tejido dirigidas al procesamiento histológico se incluyeron en bloques de parafina. De cada bloque se realizaron secciones de 5 µm de espesor.

## **Inmunofluorescencia.**

Todas las diluciones preparadas de anticuerpo primario, secundario y estreptavidina-fluoróforo que se de

### **A. BLOQUEO:**

Tras la desparafinación en alcoholes descendentes (100-96-80-70%) se realizaron tres lavados con PBS 1x. Se bloquearon las uniones no específicas a la vez que se permeabilizó el tejido mediante una incubación con PBS 1x con peroxidasa de ratón.

### **B. ANTICUERPOS PRIMARIOS:**

Se han utilizado anticuerpos específicos para identificar los diferentes tipos celulares de interés:

- AntiNG2, para identificar pericitos
- AntiGFAP, para identificar células tumorales y astrocitos.
- AntiCD68, para identificar los macrófagos y microglía.
- AntiCD44, para identificar receptores de ácido hialurónico en la célula tumoral y el pericito.
- AntiCdc42, en la célula tumoral y el pericito.

Los portaobjetos con las secciones se incubaron durante toda la noche con estos anticuerpos primarios en PBS 1x.

### **C. ANTICUERPOS SECUNDARIOS:**

Al día siguiente se eliminó el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados de 10 minutos en PBS 1x con peroxidasa de ratón.

- **Fluorescencia verde:** se utilizó burro anti-ratón IgG o anti-conejo IgG (según el primario) conjugado con fluoresceína.

- **Fluorescencia roja:** se utilizó burro anti-ratón IgG, anti-conejo IgG, anti-cabra IgG, anti-rata IgG (según el primario) conjugado con rodamina.

- **Fluorescencia roja lejana:** los anticuerpos secundarios biotinilados se revelaron tras una incubación con estreptavidina-fluoróforo.

- **Fluorescencia azul:** los anticuerpos biotinilados se revelaron tras una incubación con estreptavidina-fluoróforo.

### **D. MARCAJE NUCLEAR Y MONTAJE:**

Finalizada la última incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 1x. En todos los casos se utilizó DAPI para el marcaje nuclear.

### **E. CONTROLES:**

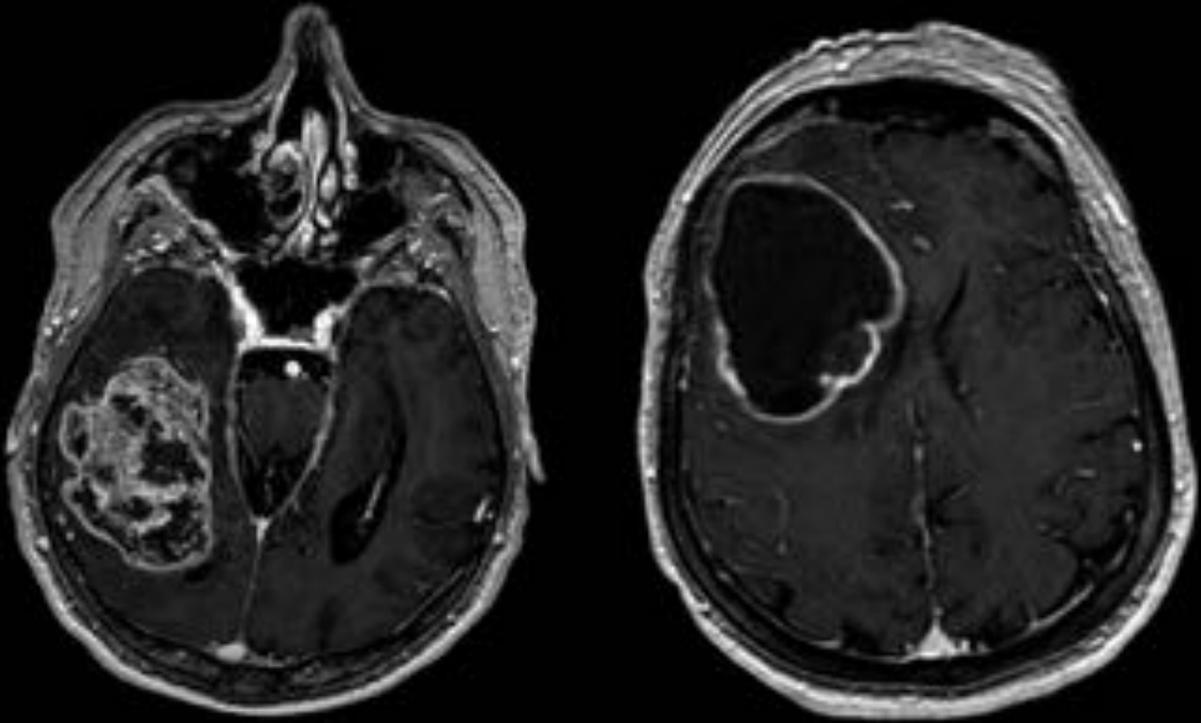
En todos los casos se realizaron controles en dos portaobjetos para cada marcaje siguiendo el mismo procedimiento.

Imágenes en esta sección:



Fig. 3: HCUVA

**T1 con contraste (Gadolinio iv).** El realce es variable pero siempre está presente. Típicamente es periférico e irregular



**Fig. 4:** HCUVA

## DATOS MORFOLÓGICOS

- ◆ Localización
- ◆ Homogeneidad/heterogeneidad en secuencias T2
- ◆ Necrosis/quistes en su interior
- ◆ Bordes definidos
- ◆ Tamaño
- ◆ Áreas de vacío de señal en secuencias T2.

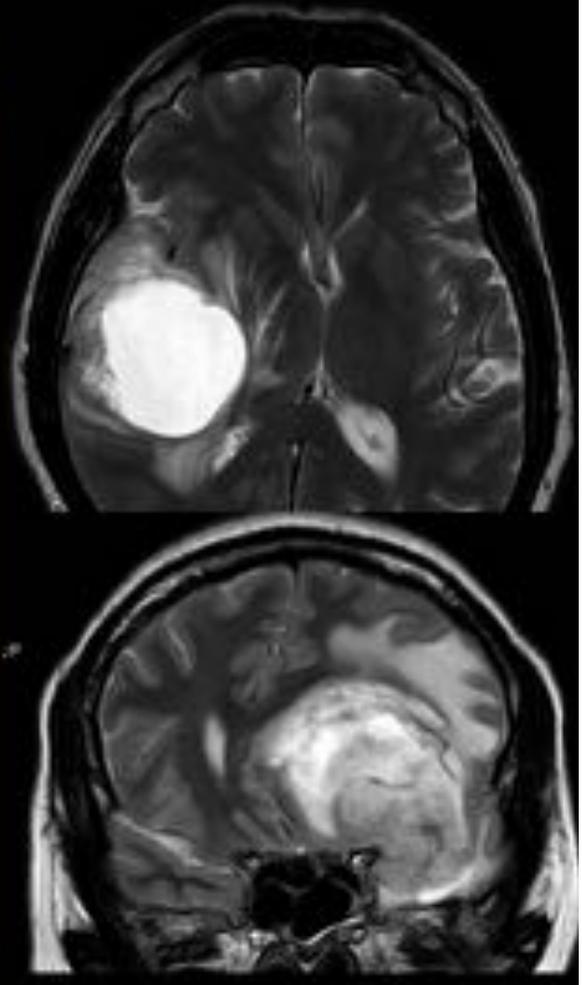


Fig. 5: HCUVA

## TÉCNICAS DE RM AVANZADA

◆ **Área Tumoral:** porción sólida bien definida, con captación uniforme de contraste y alta señal en secuencias T2 y FLAIR.

◆ **Área peritumoral:** región claramente delimitada de la porción sólida bien definida, sin captación de contraste y con hipers señal en secuencias T2, FLAIR y DWI.

◆ **Sustancia blanca contralateral.**

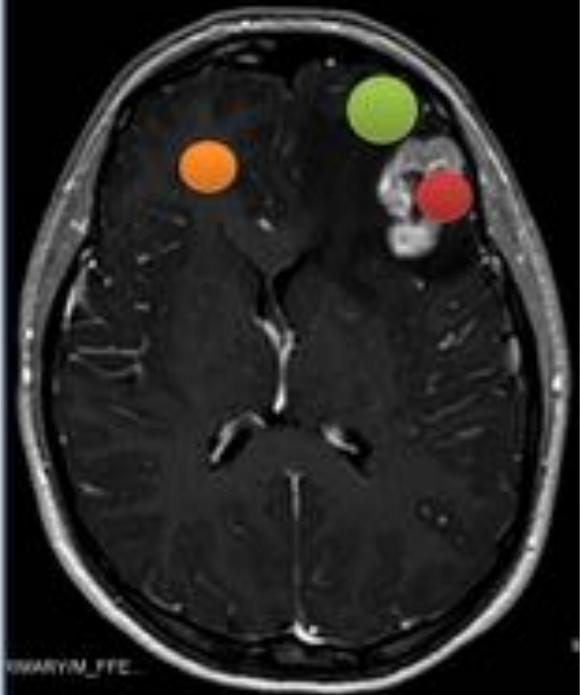
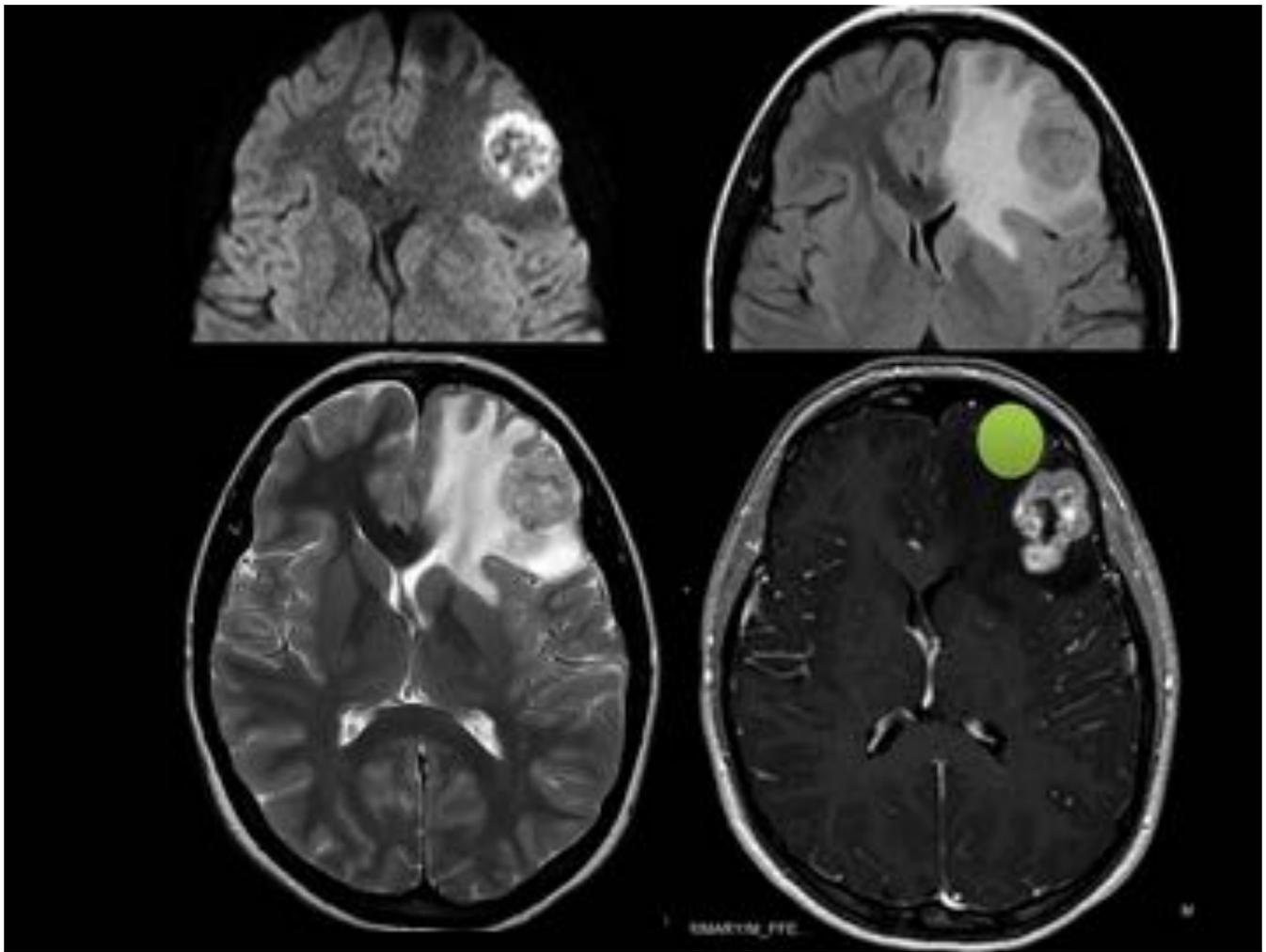


Fig. 6: HCUVA



**Fig. 7:** Area peritumoral. Región delimitada de la porción sólida bien definida, sin captación de contraste

## DIFUSIÓN DWI

- ◆ Valores  $b$  1000 y 2500  $\text{seg}/\text{mm}^2$  expresados como  $10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$

ADC tumoral (t)

ADC peritumoral (ADC p)

ADC sustancia blanca clat (n)

- ◆ Los valores relativos ADCr ( $\text{ADCt}/\text{ADCn}$ ,  $\text{ADCp}/\text{ADCn}$ ).

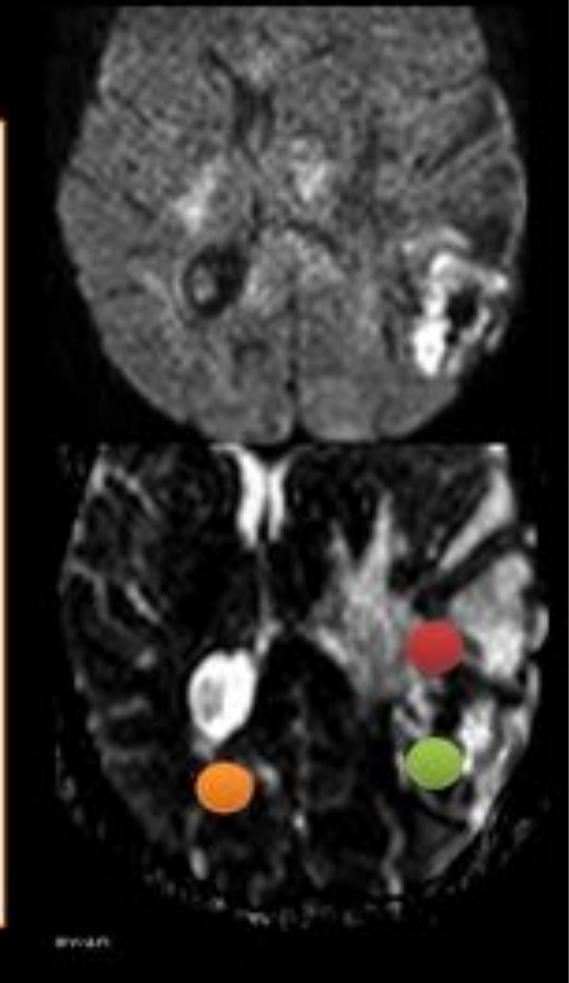


Fig. 8: HCUVA

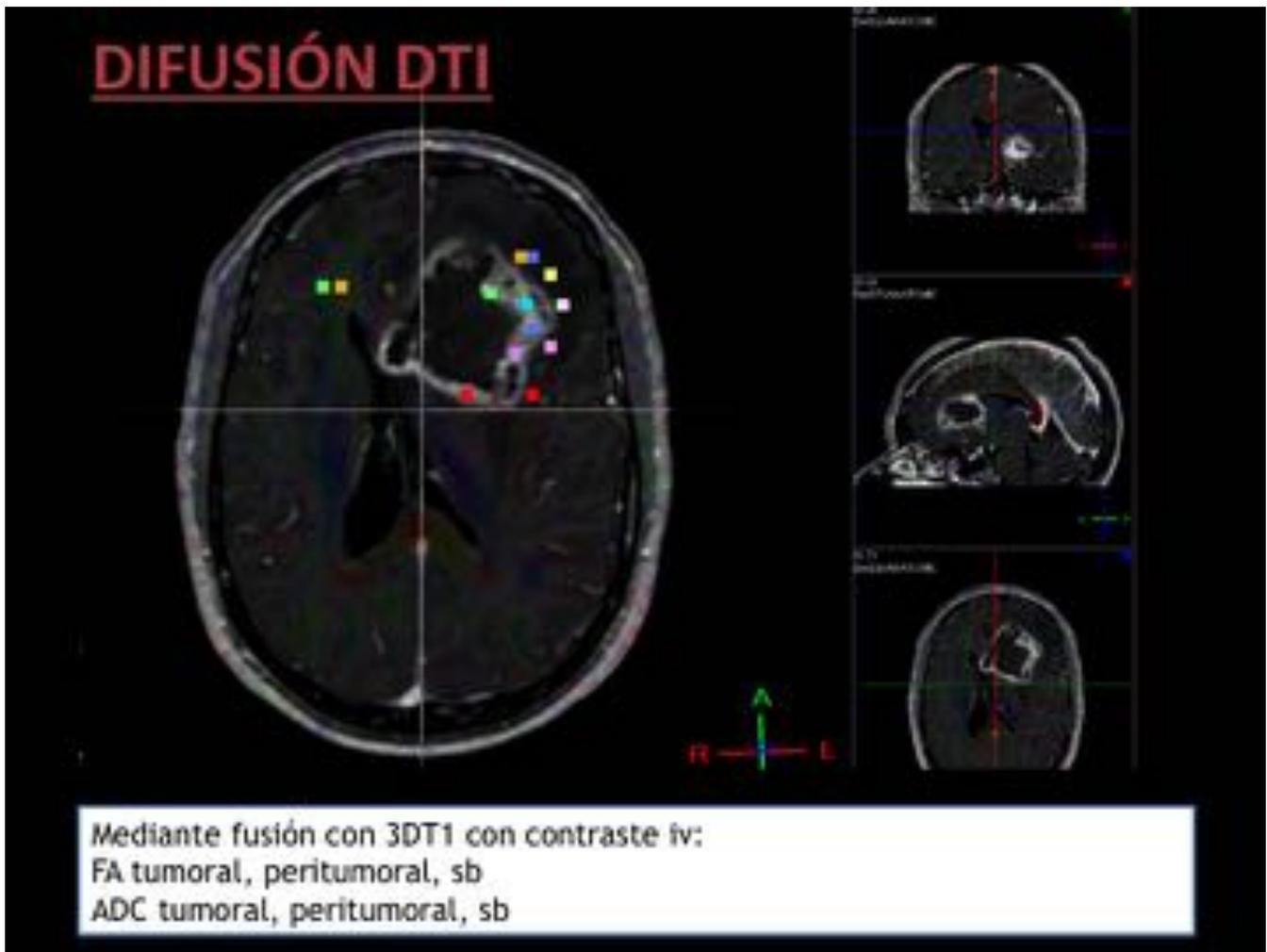


Fig. 9: HCUVA

# PERFUSIÓN

- El valor máximo de VSC fue obtenido mediante la identificación de las regiones de máxima perfusión en los mapas de color.

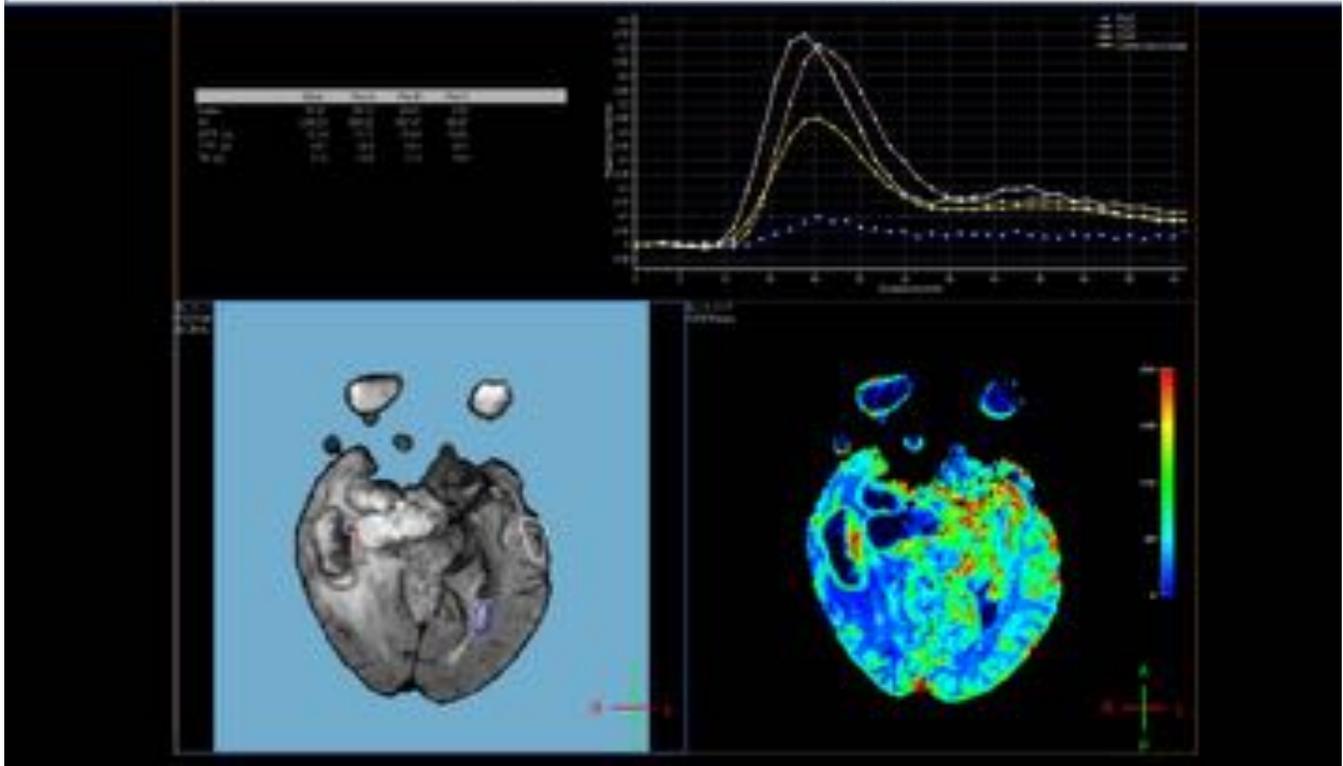
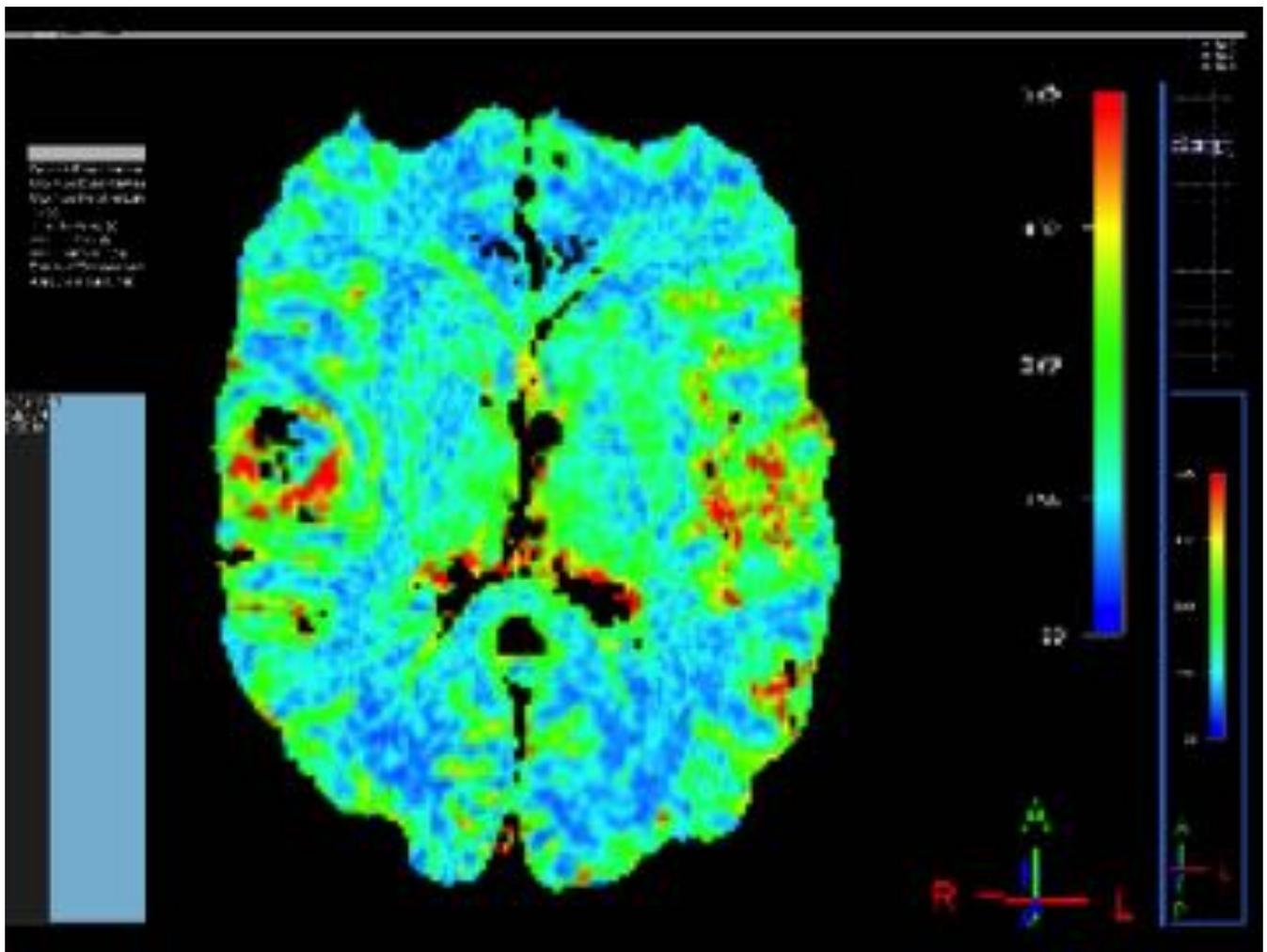
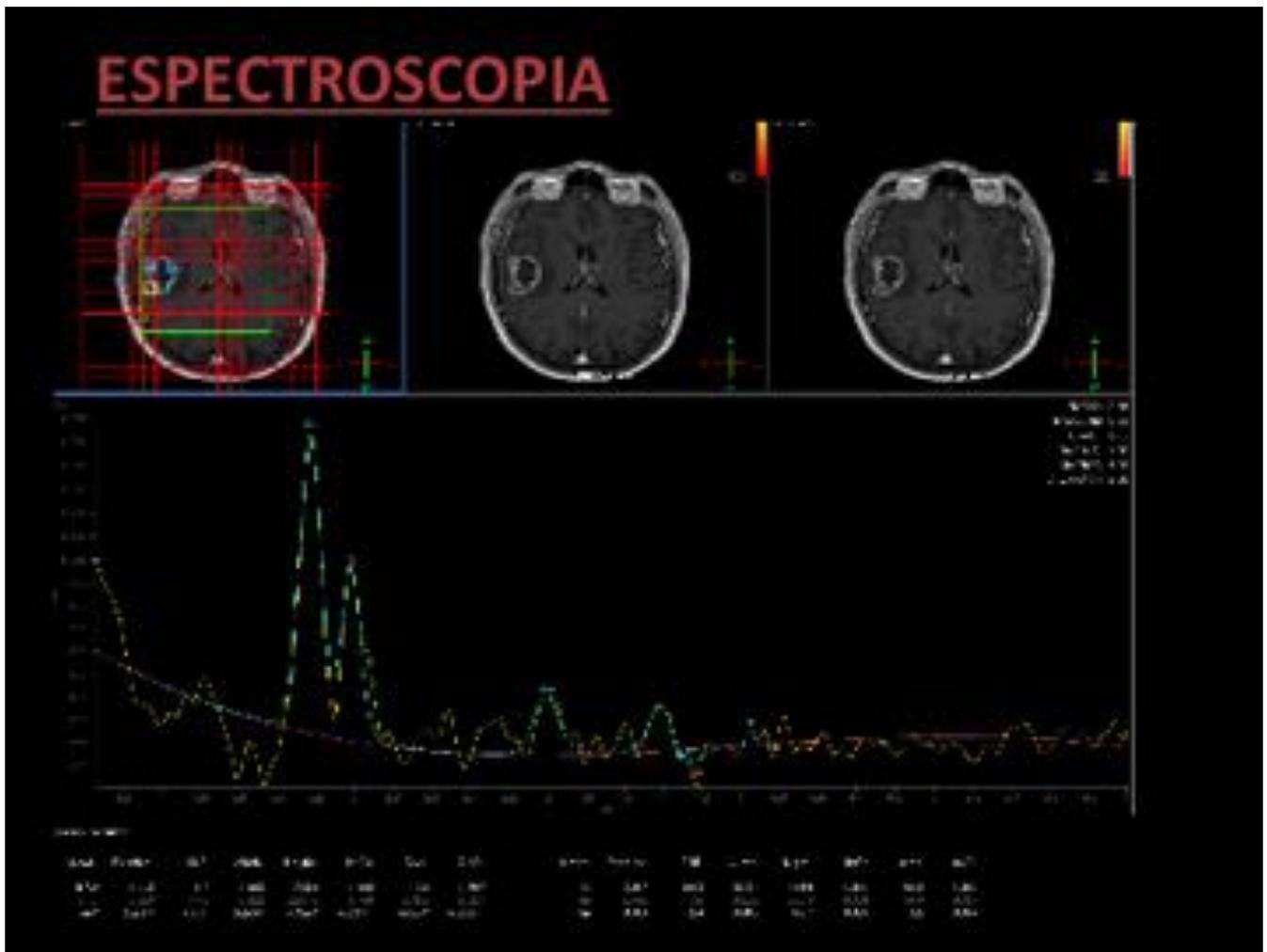


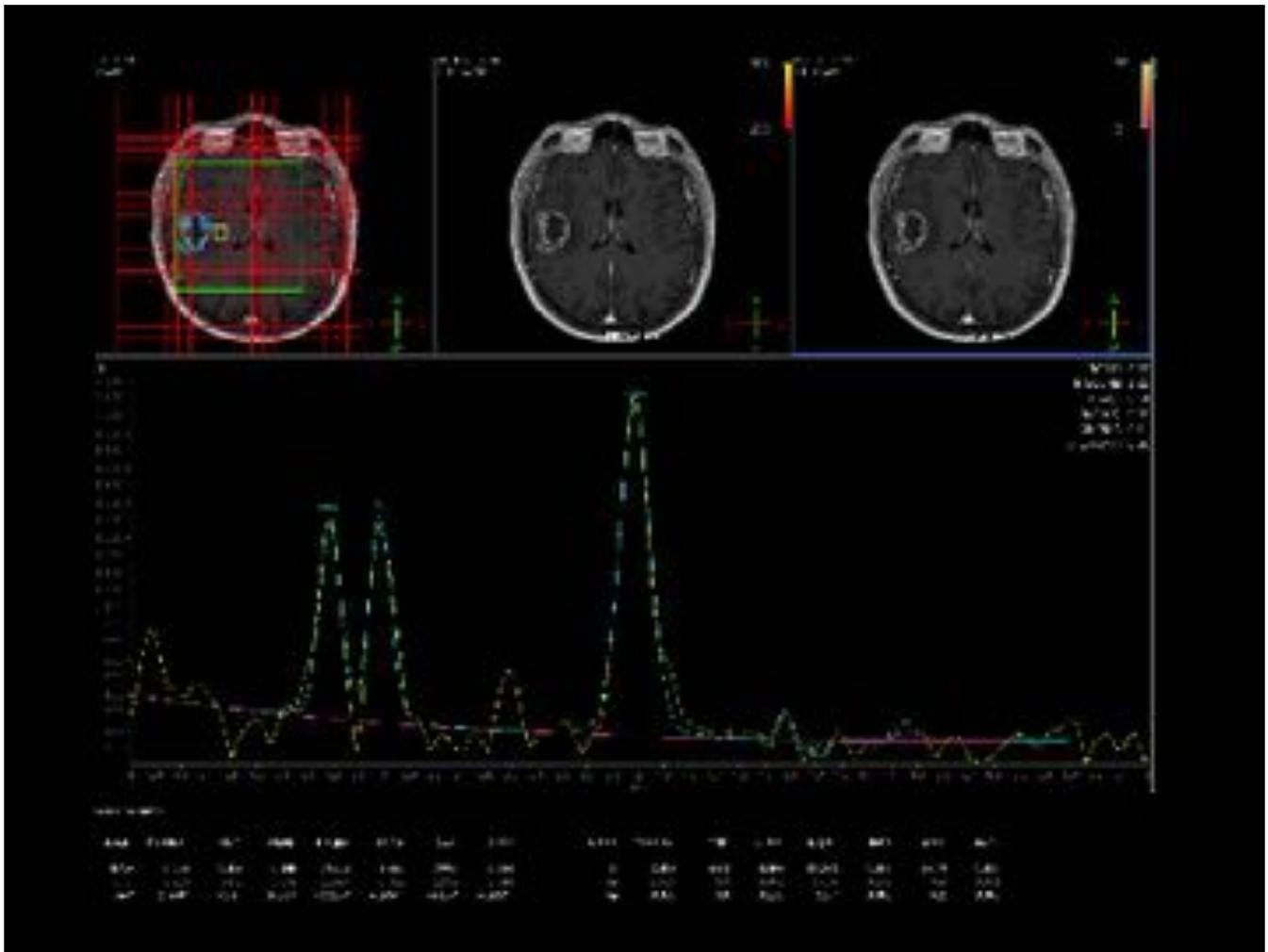
Fig. 10: HCUVA



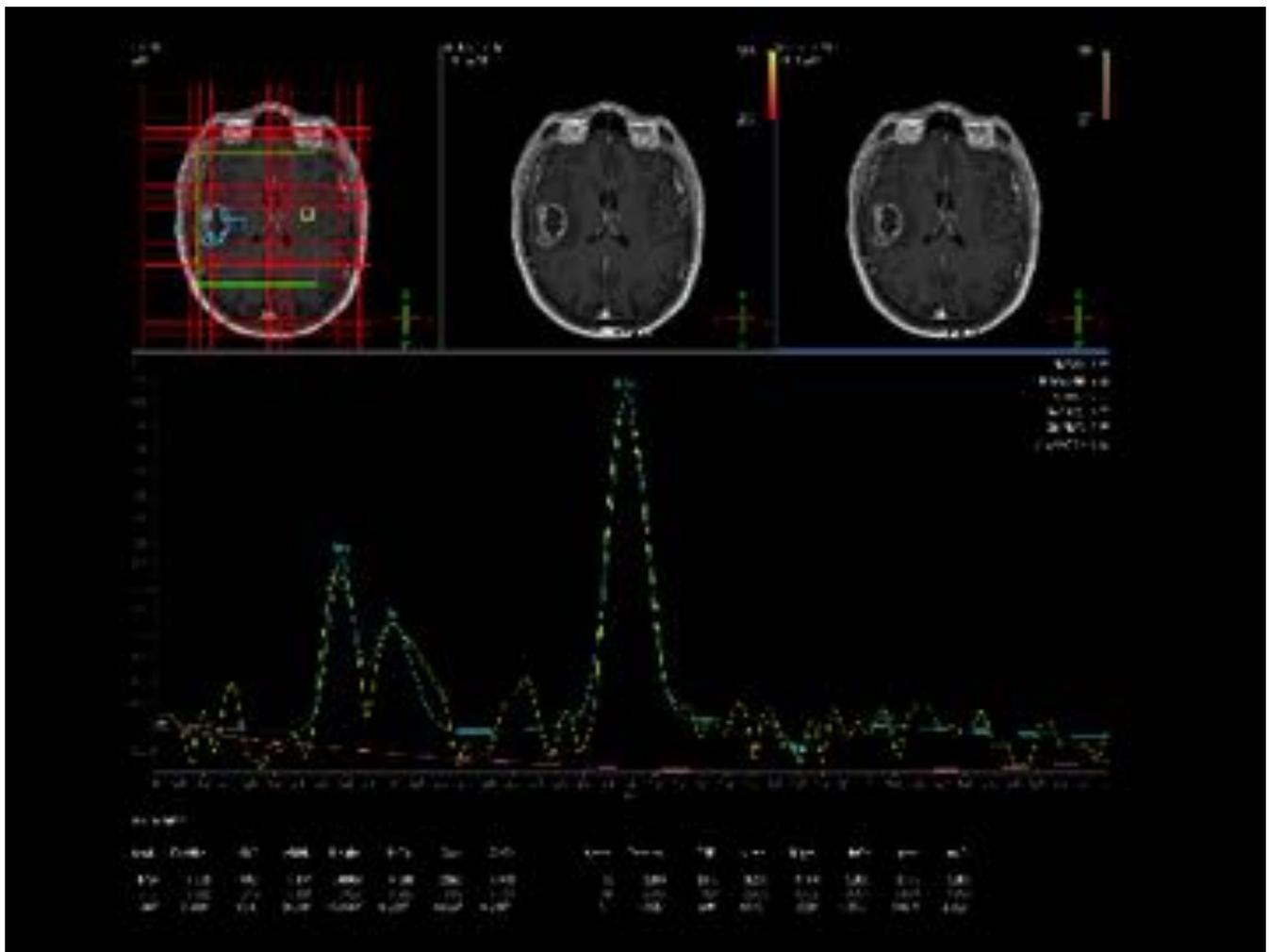
**Fig. 11:** HCUVA



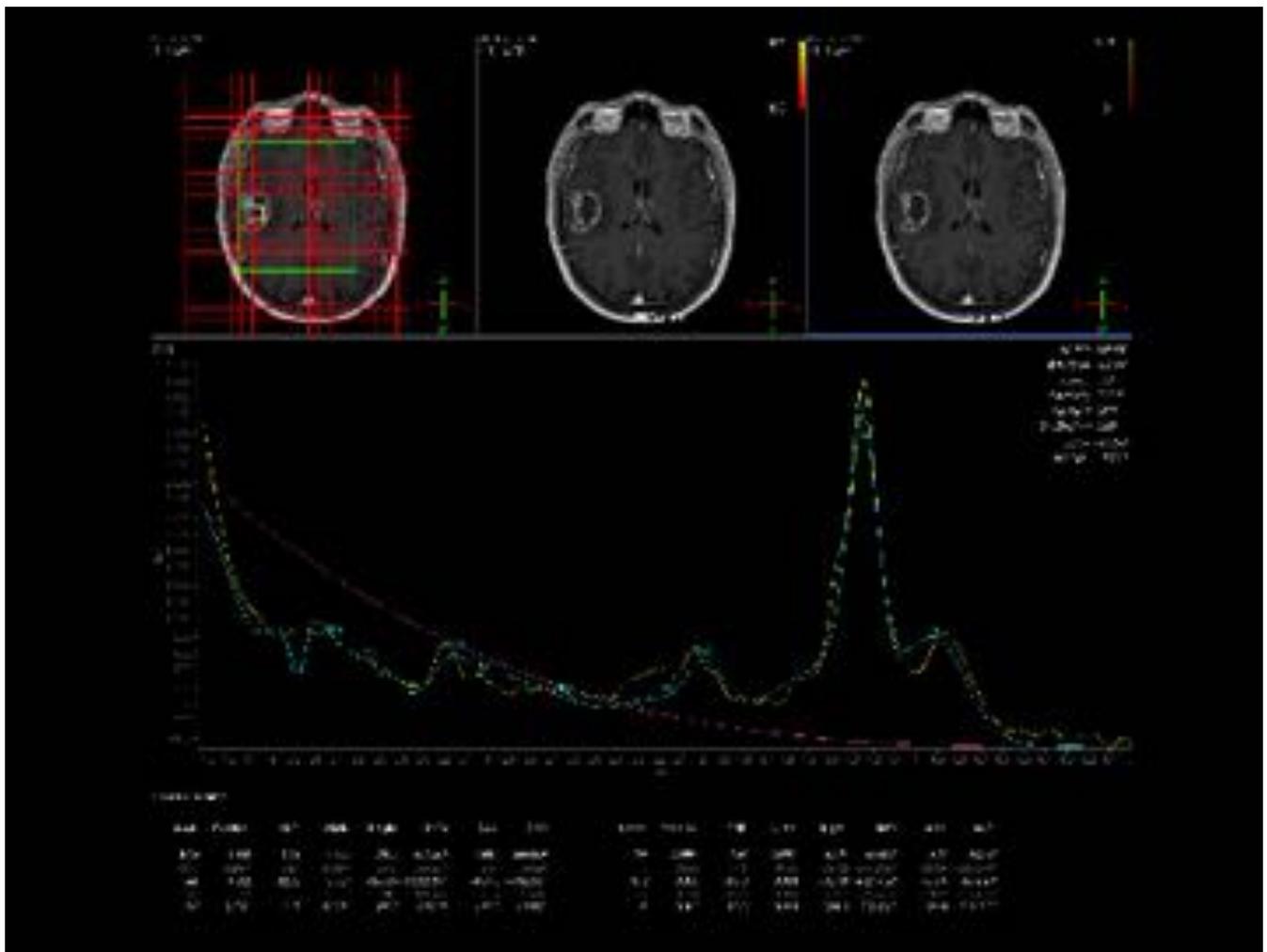
**Fig. 12:** Ejemplo de espectroscopia multivoxel del área tumoral.



**Fig. 13:** Ejemplo de espectroscopia multivoxel del área peritumoral.



**Fig. 14:** Ejemplo de espectroscopia multivoxel de la sustancia blanca contralateral.



**Fig. 15:** Pico de lípidos y lactato típico del área tumoral del GM.

◆ Con el análisis de las cuatro técnicas de RM avanzada, se seleccionó **la zona de mayor infiltración peritumoral** (desde el punto de vista radiológico) y se grabó la imagen en la historia clínica del paciente.

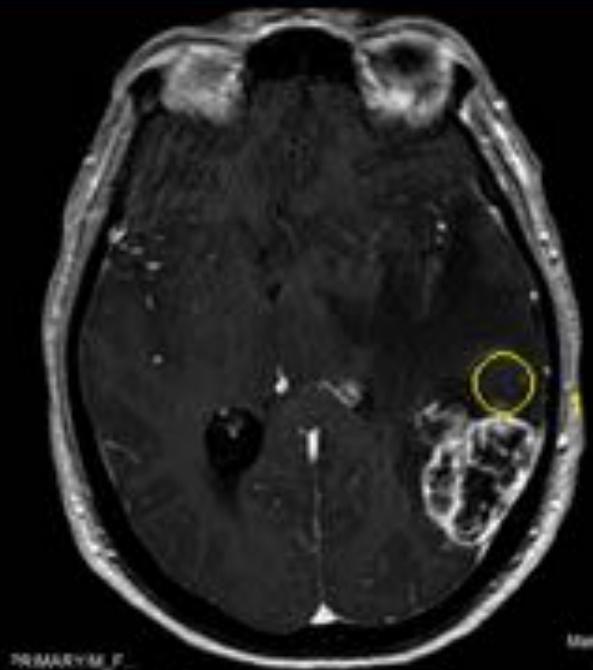


Fig. 16: HCUVA

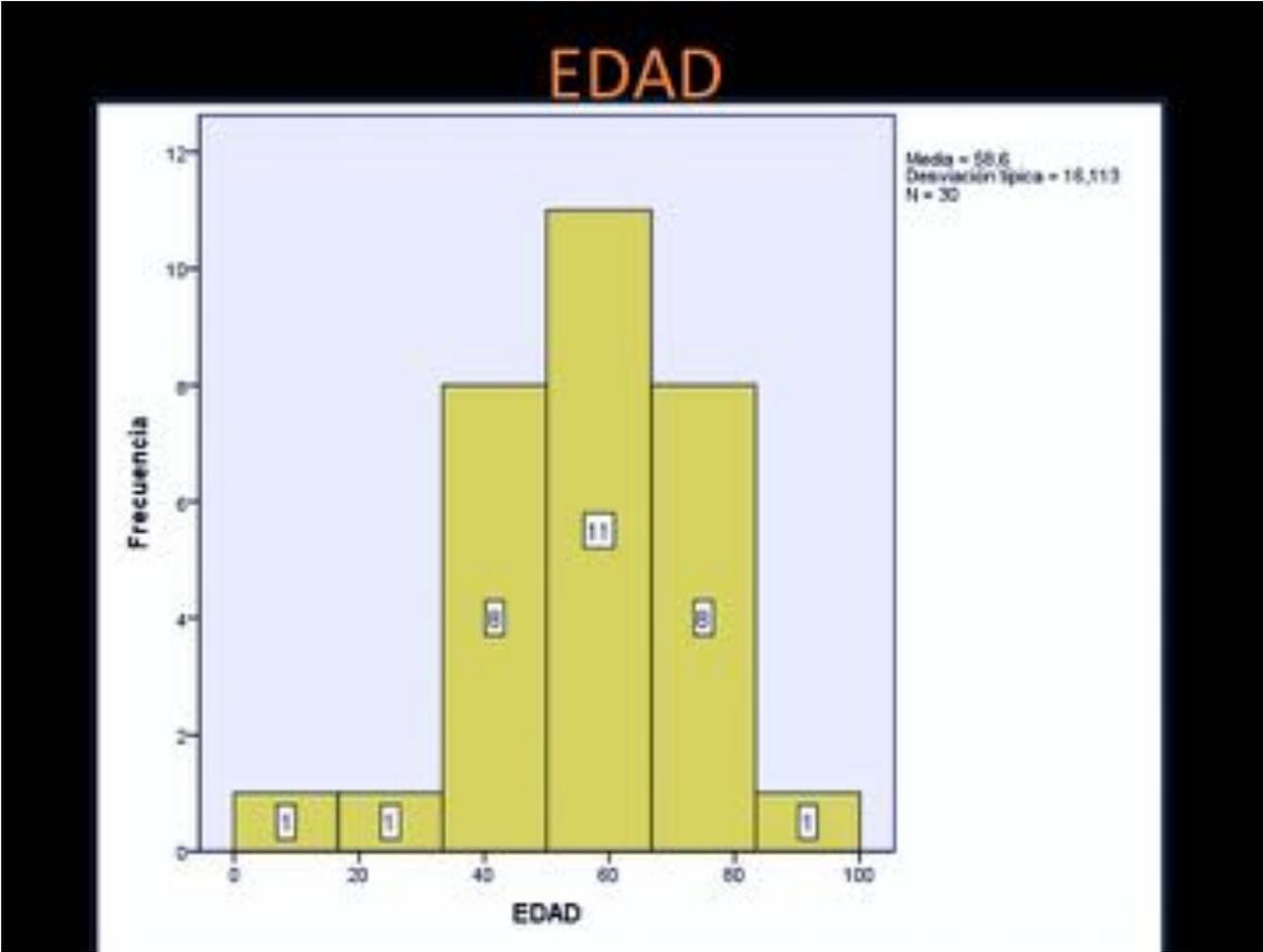


Fig. 17: HCUVA

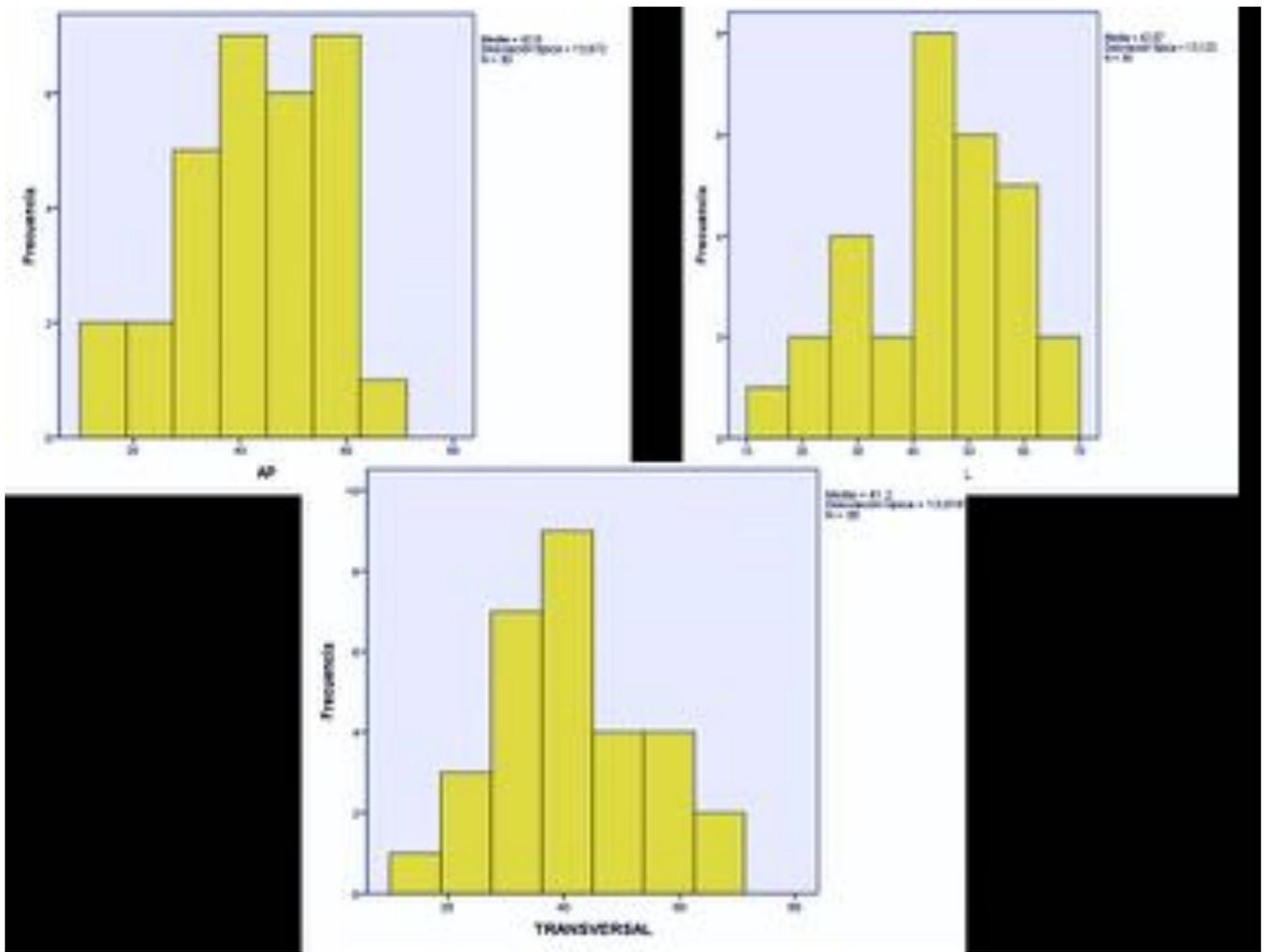


Fig. 18: HCUVA

## DATOS RM CONVENCIONAL

### LOCALIZACIÓN

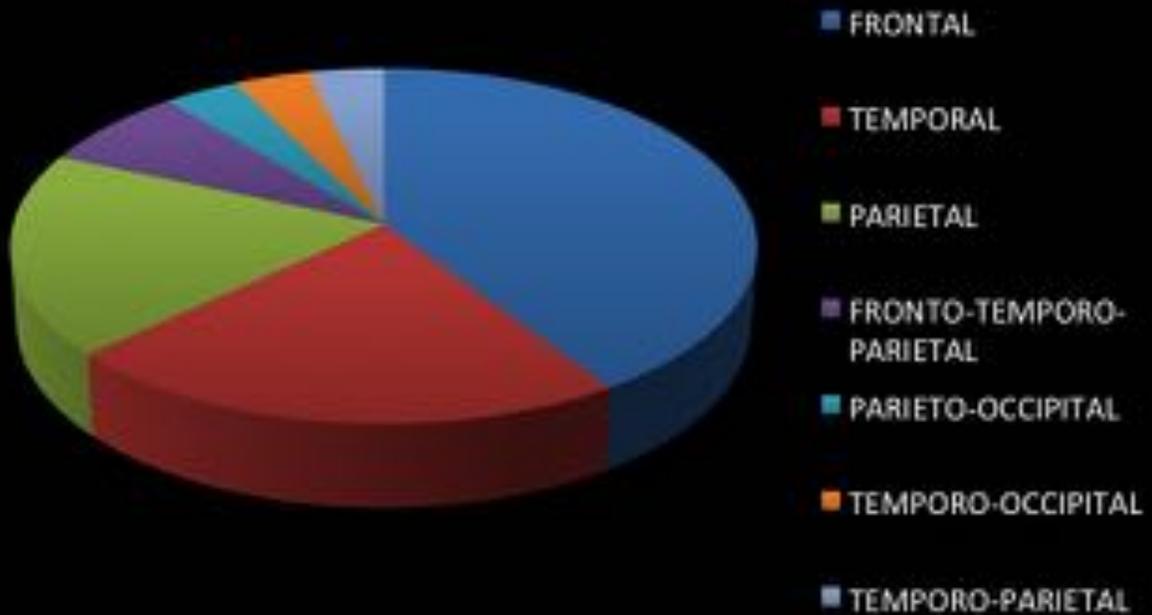


Fig. 19: HCUVA

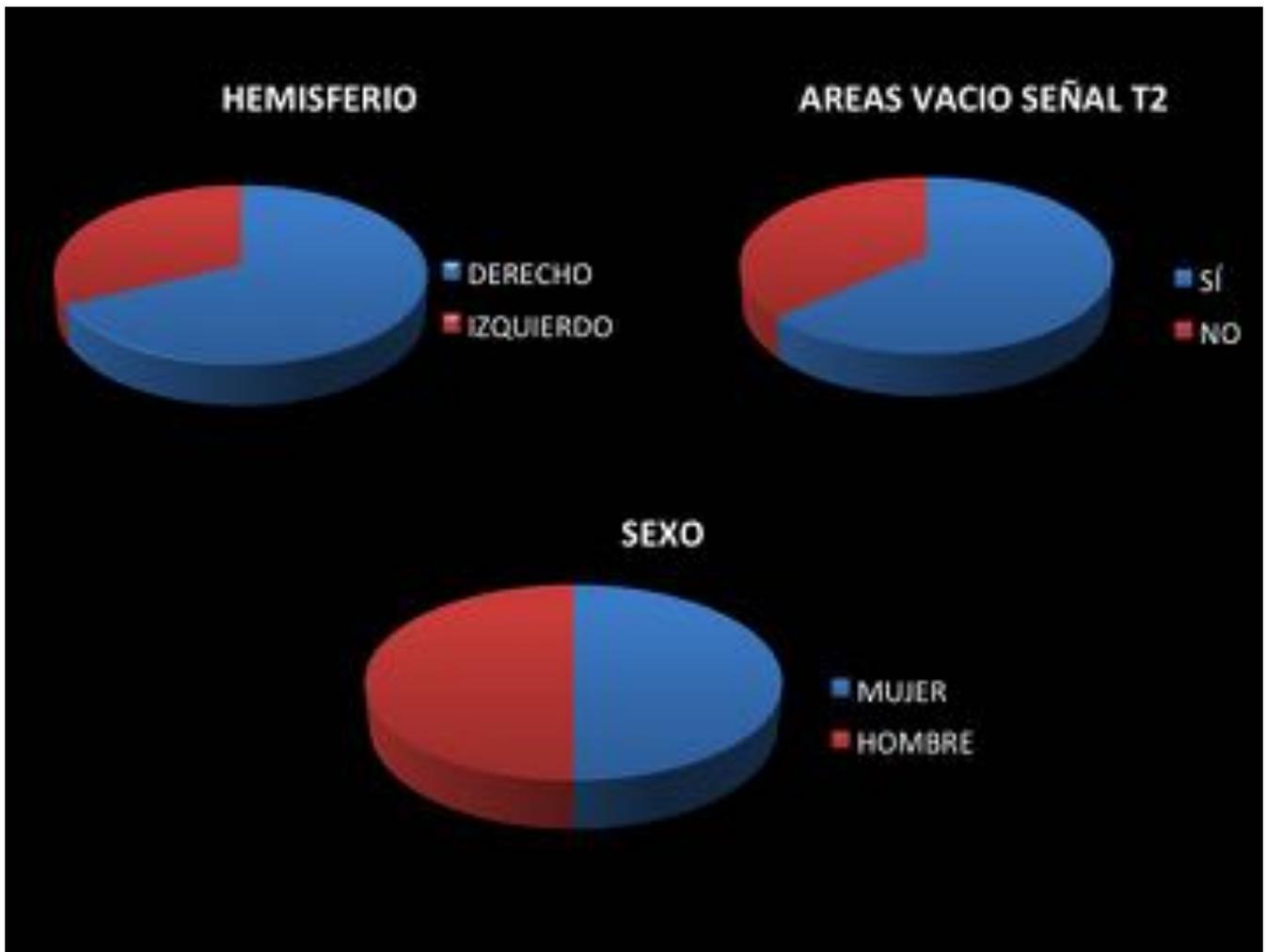


Fig. 20: HCUVA

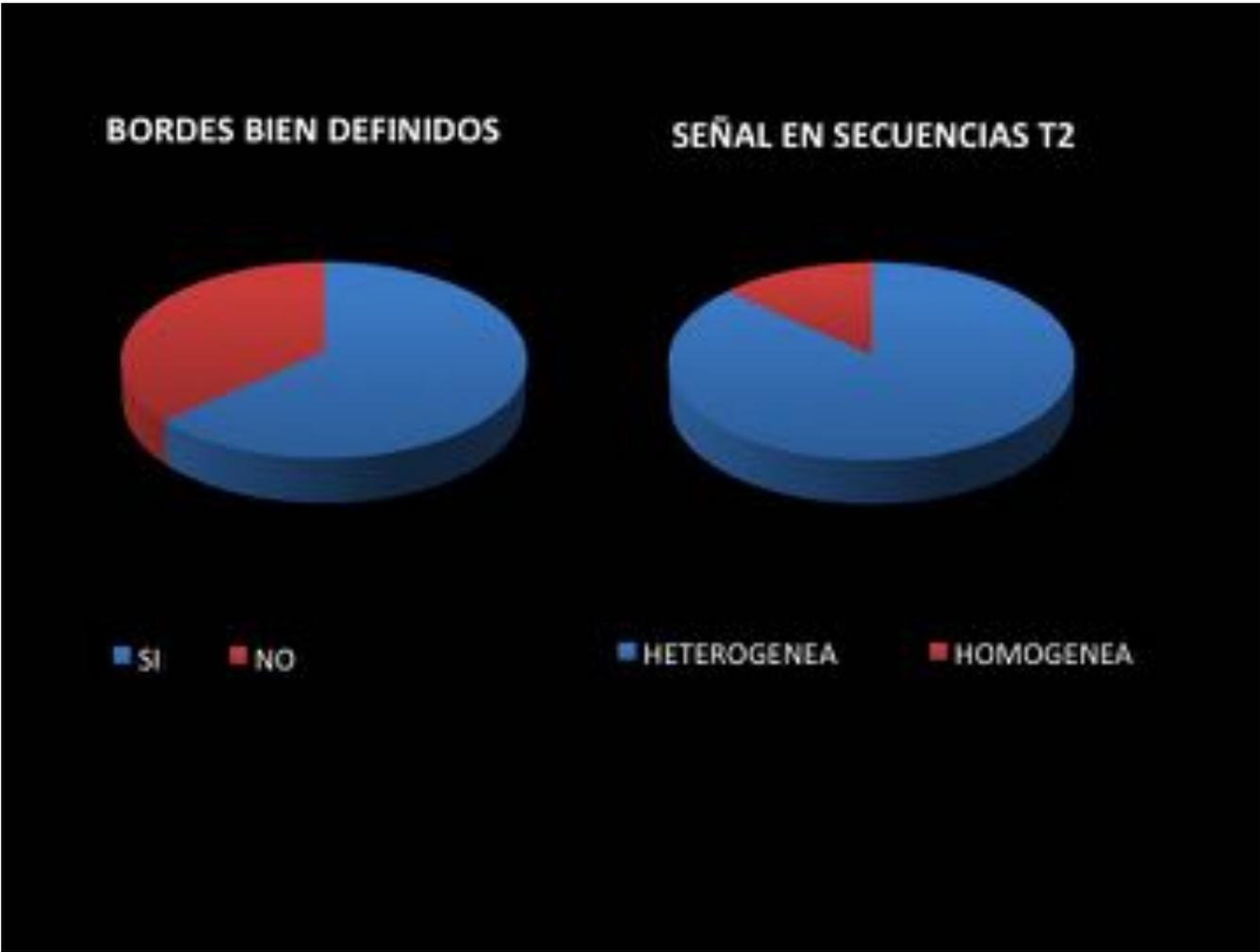
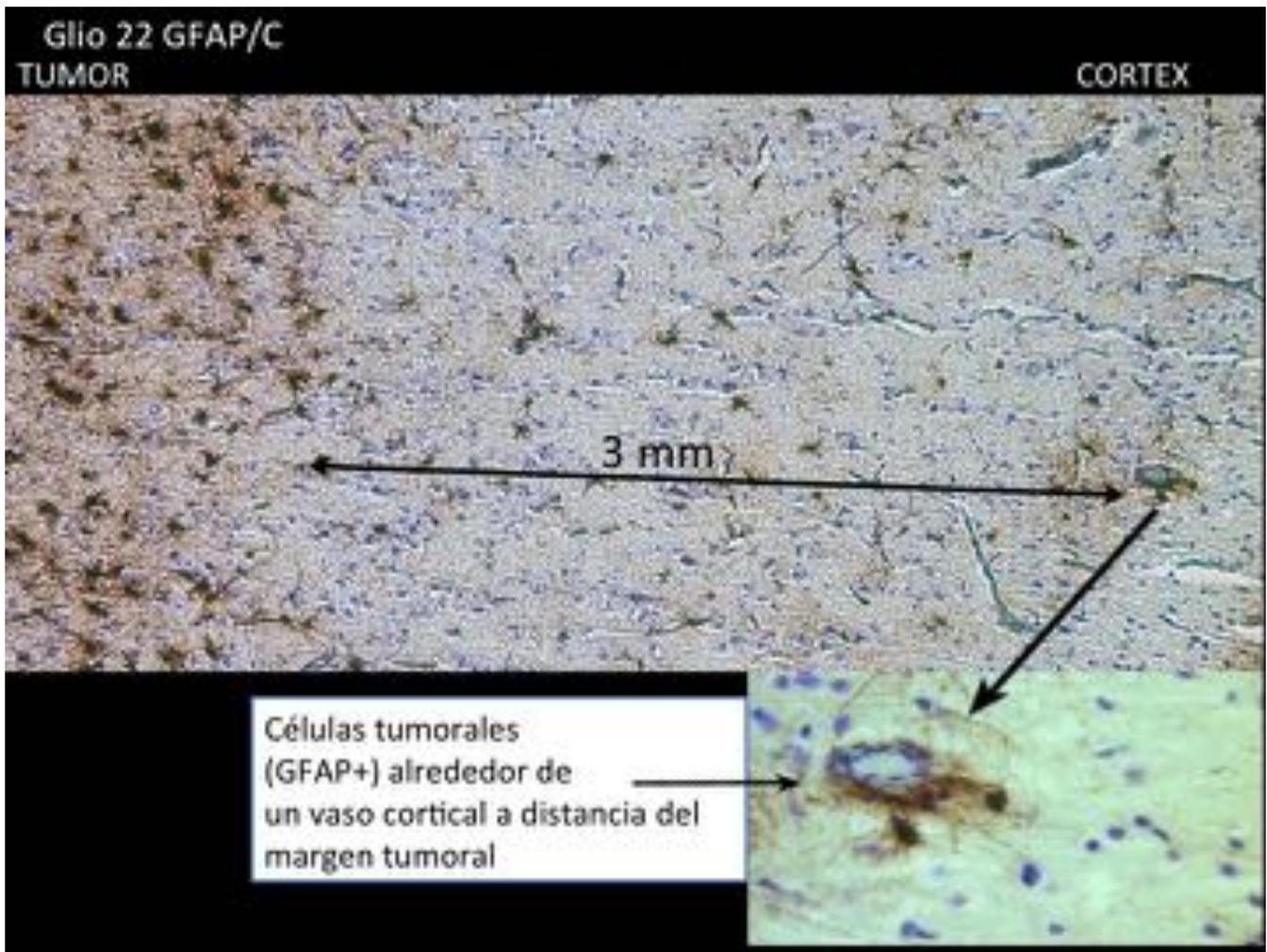
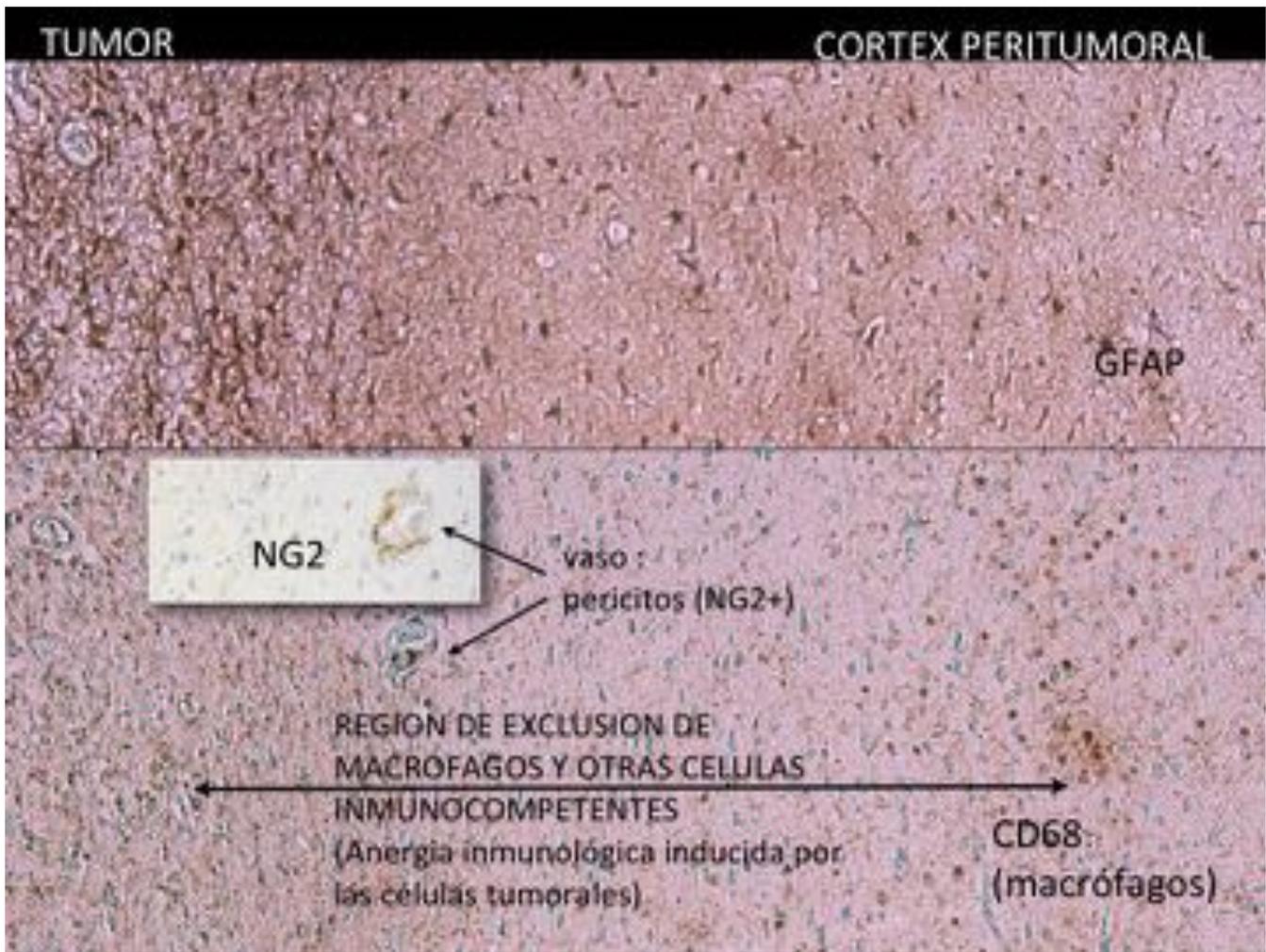


Fig. 21: HCUVA



**Fig. 22:** Histología. Microfotografía de la región peritumoral. Las células del GBM se identifican por su



**Fig. 23:** Histología. Vasos corticales del área peritumoral con células tm en el proceso de cooptación vas

## Resultados

### RM CONVENCIONAL

La mediana de la edad de nuestros pacientes fue de 60,5 años con similar número de mujeres y de hombr

La mediana de tamaño en los tres planos (T, AP y CC) fue de 40 mm, puesto que son tumores típicament

Para el análisis estadístico de las variables cualitativas se utilizaron tablas de contingencia, con el test de Las variables cualitativas obtenidas en RM convencional que mostraron significación estadística ( $P < 0,00$ ) Todos los tumores presentaron edema, efecto masa, patrón infiltrativo y realce con el contraste.

### RM AVANZADA

Las técnicas de RM avanzada de difusión, tractografía y perfusión nos permiten distinguir de forma signi Para el análisis estadístico de las variables cuantitativas se utilizó el test de Student de comparación de m

### PERFUSIÓN

Nuestros hallazgos diferenciales más relevantes estadísticamente significativos fueron el VSC en la regió

## TENSOR DE LA DIFUSIÓN

Los valores de FA tumoral ( $0,125 \pm 0,081$ ) y peritumoral ( $0,181 \pm 0,012$ ) también fueron estadísticamente

Los valores tumorales y peritumoral de ADC de la tractografía no mostraron significación estadística ( $P >$

## DIFUSIÓN

Los valores de ADCr b:1000 en la región tumoral fueron  $0,82 \pm 0,077$  y  $1,34 \pm 0,099$  en la región peritumoral

## ESPECTROSCOPIA

El cociente CHO/NAA de la espectroscopia es la única relación con valor estadísticamente significativo.

También se calculó el **coeficientes estandarizado de las funciones discriminantes canónicas** para toda la perfusión clasificó correctamente el 84,7% de los casos agrupados originalmente y es la que mejor de la FA de la tractografía clasificó correctamente a un 72,2% de los casos agrupados originalmente y delimitó. Las difusiones b:1000 y b:2500 clasificaron correctamente el 80% y el 70,8% de los casos agrupados respectivamente.

## Conclusiones

- Hasta el momento la infiltración perilesional se atribuía al aumento de la angiogénesis e hiperplasia celular.
- En nuestro estudio se ha demostrado que es en el área peritumoral donde se están produciendo los cambios.
- Además se han hallado alteraciones de la inmunidad en la pieza quirúrgica perilesional, asociadas a la enfermedad.
- Hemos hallado marcadores radiológicos reproducibles mediante RM avanzada en la identificación de la enfermedad.
- Estamos analizando los datos para poder establecer una relación entre el estudio de RM en la región peritumoral y la enfermedad.

## Bibliografía / Referencias

1. Osborn, Salzman, Barkovich. *Diagnóstico por Imagen*. 2ª Edición. MARBAN. 2011.
2. Caspani EM, Crossley PH, Redondo-García C, Martínez S (2014). *Glioblastoma: A Pathogenic Classification*.
3. Jung CS, Foerch C, Schänzer A et-al. *Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme*.
4. Krex D, Klink B, Hartmann C et-al. *Long-term survival with glioblastoma multiforme*. Brain. 2007
5. Bulakbasi N, Guvenc I, Onguru O, et al. *The added value of the apparent diffusion coefficient calculation in the diagnosis of glioblastoma multiforme*.
6. Cha S, Knopp E, Johnson G, et al. *Intracranial mass lesions: dynamic contrast-enhanced susceptibility-weighted magnetic resonance imaging*.
7. Law M, Yang S, Wang H, et al. *Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion-weighted magnetic resonance imaging*.
8. Lu S, Ahn D, Johnson G, Law M, Zagzag D, Grossman RI. *Diffusion-tensor MR imaging of intracranial gliomas*.
9. A. Duque, E.Roa, J.Castedo. *Anatomía de la sustancia blanca mediante tractografía por tensor de difusión*.
10. Riyadh N. Al-Okaili, MD, Jaroslaw Krejza, MD, PhD2, Sumei Wang, MD, John H. Woo, MD, Elia
11. Nail Bulakbasi, Murat Kocaoglu, Fatih Örs, Cem Tayfun, and Taner Üçöz. *Combination of Single-shot Diffusion Tensor Imaging and Perfusion-weighted Magnetic Resonance Imaging in the Diagnosis of Glioblastoma*.
12. W. Hollingworth, L.S. Medina, R.E. Lenkinski, D.K. Shibata, B. Bernal, D. Zurakowski, B. Comstock.
13. *Clinical MR Neuroimaging. Diffusion, Perfusion and Spectroscopy*. Edited by Jonathan H. Gillard.
14. *Aprendiendo los fundamentos de la resonancia magnética*. Monografía SERAM. L.Oleaga Zufiría,

15. *P.W Schaefer, E. Grant, G. González. Difussion-weighted MR imaging of the Brain. State of the Ar*