



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS FÍSICAS
(FÍSICA MÉDICA)**

TESIS

“Estandarización de secuencias de pulsos y sistemas de análisis para la cuantificación de estudios clínicos de Espectroscopía por Resonancia Magnética”

Presenta
Sarael Alcauter Solórzano

Tutor Principal
Dr. Fernando A. Barrios Álvarez

Comité Tutoral
Dr. Jorge Alberto Márquez Flores
Dr. Arnulfo Martínez Dávalos
Dr. Miguel Ángel Celis López



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo y el esfuerzo y empeño puestos en él, a mis padres y hermano, quienes de una u otra forma, siempre han estado conmigo y por ellos es que sigo adelante.

A Elizabeth, por su apoyo incondicional

A mi tía Naara por su apoyo, cariño y consejos.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Fernando A. Barrios Álvarez, por los conocimientos y la confianza que depositó en mí para el desarrollo de este trabajo.

A Rafael Favila, Juan José Ortiz, Erick Pasaye, Claudia Del Campo, Juan Romero y Axayácatl Casco por su ayuda, tiempo y amistad.

A la Dra. Magda Giordano Loyola por las facilidades brindadas para el uso de su laboratorio y el material donado. A los Laboratorios de Neurofisiología Celular, Diferenciación Neuronal y Axogénesis, Fisiología Celular, Neurofarmacología Marina y Neurobiología Molecular del Instituto de Neurobiología de la UNAM, por la donación de reactivos.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" y al Instituto de Neurobiología UNAM, en los cuales se pudo llevar a cabo el trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante el cual pude sostener mis estudios de postgrado como becario y al donativo PAPIIT UNAM - IN214305 por el apoyo y recursos.

INDICE

Resumen.....	6
Introducción.....	7
Hipótesis.....	14
Objetivo.....	15

1 Espectroscopia por Resonancia Magnética

1.1 Señal en Resonancia Magnética.....	17
1.1.1.Propiedades del núcleo atómico.....	17
1.1.2.Magnetización neta.....	20
1.1.3.La Ecuación de Larmor.....	23
1.1.4.Pulsos de Radiofrecuencia en RM.....	25
1.1.5.Adquisición de la Señal.....	27
1.1.6.Relajación.....	31
1.1.6.1.Relajación Transversal.....	31
1.1.6.2.Relajación Longitudinal.....	32
1.2 Corrimiento Químico.....	34
1.3 Supresión de Agua.....	38
1.4 Secuencias de Pulsos y Secuencias de Localización.....	39
1.4.1.Sistema de Gradientes.....	41
1.4.2.PRESS (Point Resolved Spectroscopy).....	43
1.4.3.STEAM (Stimulated Echo Acquisition Mode).....	44
1.5 Metabolitos en ERM de ^1H	46
1.5.1.N-acetil Aspartato, NAA.....	46
1.5.2.Creatina y Fosfocreatina, Cr.....	47
1.5.3.Compuestos que contienen Colina, Cho.....	47
1.5.4.Glutamato y Glutamina, Glx.....	48
1.5.5.Inositol, ml.....	48
1.5.6.Lactato, Lac.....	49
1.5.7.Glucosa, Glc.....	49
1.5.8.Aminoácidos.....	50
1.6 Análisis de Datos de ERM.....	51
1.7 LCModel.....	53

2. Métodos

2.1 Referencias para ERM.....	55
2.2 Maniqués para ERM.....	55
2.3 Adquisición de Datos.....	61
2.3.1.Philips Gyroscan Intera 1T.....	63

2.3.2.GE Signa 3T.....	64
2.4 Transferencia de Datos.....	65
2.4.1.Philips Gyroscan Intera 1T.....	65
2.4.2.GE Signa 3T.....	66
2.5 LCModel.....	66
2.6 Conservación de NAA.....	68

3. Resultados

3.1 Datos de ERM de Maniquís.....	70
3.1.1.Philips Gyroscan Intera 1T.....	70
3.1.2.GE Signa 3T.....	71
3.2 Secuencias Estandarizadas para el Análisis Cuantitativo de ERM de ¹ H.....	72
3.2.1.Philips Gyroscan Intera 1T.....	73
3.2.2.GE Signa 3T.....	74
3.3 Conservación de NAA.....	75

Conclusiones.....	77
-------------------	----

A. Anexos

1. ERM de 1H a 1T en Pacientes con Epilepsia de Lóbulo Temporal.....	78
2. ERM de 1H a 3T en Pacientes con Enfermedad de Huntington.....	90

Referencias.....	104
------------------	-----

RESUMEN

La espectroscopia de hidrógeno por resonancia magnética (ERM ^1H) es de utilidad para evaluar procesos metabólicos, principalmente en cerebro. En la práctica clínica las evaluaciones en cerebro se hacen en forma relativa a un metabolito en particular, la Creatina, y están limitadas a comparaciones *intra* sujeto. El objetivo del presente trabajo consistió en estandarizar los métodos necesarios para cuantificar, mediante el software comercial LCModel, los resultados de estudios de ERM de ^1H en dos equipos de resonancia magnética. El software resuelve las concentraciones de metabolitos a partir de información *a priori* de los espectros individuales de los metabolitos que se pueden detectar con la ERM. Se fabricaron 14 maniquís que contienen los metabolitos de interés y se adquirieron sus espectros en dos equipos de resonancia magnética, estableciendo los parámetros que deben utilizarse para poder cuantificar los resultados. Como aplicación del método y aprovechando que los resultados permiten comparaciones *inter* sujetos, se anexan dos secciones que presentan, uno, el estudio de pacientes con epilepsia de lóbulo temporal vs sujetos control, y otro, de pacientes con enfermedad de Huntington vs pacientes control.

INTRODUCCIÓN

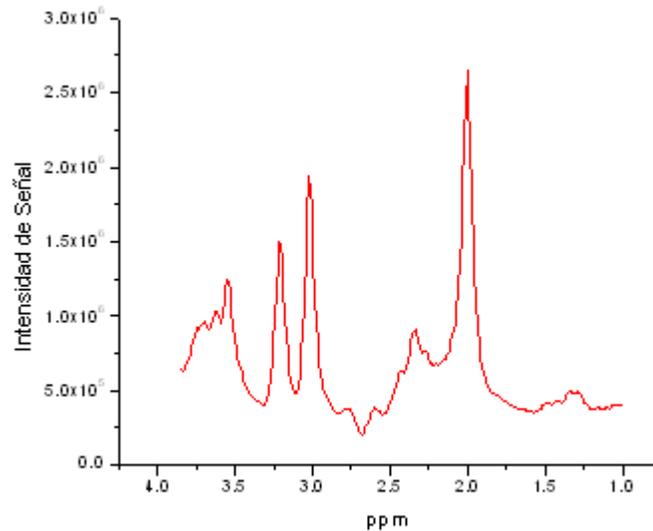
Uno de los métodos de mayor importancia para el análisis de la estructura molecular desarrollado en los últimos 50 años es la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Fue descubierta en 1945 en forma simultánea pero independiente por Purcell, Torrey y Pound y por Bloch, Hansen y Packard. En 1952, Purcell y Bloch recibieron el Premio Nobel en Física por la importancia y lo novedoso de sus investigaciones. La Resonancia Magnética se basa en las propiedades de los núcleos y su medio, que al ser colocados en un campo magnético externo, pueden ser detectados por la absorción y emisión de radiación electromagnética. La diferencia en los niveles de energía de los núcleos inducida por el campo magnético externo es muy pequeña comparada con la energía térmica, provocando que los núcleos resuenen repartidos casi en la misma proporción para cada nivel de energía. En consecuencia, la cantidad de energía absorbida y emitida es muy pequeña haciendo de la Resonancia Magnética (RM) una técnica muy poco sensible comparada con otras técnicas de espectroscopia. Sin embargo, al ser mínima la perturbación de los núcleos por el campo magnético externo, la convierte en una técnica no invasiva y no destructiva ideal para hacer medidas *in vivo*. De hecho, al observar la señal producida por el agua de su propio dedo, Bloch fue el primero en usar la Espectroscopía por Resonancia Magnética (ERM) en un sistema vivo. Aunque la ERM se utilizó casi desde su inicio para estudios *in vivo*, las técnicas específicas para lo que se conoce como ERM *in vivo*, no se desarrollaron sino hasta los

1970s. El interés por definir y explicar las propiedades del agua en tejido vivo llevó a Damadian en 1971 a reportar que las propiedades de RM de tejidos de tumores malignos difieren significativamente de aquellas en tejidos sanos, sugiriendo que la ERM *in vivo* pudiera tener gran valor para diagnóstico. Una de las grandes ventajas de la ERM *in vivo*, aparte de ser una técnica no invasiva ni destructiva, es su capacidad para distinguir distintos metabolitos, permitiendo así estudiar el metabolismo en distintos tejidos de los seres vivos. Existen variantes de la ERM que se clasifican en función del núcleo al cual está dirigida, ya sea al fósforo 31 (ERM ^{31}P) utilizada para medir pH interno, al núcleo de carbono 13 (ERM ^{13}C) utilizada para detectar glucógeno en el hígado y el músculo esquelético, y la más común, la del núcleo de hidrógeno (ERM ^1H).

La ERM ^1H clínica está enfocada principalmente al estudio del metabolismo en el cerebro. La característica de esta técnica se encuentra en su alta sensibilidad al núcleo de hidrógeno, que se traduce en la capacidad para detectar concentraciones bajas de metabolitos (~ 10 mM). Sin embargo, esta característica hace que en el espectro predomine la señal de agua, y en ocasiones la de grasa, ya que la concentración molar del agua respecto a otros metabolitos está en una razón de $10^5:1$. Se cuenta con distintas técnicas para suprimir estas señales dominantes y permitir la detección de las señales más pequeñas. En la clínica, las secuencias utilizadas en cerebro deben incluir alguna o algunas de estas técnicas para suprimir la señal del agua, la cual no tiene porque ser total, siempre y cuando permita la detección de los metabolitos

de interés. La eliminación de la señal de agua del espectro final por supresión y substracción reduce las irregularidades en la línea de base causadas por lo amplio de la base del pico del agua. Lo más común es utilizar métodos de supresión aplicados a la señal del agua durante la adquisición de datos, eliminando o reduciéndola antes de llevar a cabo la excitación y colección de las señales de los metabolitos. Esto se puede lograr mediante la excitación del agua con un pulso selectivo de 90° , conocido como pulso CHESS (por sus siglas en inglés, *chemical shift selective saturation*), seguido de un pulso de gradiente que desfasa la señal. Se puede lograr una reducción de la señal del agua con factores del orden de 100 con una simple aplicación del pulso CHESS. Existen otras técnicas de supresión de agua, siendo CHESS la más común en los equipos comerciales.

La señal medida por RM del tejido vivo provee información sobre los productos bioquímicos contenidos en él. El análisis de estas señales se puede realizar de distintas formas, siempre con el mismo fin, presentar la información en un formato que sea fácil de interpretar, asignando las señales a metabolitos específicos y logrando una cuantificación, ya sea absoluta o relativa, pero que sea robusta. Dicha información debe ser extraída a partir de la señal medida en el tiempo o de la señal procesada en el dominio de las frecuencias. Para lograr esto se han establecido técnicas de procesamiento de la señal de la RM, y estándares para presentar los resultados.



Gráfica de un espectro por RM de ^1H en el Lóbulo Parietal (TE 144, 1 T), intensidad de señal vs corrimiento químico (ppm). Se observan los principales picos de NAA (2.0), Cr (3.0), Cho (3.2), Ins (3.54).

La forma estándar de presentar los datos de una ERM es en el espacio de las frecuencias, graficando en el eje de las abscisas la variación de la frecuencia de resonancia (corrimiento químico, *chemical shift*) y en las ordenadas la intensidad de la señal. Las cantidades que son de interés para la interpretación del espectro son: la posición (frecuencia de resonancia), el área y el ancho de cada pico del espectro. En principio, cada metabolito presente en el tejido, tiene un espectro característico, formado por uno o más picos y dependiente de las secuencias de pulsos utilizadas en la obtención del espectro por RM. El área descrita por los distintos picos es proporcional a la concentración del metabolito, aunque debe considerarse el decaimiento de la señal, y el ancho a la mitad de la intensidad máxima (FWHM) del pico principal determina la resolución del espectro. Cuando se toma un espectro por RM *in vivo*, se tienen varios

metabolitos contribuyendo a la señal y como resultado, la sobreposición de los espectros individuales. Las señales menos intensas pueden perderse e incluso la discriminación y cuantificación del área de las señales más intensas se dificulta. Un método utilizado para el análisis de los espectros consiste en ajustar funciones específicas (gaussianas y/o lorentzianas) para intentar discriminar los distintos picos . Otro método consiste en comparar el espectro medido *in vivo* con una base de espectros individuales de los distintos metabolitos medidos bajo las mismas condiciones pero optimizando la resolución. Este método es utilizado por el software comercial LCModel cuyo análisis es robusto pues tiene la gran ventaja de ser independiente del usuario. En este caso el conjunto de espectros base de los metabolitos se denomina Conjunto Base (*Basis-Set*). Actualmente LCModel se puede considerar el estándar para analizar y cuantificar espectros de RM.

En la mayoría de los estudios de ERM, se expresan los resultados relativos a un metabolito en particular, primordialmente la Creatina (Cr) del que se asumía el pico de su señal como constante por ser un metabolito muy estable. En la presencia de algunas patologías, se debe rechazar esta suposición de que la Creatina más FosfoCreatina (*tCr, total Creatine*) proveen una referencia interna constante . Además, este método limita la posibilidad de comparar los datos entre pacientes y más aun entre distintos resonadores. Para aumentar el potencial de la ERM se debieran obtener medidas cuantitativas absolutas. En general, existen dos formas distintas de expresar las medidas cuantitativas de

un estudio de ERM. La primera, en términos de “unidades institucionales arbitrarias” [15], que son muy convenientes para exámenes clínicos porque permiten comparar estudios entre distintos sujetos siempre y cuando se realicen en el mismo equipo y siguiendo las mismas secuencias de pulsos. Permiten de forma sencilla y práctica hacer estudios para comparar grupos de sujetos control con pacientes o grupos de pacientes. La segunda, unidades de concentración absoluta, que permiten comparar estudios de ERM clínica con datos de análisis bioquímicos en unidades molares (mM). En algunos casos se requieren varios pasos de procesamiento posterior y/o durante la adquisición de los datos y es inevitable la presencia de errores sistemáticos inherentes al procesado. Por ello se debe considerar qué tipo de unidades son más convenientes dependiendo de las posibilidades del equipo y lo práctico de los estudios para lograr medidas en dichas unidades. La principal limitante para obtener medidas absolutas en algunos equipos comerciales es determinar la ganancia de la antena que registra la señal, la cual varía de estudio a estudio. Para solucionar esto, se podría introducir junto con el paciente, una referencia con la concentración conocida de algún metabolito. Esto parece impráctico si no imposible debido al tamaño de las nuevas antenas y el tiempo que tomaría realizar dicho estudio.

El objetivo de este proyecto consistió en la estandarización del método para cuantificar estudios de ERM de ^1H realizados en los centros clínicos participantes. Se requirió la fabricación de 14 maniquís que contienen los principales metabolitos detectados en el cerebro humano y con ellos obtener los

espectros correspondientes en 2 equipos de RM: equipo Gyroscan Intera 1T (Philips Medical Systems, Best, Eindhoven, Holanda) en el Instituto de Neurobiología de la UNAM, con secuencia PRESS y tiempo de eco (TE) 144 ms; y equipo Signa 3T (General Electric, Milwaukee, Wisconsin, E.U.A.), secuencias PRESS con TE de 35 ms y 144 ms. Con estos espectros se generaron los denominados Conjuntos Base utilizados posteriormente con el software LCModel para analizar y cuantificar los espectros adquiridos *in vivo*. En ambos equipos se pueden obtener unidades institucionales de los espectros obtenidos bajo las mismas condiciones que los Conjunto Base.

A fin de aplicar los métodos desarrollados, se obtuvieron espectros de ^1H en la amígdala del Lóbulo Temporal de pacientes con Epilepsia de Lóbulo Temporal y sujetos control, utilizando el equipo de 1 T y se analizaron con la base de datos obtenida para dicho equipo. También se analizaron espectros de ^1H en tres regiones distintas del encéfalo, de sujetos con la prueba genética de Huntington positiva, tanto sintomáticos como asintomáticos, y sujetos control con la prueba de Huntington negativa, adquiridos en el equipo de Signa 3T con TE de 144 ms. Con estos ejemplos se demuestra la utilidad de contar con una herramienta que permite cuantificar y comparar los estudios de ERM de ^1H de distintos individuos.

HIPÓTESIS

Los maniquís contruidos permiten distinguir espectros únicos de los metabolitos aspartato, creatina, glutamato, lactato, alanita, glutamina, glicina, g-ácido aminoburático, glucosa, taurina, n-acetilaspato, myo-inositol, glicerofosfocolina, fosfocolina, con resolución promedio menor a 0.06 ppm en el equipo de 1 T y menor a 0.03 ppm en el equipo de 3 T.

Los datos adquiridos siguiendo los métodos estandarizados permiten cuantificar y comparar estudios de espectroscopia de hidrógeno entre grupos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estandarizar los métodos necesarios para cuantificar, mediante el software comercial LCModel, los resultados de estudios de ERM de ^1H en dos equipos de resonancia magnética: equipo Philips Intera 1 T del Instituto de Neurobiología de la UNAM y equipo GE Signa 3 T del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

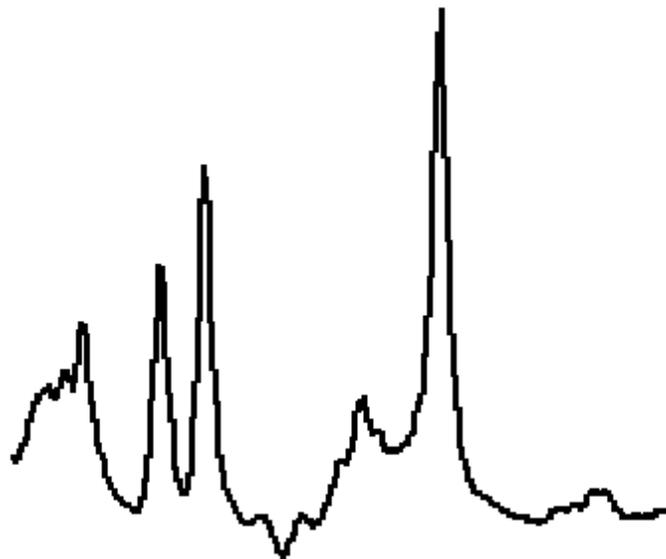
Objetivos Específicos

Objetivo 1. Elaborar un conjunto de 14 maniqués conteniendo cada uno un metabolito: aspartato, creatina, glutamato, lactato, alanina, glutamina, glicina, g-ácido aminoburático, glucosa, taurina, n-acetilaspártato, myo-inositol, glicerofosfocolina, fosfocolina.

Objetivo 2. Obtener el conjunto base de espectros de hidrógeno de los metabolitos en los equipos de resonancia utilizados.

Objetivo 3. Aplicar los métodos estandarizados en grupos de pacientes y grupos control.

CAPITULO 1



ESPECTROSCOPIA POR
RESONANCIA MAGNÉTICA

1.1 Señal en Resonancia Magnética

1.1.1 Propiedades del Núcleo Atómico

La señal de RM tiene su origen en la interacción de un núcleo atómico y campos magnéticos externos. La propiedad de los núcleos de los átomos necesaria para la RM es el espín. Para los propósitos prácticos de la ERM es suficiente usar algunos resultados de la mecánica cuántica y se puede aplicar una descripción clásica cuando se trata de sistemas biológicos por ser sistemas de “alta temperatura”.

En principio, el espín nuclear \vec{J} se entiende como el vector del momento angular intrínseco del núcleo. Todos los elementos en la naturaleza, excepto el cerio y el argón, tienen al menos un isótopo con espín nuclear distinto de cero. Por lo tanto, prácticamente todos los elementos pueden estudiarse usando RM.

El espín nuclear toma valores discretos que dependen de la naturaleza específica de cada núcleo. Se pueden clasificar en 3 clases de valores:

- 1.- Cero o Sin espín. Los núcleos con peso atómico y número atómico pares (número par de neutrones y protones) tienen espín cero.

2.- Espín entero. Tienen espín entero los núcleos con peso atómico par y número atómico impar (número impar de protones y neutrones).

3.- Espín medio. Cuando los núcleos tienen peso atómico impar presentan espín nuclear en términos de $\frac{1}{2}$ ($\frac{1}{2}$, $\frac{3}{2}$, $\frac{5}{2}$,...).

Para la ERM esta última clase es la más común (^1H , ^{31}P , ^{19}F , ^{23}Na). Los nucleones y electrones son partículas de espín $\frac{1}{2}$.

La importancia del espín nuclear es que está asociado con un campo magnético. Por tanto, los núcleos con espín distinto de cero presentan un campo magnético intrínseco y puede entenderse como un dipolo magnético $\vec{\mu}$ proporcional y, por tanto, paralelo a \vec{J} (fig 1.1). La manipulación de la orientación del espín de los núcleos dentro de un campo magnético intenso externo por pulsos de radiofrecuencia (RF) es la base de los estudios de Resonancia Magnética.

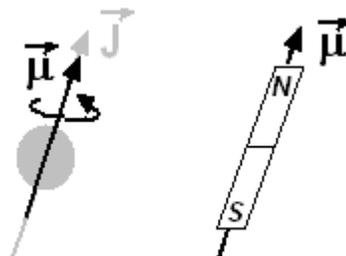


Fig 1.1 Representación del espín nuclear \vec{J} y el momento dipolar asociado $\vec{\mu}$.

La relación entre el momento angular o espín con el momento dipolar magnético del núcleo está dada por,

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{J}$$

donde γ es una constante física conocida como constante giromagnética. Suele usarse por comodidad otra constante relacionada, definida como

$$\gamma = \frac{\gamma}{2\pi}.$$

Los valores de γ para algunos núcleos de importancia clínica se muestran en la tabla 1.1,

Núcleo	Espín	Sensibilidad ^a relativa a ¹ H	Constante
			Giromagnética γ (MHz/T)
¹ H	½	1.000	42.58
¹³ C	½	0.016	10.71
¹⁹ F	½	0.870	40.05
³¹ P	½	0.093	11.26

^aCalculado a un campo constante e igual número de núcleos
Tabla 1.1 Propiedades de núcleos de importancia clínica en RM

1.1.2 Magnetización Neta

Aún cuando $\vec{\mu}$ es una propiedad física presente en aquellos núcleos con espín distinto de cero sin importar bajo qué condiciones se encuentren, su dirección es completamente aleatoria debido al movimiento térmico. La suma vectorial de $\vec{\mu}$ sobre todos los núcleos es cero y no se observa campo magnético neto en los objetos macroscópicos.

Así como una brújula se alinea con el campo magnético de la Tierra, al colocar un objeto dentro de un campo magnético intenso, los dipolos magnéticos nucleares que lo constituyen tienden a alinearse con éste, formando un vector de magnetización neta \vec{M}_0 . Sin embargo, la situación no es tan sencilla como aquella de la brújula, porque el momento magnético nuclear precesa alrededor del campo magnético externo \vec{B}_0 y es el eje de rotación lo que se alinea con él. Además, dependiendo del espín del núcleo, el eje de rotación puede tomar un conjunto específico de orientaciones con respecto a la dirección de \vec{B}_0 . Para núcleos con espín $\frac{1}{2}$ se tienen dos posibles orientaciones del eje de rotación: paralelo (misma dirección) y antiparalelo (en dirección opuesta) con \vec{B}_0 , lo cual corresponde con dos niveles energéticos (fig. 1.2), uno bajo (paralelo) y otro alto (antiparalelo).

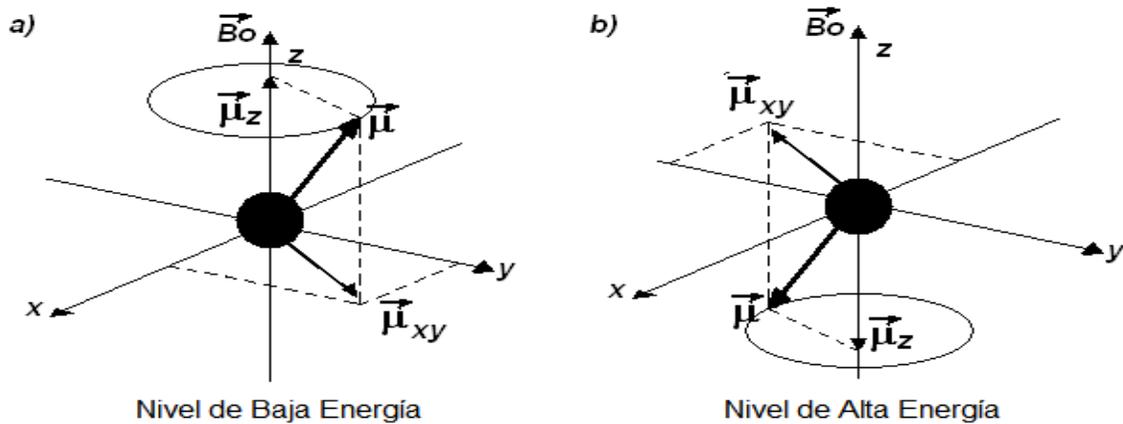


Fig. 1.2 Momento magnético dipolar de un núcleo atómico precesando con eje de rotación a) paralelo (nivel bajo de energía) y b) antiparalelo al campo \vec{B}_0 (nivel alto de energía).

Si establecemos un marco de referencia en que el campo \vec{B}_0 se oriente a lo largo del eje z, los núcleos con espín $\frac{1}{2}$ precesarán alrededor del eje $-z$ o $+z$ como se ilustra en la figura 1.2. Cada uno de estos núcleos tendrá una componente de la magnetización en dirección $-z$ o $+z$ y una componente en el plano xy o componente transversal. La dirección de la componente transversal es aleatoria y no produce una magnetización neta (fig 1.3). La diferencia entre los núcleos orientados en forma paralela o antiparalela con \vec{B}_0 determina la magnitud del vector magnetización \vec{M}_0 del objeto, o del elemento del objeto sobre el cual se efectúe la suma vectorial. La distribución en los estados posibles está descrita por la ecuación de Boltzmann,

$$\frac{N_{\uparrow}}{N_{\downarrow}} = \exp\left(\frac{\Delta E}{KT}\right)$$

donde N_{\uparrow} es la cantidad de núcleos orientados en forma paralela al campo \vec{B}_0 (nivel mas bajo de energía) y N_{\downarrow} los respectivos orientados en forma antiparalela. ΔE es la diferencia entre ambos estados de energía, K es la constante de Boltzmann ($1.381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$) y T es la temperatura absoluta del sistema. Esta ecuación indica que hay un exceso de núcleos en el nivel más bajo de energía, por tanto se tiene un vector de magnetización resultante orientado con el campo \vec{B}_0 .

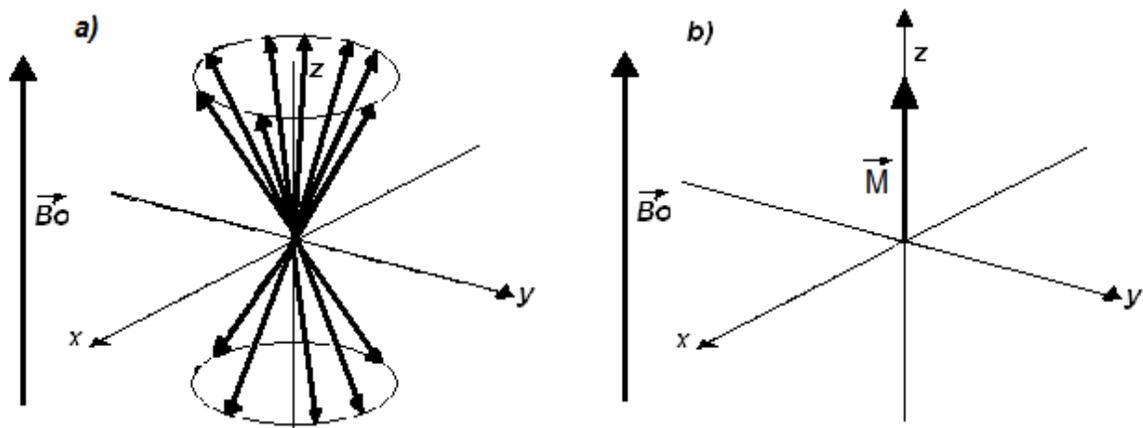


Fig. 1.3 Representación de los campos magnéticos de los protones bajo la influencia de un campo magnético externo \vec{B}_0 , a) los espines precesan alrededor del campo externo en su mayoría en el estado de mínima energía. b) El vector de magnetización neta representa la resultante de la situación en a).

De acuerdo con la teoría cuántica, la energía asociada al momento magnético

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = -\mu_z \vec{B}_0 = -\gamma \hbar m_l B_0$$

dipolar $\vec{\mu}$ al estar sumergido en un campo magnético \vec{B}_0 , está dada por,

Para los espines que apuntan en forma paralela a \vec{B}_0 , $m_l = \frac{1}{2}$,

$$E_{\uparrow} = -\frac{1}{2}\gamma\hbar B_0$$

y para los espines que apuntan en forma antiparalela, $m_l = -\frac{1}{2}$,

$$E_{\downarrow} = \frac{1}{2}\gamma\hbar B_0$$

Por lo tanto la diferencia de energía entre los dos estados está dada por,

$$\Delta E = E_{\uparrow} - E_{\downarrow} = \gamma\hbar B_0$$

que corresponde a la energía que se requiere para pasar de un estado a otro.

1.1.3 La Ecuación de Larmor

La ecuación de Larmor,

$$\omega_o = \gamma B_o$$

describe la frecuencia natural de resonancia de un sistema de espines con constante giromagnética γ sumergido en un campo magnético \vec{B}_0 . En el caso del hidrógeno, su frecuencia natural cuando se encuentra en un equipo de Resonancia Magnética está determinada por su constante giromagnética, con valor de 42.58 MHz/T.

Núcleo	Constante	Campo Magnético	Frecuencia
	Giromagnética γ (MHz/T)	B_0 (Teslas)	Natural ω_0 (MHz)
^1H	42.58	1.0	42.58
^1H	42.58	1.5	63.87
^1H	42.58	3.0	127.74

Tabla 1.2 Frecuencias naturales del Hidrógeno bajo la influencia de campos magnéticos intensos.

La ecuación de Larmor muestra que la frecuencia de resonancia de un sistema de espines es linealmente dependiente de la magnitud del campo magnético externo B_0 y de la constante giromagnética γ . Esta relación es la base física que permite seleccionar núcleos específicos en estudios de RM. Los núcleos de hidrógeno ^1H y fósforo ^{31}P en un objeto cualquiera resuenan a 42.58 MHz y 11.26 MHz, respectivamente, cuando el objeto se coloca en un campo B_0 de 1 Tesla. Esta diferencia en sus frecuencias de resonancia es lo que nos permite seleccionar cuál de ellos vamos a muestrear sin perturbar al otro.

En la práctica, un sistema de espines, por ejemplo de protones o ^1H , tendrá un intervalo de frecuencias resonantes. Esto se debe básicamente a dos razones

primordiales: a) la existencia de inhomogeneidades en B_0 y b) el efecto del corrimiento químico.

De la ecuación de Larmor es obvio que cuando B_0 no es homogéneo, espines con el mismo γ tendrán diferentes frecuencias de resonancia en diferentes localizaciones espaciales. El corrimiento químico se debe a los distintos entornos químicos en los cuales están sumergidos los espines en el objeto, afectando localmente al campo B_0 .

1.1.4 Pulsos de Radiofrecuencia en RM

Un pulso de radiofrecuencia es sinónimo de un campo magnético B_1 . Se le llama así porque su tiempo de vida es muy corto, del orden de micro o milisegundos, y oscila en el intervalo de las radio-frecuencias. En comparación con el campo B_0 , el campo B_1 es mucho más débil, del orden de militeslas.

Cuando se aplica un pulso RF a un conjunto grande de espines como los protones del hidrógeno en el agua de un cierto volumen de tejido, se produce una cantidad significativa de efectos de absorción (espines yendo del nivel de energía más bajo al más alto) y emisión (espines yendo del nivel de energía más alto al más bajo). Sin embargo, como hay más cantidad de espines en el nivel bajo de energía, habrá más eventos de absorción que de emisión, resultando en un efecto de absorción de energía por parte del tejido.

El nivel energético de los núcleos puede cambiarse con pulsos de RF. Si la radiofrecuencia corresponde a la frecuencia de rotación de los núcleos, la frecuencia de Larmor, absorberán la energía y cambiará su estado energético. Además precesarán con la misma fase. Este es el proceso de excitación y tiene efectos directos sobre el vector de magnetización neta.

La energía absorbida se vuelve a perder conforme el movimiento térmico desplaza los núcleos entre sí y con respecto al campo magnético externo. Tras la excitación de los núcleos causada por los pulsos de RF, mientras los espines vuelven a recuperar su nivel energético original, emiten una señal débil de RF en la frecuencia de Larmor. Esta señal débil de RF emitida es la señal de resonancia magnética.

Es más sencillo describir los experimentos de RM como manipulaciones del vector neto de magnetización. La posición de equilibrio de este vector se alinea con el campo magnético porque la mayoría de los espines están en el nivel energético bajo (paralelo). En un sistema de coordenadas tridimensional esta dirección la representa el eje Z positivo. Se trata de la dirección del campo del magneto. En esta dirección el vector de magnetización neta de los núcleos es indetectable. No se puede detectar nada sin manipular la diferencia de población entre los núcleos de nivel energético bajo y los de nivel energético alto.

1.1.5 Adquisición de la Señal

Una irradiación de RF coherente a la frecuencia de Larmor puede cambiar el nivel energético de los núcleos. Ocurrirán dos cosas:

- 1 La diferencia entre las poblaciones de espines de distintos niveles de energía desaparecerá gradualmente. Si la irradiación de RF dura lo suficiente, la mayoría de los núcleos pueden alcanzar el nivel energético alto. El vector neto de magnetización se trasladará del eje +Z al eje -Z. Este proceso suele realizarse a modo que el vector de magnetización neta quede a medio camino; ambas poblaciones son iguales.
- 2 Los núcleos excitados precesarán en fase, inducidos por la coherencia de fase de la irradiación de RF. Ahora hay una magnetización neta en el plano XY perpendicular al campo magnético externo.

Los núcleos aún precesarán a la frecuencia de Larmor. Esto significa que el vector de magnetización neta también precesará en torno a la dirección del campo magnético externo. Si el vector de magnetización neta posee una componente precesando sobre el plano XY, perpendicular al campo magnético externo, se creará una corriente eléctrica oscilante de la misma frecuencia en una bobina detectora, colocada en forma perpendicular a la dirección campo principal. Es decir, será detectable como una señal de resonancia de RF (fig 1.4).

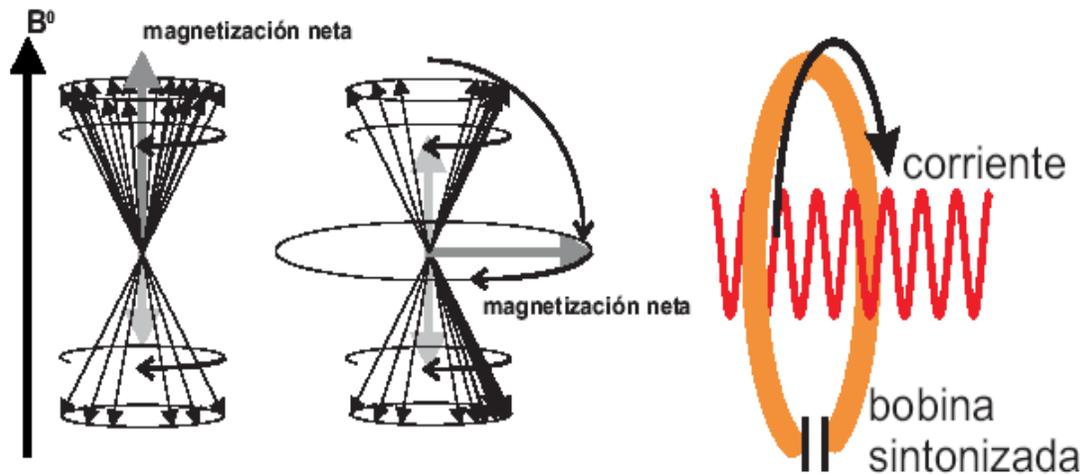


Fig.1.4 Efecto de un pulso de RF. Las flechas negras finas son los espines individuales; las flechas grises son la suma de esos espines. Todos los espines rotan sobre el eje vertical a la frecuencia de Larmor. El pulso igualará las poblaciones de espines e introducirá la coherencia de fase. Los espines excitados (inicialmente) rotan con la misma fase. En el plano transversal horizontal aparece un vector neto debido a la coherencia de fase. Este vector sigue rotando a la frecuencia de Larmor y este campo magnético móvil se considera un campo magnético oscilante, que induce una corriente alterna (RF) en la bobina del receptor sintonizada.

El efecto de un pulso de RF sobre los espines nucleares se expresa mediante una rotación de la suma vectorial de todos los espines. El efecto de un pulso de RF es rotar este vector sobre el eje X o Y. Si esta rotación se detiene cuando las poblaciones son iguales y el vector neto ha rotado en un ángulo de 90° , el pulso se denomina pulso de 90° . La rotación en otros 90° hasta 180° invertirá la diferencia de población. Ahora la magnetización neta se orienta a lo largo del eje -Z. Un

pulso que rota en 180° se denomina pulso de inversión. También se puede aplicar un pulso de 180° para refocalizar los espines que se han defasado en el plano por el efecto T_2 , esto produce un máximo local de señal que se conoce como eco de señal (fig 1.5). La señal útil en resonancia generalmente se lee del eco, pues técnicamente es muy difícil leerla tras el pulso de 90° inicial, que produce un máximo de señal que decae a cero en forma exponencial, esta señal se conoce como FID (siglas en inglés de *free induction decay*) (fig 1.5). Además, dependiendo de los tiempos utilizados para producirlos, se enfatizan distintos contrastes entre los tejidos de interés. El tiempo que transcurre entre el pulso de 90° y el eco de señal producido por un pulso de 180° se conoce como tiempo de eco (fig 1.5). El tiempo que pasa entre dos secuencias de pulsos aplicadas a la misma región, cuyo objetivo es obtener uno o varios ecos de lectura, se conoce como tiempo de repetición (TR) (fig 1.5).

Es imposible ir más allá de una inversión de la diferencia de la población. Los efectos termodinámicos impiden que la cantidad de espines en el nivel energético alto se incremente. De hecho sucederá lo contrario, más irradiación puede restaurar el nivel energético de los espines.

Una rotación de 270° producirá prácticamente el mismo resultado que una rotación de 90° en dirección opuesta. Una rotación en 360° restaurará la situación inicial. La rotación en múltiplos de 360° saturará el sistema y el vector magnético neto desaparecerá porque se igualan y defasan las poblaciones de espines en ambos niveles de energía.

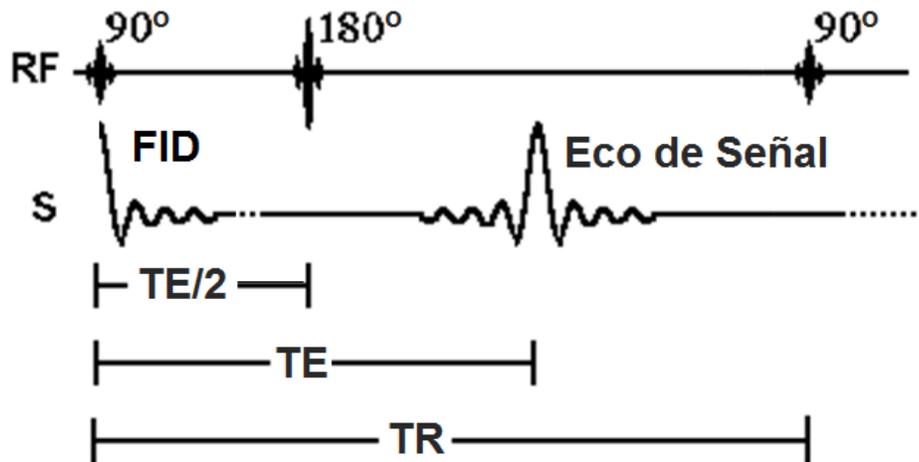


Fig.1.5 Esquema de la aplicación de pulsos de radiofrecuencia de 90° y 180° y la señal producida, se representan los tiempos TR y TE . Para que el eco se produzca al tiempo TE se debe aplicar el pulso de 180° al tiempo $TE/2$.

Es posible medir las siguientes propiedades de la señal de resonancia magnética:

Amplitud, que corresponde a la intensidad de señal y está relacionada con el número de espines. Presenta un descenso posterior a la excitación debido al fenómeno de relajación, caracterizado por las propiedades y medio magnético del tejido.

Frecuencia, determinada por la frecuencia de Larmor y refleja el tipo de núcleo y su medio químico.

Fase, que es función del punto inicial de la rotación de la señal en el plano XY

Aunque la señal se mide realmente como la intensidad de una señal eléctrica en mV, se acostumbra expresarla en unidades arbitrarias.

1.1.6 Relajación

En RM, gran parte del contraste de la imagen se debe a las diferencias entre los tiempos de relajación T_1 y T_2 . En espectroscopía, las frecuencias y densidad de espines exactas son mucho más importantes para identificar los compuestos. No obstante, los efectos de relajación son relevantes porque influyen en el resultado de la medición de la ERM y, por tanto, en cómo debe diseñarse el experimento. Como en la imagen por RM, los tiempos de relajación influyen en la elección adecuada del tiempo de repetición y tiempo de eco.

1.1.6.1 Relajación Transversal

El resultado inicial de un pulso de RF de 90° , es la alineación del vector de magnetización neta a lo largo de un eje en el plano XY, ya que todos los espines precesan en fase. Sin embargo, no todos los espines tienen la misma velocidad de rotación. El vector magnético neto es la suma de todos los vectores de espín nucleares. A medida que los distintos vectores se dispersan debido a las diferencias de velocidad de rotación, disminuye la suma de todos ellos. El resultado es una disminución gradual del vector magnético neto y por tanto, de la intensidad de señal. La pérdida de señal debido a esta dispersión se puede

caracterizar mediante una constante de tiempo. Esta constante de tiempo es el tiempo de relajación transversal T_2 (fig 1.6).

En parte, esta dispersión se debe a pequeñas diferencias en la intensidad del campo magnético. La homogeneización en la fase de preparación de un experimento consiste en ajustar el campo para minimizar estas faltas de homogeneidad en el campo magnético.

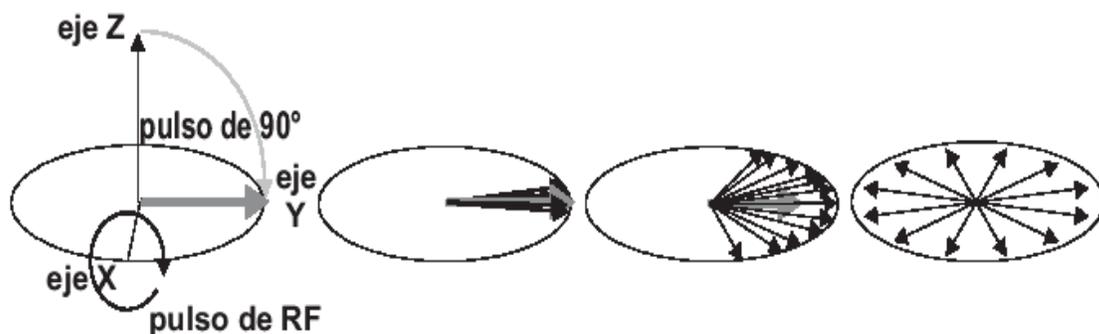


Fig. 1.6 Relajación transversal. La flecha gris es la magnetización transversal total (observable), la suma de los distintos vectores de espín (flechas negras). La magnetización transversal total es máxima si se alinean todos los espines. El total disminuye a medida que se dispersan los distintos espines, y es cero si se distribuyen de manera uniforme.

1.1.6.2 Relajación Longitudinal

Cuando se coloca una muestra en un imán, los espines en el núcleo tardan un poco en alcanzar el equilibrio. Este equilibrio se caracteriza por el número de núcleos en los niveles energéticos alto y bajo. Las moléculas efectúan un

movimiento térmico aleatorio dependiente de la temperatura. Conforme se mueven y oscilan en el campo magnético, los núcleos pueden intercambiar energía, lo que va alterando el equilibrio inicial. Energéticamente ahora resulta más atractivo para los espines alinearse con el campo magnético (nivel bajo de energía). A pesar del movimiento térmico, una pequeña mayoría de los espines terminarán alineándose con el campo. La velocidad de este proceso de alineación depende de la temperatura, la intensidad del campo magnético y diversos factores más, como la viscosidad de un líquido o la presencia de moléculas paramagnéticas.

Tras un pulso de 90° , será igual el número de espines alineados con el campo y en contra de él. Tras un pulso de inversión (180°) será mayor el número de espines en el nivel alto de energía. La vuelta al equilibrio desde cualquiera de estos niveles energéticos puede describirse mediante una constante de tiempo. Esta constante es el tiempo de relajación longitudinal T_1 (fig. 1.7).

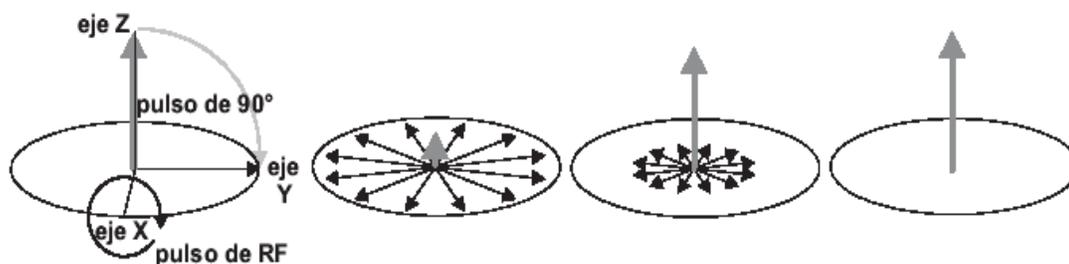


Fig. 1.7 Relajación longitudinal. La flecha gris es la magnetización longitudinal, es decir, la magnetización alineada con el eje Z. Tras un pulso de noventa grados, la magnetización longitudinal inicial es cero, porque las poblaciones de espines son iguales en los dos niveles de energía. Los espines pierden energía hasta que vuelve a haber un exceso de espines alineados con el campo magnético. Esta recuperación exponencial está descrita por la constante de tiempo T_1 y es característica de cada tejido.

1.2 Corrimiento Químico

La ecuación de Larmor establece que la frecuencia de resonancia de un núcleo es directamente proporcional al campo magnético que lo rodea. Núcleos distintos, como el ^{31}P y el ^1H , tienen distintas frecuencias de resonancia porque sus constantes giromagnéticas son distintas. Sin embargo, aún los átomos con el mismo núclido pueden tener frecuencias resonantes ligeramente distintas. Esto se debe no al átomo en sí, sino al ambiente químico del mismo. En las moléculas, los electrones forman enlaces entre los átomos, estos electrones no están localizados enteramente cerca de uno u otro núcleo de aquellos que forman el enlace, están compartidos o distribuidos entre los átomos, formando una especie de nube electrónica. En general, la forma de la distribución electrónica depende de los núcleos involucrados en el enlace atómico. Por ejemplo, los enlaces entre oxígeno e hidrógeno tienen una mayor densidad electrónica cerca del átomo de oxígeno, mientras que en las ligaduras de carbón e hidrógeno, se tiene una distribución electrónica más equitativa. Las variaciones en las frecuencias de resonancia son el resultado de las interacciones de los electrones que rodean los núcleos formando cierta distribución electrónica.

Los electrones, al igual que los neutrones y protones, poseen espín. Así, cuando se colocan en un campo magnético externo, comenzarán a precesar e inducir un pequeño campo magnético \vec{B}' alrededor del núcleo. Estos pequeños campos magnéticos generados por las distribuciones de los electrones alrededor

del núcleo se restan al campo magnético externo \vec{B}_0 , normalmente en magnitudes del orden de partes por millón del campo \vec{B}_0 . Como consecuencia, un cierto núcleo i experimentando un campo magnético \vec{B}'_i debido a la distribución electrónica propiciada por sus enlaces con otros átomos, estará en un campo magnético dado por

$$\vec{B}_i = \vec{B}_0 - \vec{B}'_i$$

que se puede escribir como,

$$\vec{B}_i = \vec{B}_0(1 - \sigma_i)$$

donde σ_i se conoce como el blindaje o apantallamiento químico.

Debido a este cambio en el campo magnético local, el núcleo tendrá una frecuencia de resonancia ligeramente distinta, determinada por la ecuación de Larmor considerando el nuevo campo magnético.

$$\omega_i = \gamma \vec{B}_0(1 - \sigma_i)$$

Este fenómeno se denomina corrimiento químico y constituye la base de la ERM. Esta es la razón por la que las moléculas de los distintos metabolitos tengan

distintas frecuencias de resonancia aún cuando la ERM sea basada únicamente en el núcleo ^1H .

El corrimiento químico en estudios de ERM de hidrógeno generalmente se cuantifica relativo a la posición de un compuesto estable, ácido 3-trimetil-1-propano-sulfonato, también conocido como ácido DSS, que se toma como referencia en 0.0 ppm.

En la práctica, cuando se grafican los espectros, las frecuencias de resonancia no se muestran en unidades absolutas como los Hz. Si el corrimiento químico es reportado en Hz, entonces el corrimiento químico depende del campo magnético. Por ejemplo, si el campo magnético \bar{B}_0 fuese el doble, entonces los valores del corrimiento químico serían el doble, lo cual llevaría al doble de espacio en la escala de frecuencias de dos picos de resonancia. Una forma más conveniente de presentar la escala de las frecuencias es usar partes por millón (ppm). La escala ppm esta definida para diferencias de las frecuencias de resonancia relativas a una frecuencia de referencia:

$$\delta_i = \frac{\omega_i - \omega_{ref}}{\omega_{ref}}$$

Estas unidades son útiles porque son independientes del campo \bar{B}_0 utilizado, y por tanto, los valores de corrimiento químico son válidos para cualquier campo utilizado. Por ejemplo, la frecuencia de resonancia de los protones de la grasa

difiere de aquéllos del agua en 150 Hz a 1 T y en 225 Hz a 1.5 T, aun así, la diferencia es de 3.5 ppm en ambos casos. En la tabla 1.2 se muestran los corrimientos químicos de ERM de ^1H , de algunas moléculas de importancia biológica.

Molécula / Grupo Funcional	Corrimiento Químico (ppm)
Lactato, grupo metil	1.3
N-Acetilaspártato (NAA) grupo metil	2.0
Creatina/Fosfocreatina, grupo metil	3.0
Colina, grupo metil	3.2
Colina, grupo metileno	3.9
Agua	4.7

Tabla 1.2 Corrimiento químico de resonancias de moléculas de importancia biológica relativas al tetrametilsilano (TMS, $(\text{ME})_4\text{Si}$).

El método normal de desplegar el eje de ppm en los espectros de RM es de derecha a izquierda, esto se debe más a razones históricas que a otro motivo especial. En sus orígenes, la espectroscopía por RMN utilizaba una señal de radiofrecuencia continua y lo que se variaba era la intensidad del campo magnético. Desde esta perspectiva, se grafica desde intensidades de campo bajas (a la izquierda) a intensidades de campo mayores (hacia la derecha). Los datos se pueden presentar en cualquier dirección, pero se mantiene la perspectiva original para preservar la consistencia con trabajos previos.

El corrimiento químico permite la identificación de núcleos o grupos funcionales en las moléculas, lo cual es parte importante en la determinación de la estructura molecular.

1.3 Supresión de Agua

Las imágenes de RM se obtienen gracias a la intensidad de señal producida por la alta sensibilidad a los protones (relativa al resto de los núcleos) y a las altas concentraciones de agua en los tejidos. En la ERM, la sensibilidad es crítica para detectar la señal de las pequeñas concentraciones de los metabolitos, así como para mejorar la resolución y reducir los tiempos de adquisición. Sin embargo, la señal tan intensa que produce el agua puede ocultar las señales de los metabolitos, cuyas concentraciones pueden ser cientos o miles de veces más pequeñas. Esto se debe a una propiedad del equipo de adquisición, el denominado intervalo dinámico de los convertidores de la señal analógica a digital (ADC, *analog to digital converter*), definido como el cociente de la señal más intensa y la más pequeña que es capaz de digitalizar. Puede suceder que las señales del agua y los metabolitos tengan un cociente mayor que el intervalo dinámico, esto lleva a que las señales más pequeñas no puedan ser digitalizadas o ni siquiera, detectadas. Se puede llevar a cabo la caracterización de las señales más débiles y una digitalización más adecuada si se logra suprimir en forma selectiva la señal con la amplitud más grande. Este proceso se conoce como supresión de solvente y es comúnmente usado en la clínica para suprimir la señal predominante del agua en la ERM de protones.

La supresión no tiene por qué ser total siempre y cuando sea suficiente para que se detecte la señal de los metabolitos. El resto de la señal del agua puede utilizarse para el postproceso de la señal, en correcciones de frecuencia y de fase, y posteriormente se sustrae del espectro final. La eliminación de la señal del agua del espectro por supresión y sustracción reduce las distorsiones de la línea de base causadas por lo extendido de la base del pico del agua.

1.4 Secuencias de Pulsos y Secuencias de Localización en ERM

Las principales aplicaciones clínicas de la ERM se han centrado en el estudio de regiones específicas con el propósito de hacer algún diagnóstico o para seguimiento y monitoreo de un tratamiento terapéutico. Estas tareas se han facilitado por el uso de técnicas de localización espacial que se desarrollaron originalmente para protocolos de imagen por RM. La localización espacial se refiere a la asignación precisa de la señal detectada a un volumen específico en una región anatómica del cuerpo.

Las técnicas de localización pueden ser caracterizadas como de volumen simple (o univoxel) y multivolumen (o multivoxel). Las técnicas univoxel utilizan pulsos de excitación selectivos para localizar la señal de un volumen relativamente pequeño. Las técnicas multivoxel pueden ser de una dimensión (1D), dos o tres dimensiones (2D o 3D). El número de dimensiones se refiere al número de dimensiones espaciales codificadas en la señal. Cuando se habla de 1D, significa que la señal de RM se origina del volumen excitado, que es una columna dividida

en secciones debido a la aplicación de gradientes o codificación de la señal. En 2D la señal proviene de un plano con cierto grosor dividido en casillas y así, en 3D se tienen un volumen dividido en una red de volúmenes más pequeños, distinguiendo la información gracias a la aplicación de pulsos de gradientes para codificar la señal. Sabiendo que la frecuencia de resonancia depende del campo magnético externo, se aplican gradientes de campo magnético que dependen de la posición. De esta forma se puede codificar la localización espacial de la señal que se recibe.

Un método clínicamente aceptable para la localización espacial en ERM debe cumplir con varios criterios. Debe permitir la elección de pequeños volúmenes de interés (VOI, *volume of interest*) usando imágenes anatómicas de RM como referencia. Debe producir espectros que sean representativos del VOI con mínimas contribuciones provenientes del exterior del volumen definido. Debe producir espectros con buena relación señal a ruido y buena resolución espectral. Y, sobre todo, debe ser de uso fácil y rápido para la práctica clínica.

En la clínica, las dos técnicas de localización utilizadas para la ERM de ^1H univoxel están basadas en la aplicación de gradientes para lograr la excitación de protones de una región específica. Estas secuencias son STEAM (*stimulated echo acquisition mode*) y PRESS (*point resolved spectroscopy*) .

1.4.1 Sistema de Gradientes

Cuando es necesario producir variaciones al campo magnético principal se recurre a la bobina de shimming o al sistema de gradientes. Los gradientes son pequeños campos magnéticos superimpuestos al campo magnético principal B_0 , varían de forma lineal con la distancia y son usados para la localización espacial y correcciones de homogeneidad de primer orden. Los campos de gradientes son generados, uno en cada dirección del eje de coordenadas x , y , z . Para ello se usan bobinas y amplificadores o fuentes de poder individuales. Los gradientes son producidos por corrientes eléctricas a través de cada una de estas bobinas especiales y su combinación produce gradientes en la dirección deseada. Se pueden aplicar de dos formas, en forma de pulsos o de manera continua. La primera es utilizada en las secuencias de RM para codificar principalmente la posición de donde se recibe la información. Cuando se requiere hacer correcciones lineales de la homogeneidad del campo se aplican pequeñas corrientes en forma continua en el sistema de gradientes, dependiendo de la dirección en que se necesita corregir el campo durante el estudio.

La calidad de la localización espacial que un sistema particular de RM puede lograr, depende principalmente de las capacidades de su sistema de gradientes. Las cuatro características que caracterizan el funcionamiento del sistema de gradientes son: intensidad máxima de gradiente, ciclo de demanda (*duty cycle*), tiempo de rampa y técnicas para compensar corrientes parásitas (*eddy currents*).

La intensidad de gradiente se mide en militeslas por metro (mT m^{-1}) o en gauss por centímetro (G cm^{-1}) ($10 \text{ mT m}^{-1} = 1 \text{ G cm}^{-1}$). El ciclo de demanda (*duty cycle*)

determina qué tan rápido puede el amplificador responder a la demanda de la secuencia de pulsos. Valores altos del ciclo de demanda implican que se pueden utilizar gradientes de alta intensidad con intervalos pequeños de tiempo entre pulsos. Los tiempos de subida son importantes porque los gradientes no alcanzan el valor deseado en forma instantánea. El tiempo de subida es el tiempo que tarda el gradiente en alcanzar su valor final, son del orden de 0.5 ms a 1 ms, y se pueden utilizar para definir la razón de cambio de gradiente o *slew rate*. Si el pulso de gradiente deseado es de 10 mT m^{-1} en 1 ms, el *slew rate* será de $10 \text{ mT m}^{-1} \text{ ms}^{-1}$. En ERM generalmente se utilizan volúmenes del orden de cm^3 y no se requieren de gradientes intensos, por lo que estas características del sistema de gradientes tienen mayor impacto sobre las secuencias de imagen. La mayor complicación del sistema de gradientes en los estudios de ERM son las *eddy currents*. Son corrientes eléctricas producidas en respuesta al cambio del campo magnético (al pulso de gradientes). Se inducen en todas las partes metálicas del sistema de RM, incluyendo la antena de cuerpo y el blindaje del contenedor del Helio líquido (*cryoshield*). Estas corrientes crean campos magnéticos que se oponen y distorsionan al pulso de gradientes. La mayoría de estas corrientes decaen antes de que comience la adquisición de los datos. Sin embargo, aquellas producidas en el *cryoshield* tienen constantes de tiempo largas y están presentes durante la adquisición, causando inhomogeneidades de campo y que las frecuencias correspondientes cambien. Se pueden compensar los efectos de dichas corrientes de dos formas. Una consiste en predistorsionar o dar forma al pulso de gradientes de modo que la configuración final producida por la distorsión sea la deseada. Esto se puede lograr mediante hardware o software. El segundo método consiste

en una antena secundaria que rodea la antena de gradiente principal y minimiza las *eddy currents* producidas en el equipo. Los estudios de ERM son especialmente sensibles a las *eddy currents* y en ocasiones es necesario hacer correcciones posteriores a la adquisición. El método más utilizado para ello consiste en medir la distorsión de fase producida por las *eddy currents* a un pico de referencia, generalmente el pico del agua en los estudios de ERM de ^1H , y compensar la señal del estudio del volumen deseado.

1.4.2 PRESS (Point Resolved Spectroscopy)

Es una técnica que adquiere el espectro a partir de un pequeño volumen de tejido, definido por la intersección de tres planos ortogonales. Para lograr la excitación de cada plano es necesario aplicar una serie de gradientes y pulsos en una secuencia determinada (Fig. 1.8). La secuencia consiste en la aplicación de un gradiente en una dirección X' y un pulso de RF selectivo de 90° que sólo excita a una región del tejido. Esta región consiste en un plano ortogonal a la dirección del gradiente aplicado y produce una señal que no se registra. Se aplica un gradiente en dirección Y' y un pulso de RF selectivo de 180° , de modo que sólo los protones que están en la intersección de los dos planos son refocalizados y producen otra señal que se ignora también. El último pulso de 180° se aplica tras un gradiente en el eje Z' , refocalizando únicamente los espines de los protones que se encuentran en la intersección de los 3 planos. La señal que se produce tras este pulso constituye la señal del espectro del volumen de interés.

1.4.3 STEAM (Stimulated Echo Acquisition Mode)

Los principios de la selección del volumen de interés con la técnica STEAM son los mismos que con PRESS, pero los pulsos de RF selectivos que se aplican son todos de 90° . Similarmente, se aplican tres pulsos de gradientes, cada uno a lo largo de los tres ejes ortogonales que atraviesan el volumen de interés. La diferencia es que el segundo pulso, en vez de refocalizar los espines de la intersección de los planos, los regresa al eje principal del magneto, donde se mantiene durante un tiempo T_M , hasta que se aplica el tercer pulso de 90° . La técnica STEAM se deriva de un proceso de tres pulsos de 90° que producen 4 ecos de señal. El eco mayor, conocido como el eco estimulado, producido en un tiempo $TE/2$, es el que se lee y con el que se produce el espectro final. Para suprimir el agua se pueden aplicar pulsos al inicio de la secuencia o durante el tiempo T_M .

La mayor diferencia entre PRESS y STEAM es la naturaleza del eco de señal. En PRESS, el eco se forma por la refocalización de todo el vector de magnetización, mientras que en STEAM, sólo parte de la señal disponible produce el eco estimulado. Como consecuencia, la técnica PRESS produce una relación señal/ruido mayor que STEAM, teóricamente en un factor de 2. Sin embargo, STEAM permite tiempos de eco más cortos, haciéndolo útil para estudiar metabolitos con T_2 cortos.

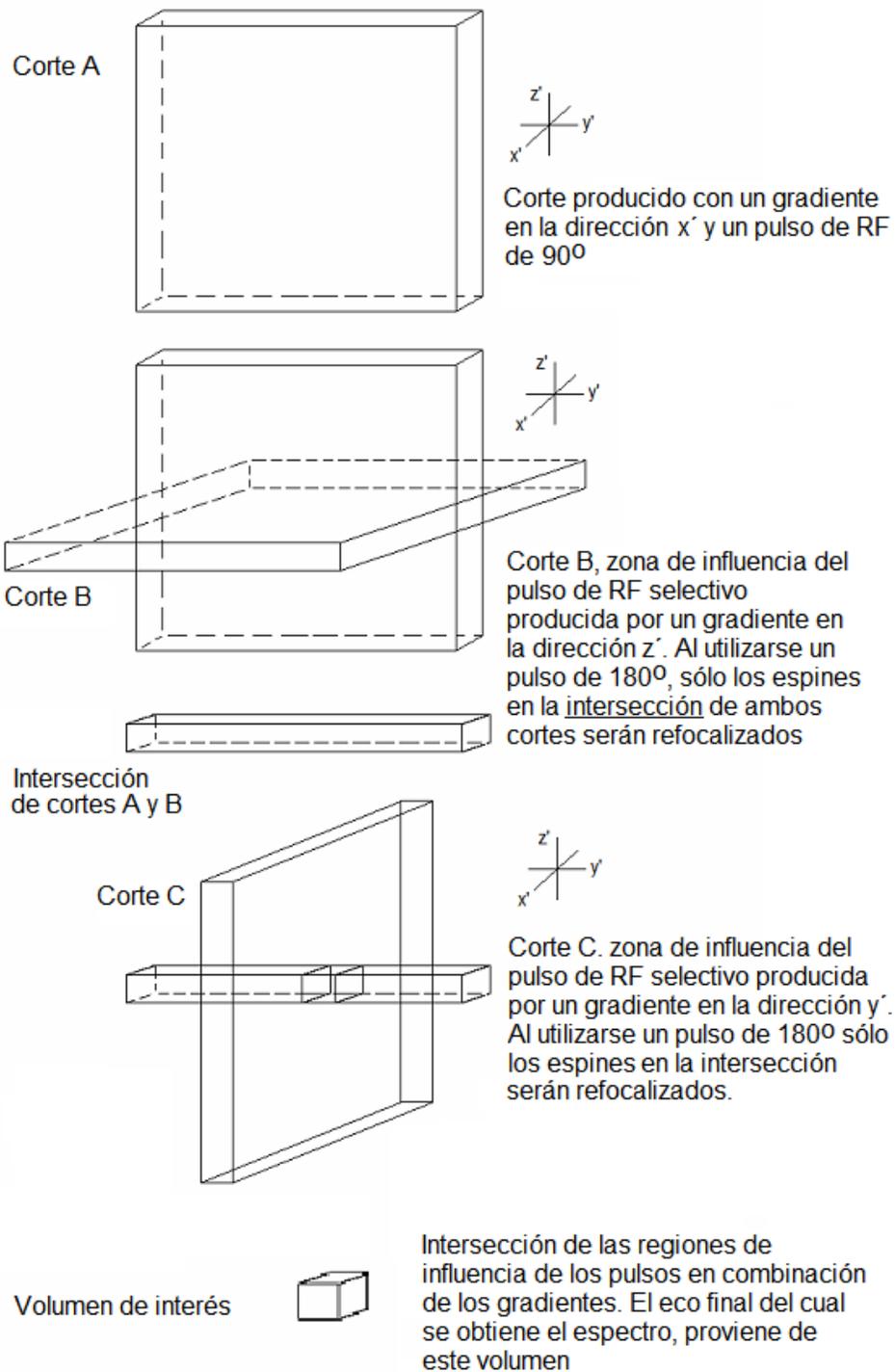


Fig.

1.8 Descripción gráfica de la selección del volumen de interés mediante PRESS

1.5 Metabolitos en ERM de ^1H en cerebro

El núcleo del hidrógeno es el núcleo más sensible a la resonancia magnética, debido tanto al alto valor de su constante giromagnética como a su abundancia natural. El agua es el compuesto con hidrógeno más abundante en el cuerpo humano, con una concentración aproximada de 40 moles . La imagen por RM hace uso de la intensa señal del agua para generar imágenes que reflejan su distribución y en consecuencia, de la estructura anatómica. Aunque esencial para la imagen por RM, la señal del agua es un problema para la espectroscopía de protones por RM porque domina sobre las señales de interés. Las resonancias observadas provienen de compuestos que tienen importantes funciones metabólicas, como síntesis de membrana, metabolismo de energía y glicolisis.

1.5.1 N-acetil Aspartato, NAA

En los espectros de hidrógeno de tejido sano de cerebro, la señal de resonancia más intensa aparte del agua es del grupo metil del N-acetil aspartato (NAA), cuya señal se registra en el valor 2.02 ppm. Otros protones del NAA resuenan a 2.499 ppm y 2.69 ppm. El NAA únicamente se localiza en el sistema nervioso central y periférico. Su concentración varía en diferentes partes del cerebro . Aun cuando hay una gran cantidad de literatura sobre la síntesis, distribución y posible función , la función exacta del NAA permanece desconocida. Para la espectroscopía de hidrógeno, el NAA ha jugado un importante papel como marcador neuronal, ya que se encuentra únicamente en las neuronas. Esto se apoya en la observación de decremento en la concentración de NAA en desórdenes acompañados de pérdida neuronal, como las etapas crónicas de

infartos , tumores y esclerosis múltiple . Hay evidencia de que la disminución de NAA no necesariamente refleja pérdida neuronal, pero sí funcionalidad . La única enfermedad conocida con aumento en la concentración de NAA es el síndrome de Cánavan en niños pequeños y recién nacidos.

1.5.2 Creatina y Fosfocreatina, Cr

En los espectros de hidrógeno de tejido normal que contienen creatina, se encuentran picos en 3.03 ppm y 3.93 ppm, que provienen de los protones de los grupos metil y metileno de la creatina y creatina fosforilada, fosfocreatina. La diferencia de resonancia de estos dos compuestos es demasiado pequeña por lo que es indistinguible. Por ello se refieren generalmente como creatina total (tCr). La creatina y/o fosfocreatina juega un papel importante en el metabolismo de energía . En el cerebro, creatina y fosfocreatina se encuentran presentes tanto en células neuronales como gliales.

1.5.3 Compuestos que contienen Colina, Cho

Aunque está presente en concentraciones menores que los metabolitos descritos (NAA y tCr), tiene un pico principal de resonancia en 3.22 ppm debido a sus nueve protones en tres grupos metiles; tiene además picos de resonancia en 3.54 y 4.05 ppm, con intensidades muy pequeñas que no se observan en estudios *in vivo* . En realidad el pico visto en 3.22 ppm es resultado de resonancias de varios compuestos que contienen colina. En cerebro y músculo, fosforilcolina y

glicerofosforilcolina son los compuestos que más contribuyen al pico de señal. Los compuestos que contienen colina están involucrados en procesos de síntesis y degradación de fosfolípidos. Por ello reflejan síntesis y degradación de membranas. En muchos tumores, la colina aumenta mientras la creatina decrece.

1.5.4 Glutamato y Glutamina, Glx

Los espectros de glutamato (Glm) y glutamina (Gln) son difíciles de observar y dependen del TE utilizado. La concentración de glutamato es similar a la del NAA (~ 8 mM); sin embargo, es más difícil de observar y cuantificar. Tienen picos de resonancia en 3.74 ppm, 2.35 ppm, 2.11 ppm y 2.04 ppm. El glutamato es uno de los principales neurotransmisores del sistema nervioso central; puede encontrarse en todas las células del cerebro, aunque su concentración es mayor en las neuronas.

1.5.5 Mioinositol, ml o Ins

El inositol se puede detectar tanto en cerebro como en pulmones. Tiene resonancias en cuatro posiciones distintas, 3.28 ppm, 3.54 ppm, 3.60 ppm y 4.05 ppm. La resonancia más pronunciada del ml ocurre en 3.54 ppm utilizando TE cortos. Su concentración es mayor en los cerebros de niños, y varía hasta que se estabiliza en la edad adulta. Aún no se conoce el significado de este comportamiento. El interés sobre los metabolitos con Inositol se debe a que los

fosfatos de inositol juegan un papel importante en las vías de comunicación intracelulares.

1.5.6 Lactato, Lac

La posibilidad de detectar lactato en el cerebro fue una de las razones para desarrollar la ERM de hidrógeno. Esto se debe a que el lactato o ácido láctico es un importante marcador metabólico de isquemia e hipoxia , ya que su concentración aumenta de forma importante en tejidos como cerebro y músculo cuando se privan de oxígeno, aún cuando sea por periodos de poca duración. El lactato tiene resonancias en 4.11 ppm y 1.33 ppm, siendo ésta la más detectable cuando se incrementan sus niveles. Su señal puede mezclarse con la de lípidos que resuenan entre 0 y 2 ppm. Bajo condiciones de oxigenación normales, la concentración del lactato es casi indetectable por RM ~ 1 mM por su baja concentración. Sin embargo, en desórdenes como hipoxia, infarto y cáncer , su concentración puede aumentar alrededor de 10 mM.

1.5.7 Glucosa, Glc

La glucosa juega un papel central en el metabolismo de energía en el cerebro y otros órganos. Su señal se detecta entre 3 ppm y 4 ppm, cercano al pico del agua y su detección es complicada mediante la ERM de hidrógeno. Se utilizan técnicas con TE < 30 ms para detectar un pico específico de glucosa en 3.43 ppm .

1.5.8 Aminoácidos

Además del NAA y Glx, otros aminoácidos pueden detectarse con ERM de hidrógeno *in vivo*. Estos pueden ser alanina, aspartato, ácido gama-aminobutírico (GABA), glicina y taurina. Estos compuestos son observados en extractos de tejido cerebral, pero la resolución de la ERM hace difícil su detección.

La estructura de la alanina es muy similar a la del lactato y resuena en 1.48 ppm y 3.78 ppm. Se ha visto que su concentración aumenta en meningiomas. Aspartato, GABA y glicina son neurotransmisores de gran importancia, pero sus resonancias son difíciles de detectar. El aspartato tiene una estructura idéntica al NAA excepto por el grupo N-acetil, lo que hace muy complicada su detección. GABA tiene resonancias en tres posiciones distintas, 2.31 ppm, 1.91 ppm y 3.01 ppm. La sobreposición con resonancias de glutamato, glutamina y NAA, complica su detección. La glicina sólo tiene un pico de resonancia en la posición 3.56 ppm, pero su baja concentración y superposición con el ml dificulta su estudio. La concentración de la glicina aumenta tras isquemia cerebral global .

El espectro de la taurina consiste en picos detectados en 3.27 y 3.44 ppm. En el cerebro de neonatos su concentración es de ~ 6 mM pero decrece con la maduración para alcanzar niveles de ~ 2 mM. Similar al NAA, la función de la taurina no es bien conocida, aunque se han propuesto algunas como osmoregulador, antioxidante y regulador de calcio.

1.6 Análisis de Datos de ERM

La señal de RM incluye todas las frecuencias de los espines en la muestra. Para extraer su información, se aplica la transformada de Fourier. La transformada de Fourier revela las frecuencias contenidas en la señal y sus intensidades.

La señal se graba digitalmente. Sería muy difícil hacerlo a la frecuencia de radio, altamente elevada de la señal, por lo que ésta se sustrae de una frecuencia de referencia. El resultado es una señal en frecuencias de audio, con posibilidad incluso de frecuencias con fase negativa. Para poder distinguirlas de las de fase de signo opuesto, hay que grabar la señal con detección sensitiva de fase. Se graba simultáneamente la señal con una copia, tal como se observaría desde una segunda bobina que formara un ángulo de 90° respecto a la primera. Las señales que siguen una dirección pasarán por esta segunda bobina un cuarto de vuelta después de la primera, mientras que las señales que giran en la otra dirección sufrirán un retraso de tres cuartos. Como consecuencia, las señales tendrán signo opuesto en esta segunda bobina. Este método se denomina detección de cuadratura. Es posible simular electrónicamente la segunda bobina o añadir una bobina real como en las de cuadratura. Con la segunda solución se consigue mejor razón señal-ruido (en inglés *SNR*) que con otras bobinas del mismo tamaño que en realidad captan la señal dos veces.

El espectro es mucho más fácil de interpretar que la señal en función del tiempo. El ancho de banda del espectro depende de la velocidad de muestreo de la señal en la dimensión temporal. Suele estar en torno a unos centenares de

hertz o algunos kilohertz. La intensidad suele expresarse en unidades arbitrarias, porque en la señal influyen numerosos factores de escala, como la sensibilidad de la bobina y la del preamplificador. El grosor de línea (anchura de altura media, en inglés *FWHM*) está inversamente relacionado con la constante de tiempo de descenso de las señales en la dimensión temporal. Las constantes de descenso de las distintas señales de RM están determinadas en parte por la homogeneidad de campo y en parte por la constante de relajación transversal intrínseca T_2 . Una homogeneización correcta evita el primer efecto y por tanto disminuye el ancho de los picos a su altura media. Ello reduce la probabilidad de sobreposición de los picos y aumenta la altura de éstos. Esto mejora la razón señal-ruido efectiva.

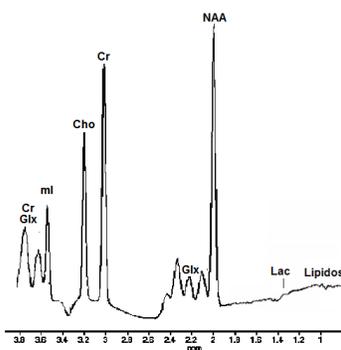


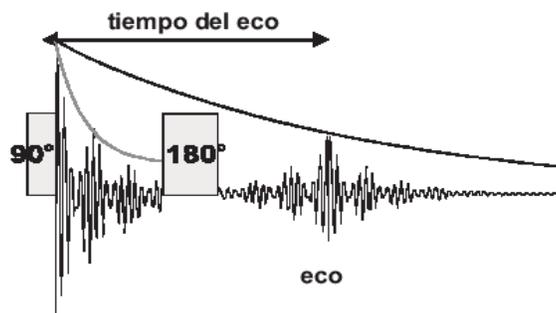
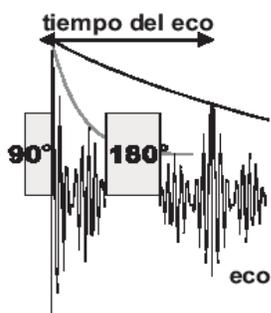
Fig. 1.9 Espectro de ^1H de sustancia blanca en lóbulo parietal, TE 40 ms. Sólo se muestra la parte del espectro situada a la derecha de la resonancia en agua. Correspondencias pico: Cr total: Creatina total, NAA: N-acetil-aspartato, α - y β - Glx: picos combinados de glutamato y glutamina, ml: mioinositol. Cho: colina, Lac: posición de CH_3 de lactato, resonancia (no presente) y lípido: resonancia amplia de lípidos y triglicéridos.

1.7 LCModel

LCModel de sus iniciales en inglés, *Linear Combination of Model Spectra*, es un software que analiza estudios de ERM *in vivo* como una combinación lineal de una base de espectros de soluciones de metabolitos obtenidos *in vitro* de manera individual. Este método, propuesto por de Graaf y Bovée y Provencher, se ha convertido en el más utilizado para analizar de forma cuantitativa espectros de hidrógeno por RM. Los métodos anteriormente utilizados se basaban en ajustar curvas gaussianas o lorentzianas a los picos principales de resonancia. Al utilizar la información de espectros obtenidos *in vitro*, se emplea toda la información del espectro *in vivo*. La ventaja de utilizar información completa de los espectros es que picos que se superponen en alguna posición de resonancia se pueden relacionar con otros picos de la misma molécula que no se superponen.

El conjunto base de espectros se adquiere una sola vez con la misma técnica y el mismo TE que se adquieren los estudios *in vivo*. De este modo, la información que se tiene *a priori*, es directamente utilizada para el análisis de los estudios *in vivo*.

CAPITULO 2



MÉTODOS

2.1 Referencias para ERM

Los datos de ERM *in vivo* son analizados como una combinación lineal de espectros de metabolitos individuales recolectados *in vitro*. Esta colección de espectros individuales se conoce como Conjunto Base y debe contener la mayor cantidad posible de metabolitos que se esperen cuantificar en los estudios de ERM. El Conjunto Base debe adquirirse una sola vez y utilizado indefinidamente para analizar estudios *in vivo* que coincidan con ciertos parámetros de adquisición, mientras el instrumento no sea modificado. Estos parámetros son:

- Campo Magnético B_0 (Resonador)
- Secuencia de Localización (STEAM o PRESS)
- TE
- TM (cuando se usa STEAM)

El tiempo de repetición TR y el tiempo total de la adquisición no tienen necesidad de coincidir.

2.2 Maniquís para ERM

Los espectros de los metabolitos considerados para elaborar el Conjunto Base deben tener una mejor razón señal-ruido y mejor resolución que los espectros tomados *in vivo*. Para ello se consideran concentraciones apropiadas para cada

metabolito y se utilizan maniquís lo más isotrópicos posible. También es importante que los espectros individuales sean escalados en forma consistente unos con otros. De otra forma al analizar espectros tomados *in vivo*, los resultados serán incorrectos. La habilidad de hacer un escalamiento por parte del software LCModel facilita esta tarea. Para que esto se pueda realizar, es necesario que los maniquís contengan la misma concentración de Formato de Sodio, en este caso 200 mM, y que sus espectros individuales sean tomados bajo condiciones idénticas, incluyendo la posición en el escáner, la localización del voxel en el centro del maniquí y de preferencia adquirirlos en el mismo periodo de tiempo. Además, los maniquís incluyen 2 mM de ácido DSS que produce un pico que se toma como referencia en 0.0 ppm. Una concentración de 2 mM es suficientemente alta para lograr detectar el pico respectivo en 0.0 ppm, pero a su vez lo suficientemente baja para que se confundan con el ruido al momento de hacer el análisis y no contribuyan como artefacto en los espectros *in vivo* analizados.

En la tabla 2.1 se muestran los metabolitos utilizados para elaborar los Conjuntos Base. Se eligieron los metabolitos que se esperan cuantificar alguna vez utilizando LCModel y que son de importancia para los procesos metabólicos del cerebro principalmente.

Metabolito	Nombre Abreviado	Conc. (mM)	Peso Mol (uma)	g/ 300ml	Prveedor
Aspartato (Acido L-Aspartico)	Asp	40	133.10	1.60	S A8949
Creatina	Cr,Cre	50	149.15	2.24	F 27890
Glutamato	Glu	50	146.10	2.19	S G5889
L-Lactato	Lac	100	90.08	2.70	F 71718
L-Alanina	Ala	100	89.10	2.67	F 05129
Glutamina	Gln	100	146.10	4.38	S G5763
Glicina	Glyc, Gly	200	75.07	4.50	S G7126
g-Acido Aminoburático	GABA	200	103.10	6.19	S A2129
Glucosa	Glc	200	180.20	10.81	S G8270
Taurina	Tau	200	125.10	7.51	S T9931
N-Acetilaspártato	NAA	50	175.14	2.63	F 00920
Myo-Inositol	Ins, mI	200	180.16	10.81	F 57569
Scyllo-Inositol	Scyllo	Sim	Sim	Sim	Sim
N-Acetilaspártatoglutamato	NAAG	Sim	Sim	Sim	Sim
Glicerofosfocolina	GPC	25	440.50	3.30	S G8005
Fosfocolina	PCh	27	329.73	2.67	F 79413

Tabla 2.1 Lista de Metabolitos utilizados para elaborar los Conjuntos Base. Se enlistan nombre, nombre abreviado, concentración mínima requerida para elaborar el maniquí correspondiente, el peso molecular, la masa en gramos requerida para lograr la concentración en 300 ml de solvente y el proveedor con su número de catálogo (S = Sigma y F = Fluka). Sim indica que el espectro del metabolito fue simulado.

El N-Acetilaspártatoglutamato (NAAG) es muy costoso y difícil de conseguir, una forma de obtener su espectro es simularlo a partir del obtenido para el N-Acetilaspártato (NAA) recorriendo el pico principal desde 2.01 ppm hasta 2.045 ppm. Esta es una buena aproximación para el NAAG, especialmente para tiempos de eco largos.

Para que los espectros individuales del Conjunto Base se puedan escalar y ajustar correctamente unos con otros, se debe utilizar un solvente general donde se disuelve cada metabolito. Este solvente debe tener las siguientes concentraciones,

2 mM DSS (3-(trimetilsilil)-1-propanosulfonato)

72 mM K_2HPO_4

28 mM KH_2PO_4

200 mM Formato de Sodio

1 g/L NaN_3

Los fosfatos de potasio dibásico (K_2HPO_4) y monobásico (KH_2PO_4) funcionan como amortiguadores de pH, facilitando así su ajuste a un valor de 7.2, que corresponde al valor fisiológico de pH. El formato de sodio se requiere para hacer el autoescalamiento y autoenfamamiento entre los espectros individuales de los metabolitos. El DSS se utiliza para generar el pico de referencia de todos los espectros. La azida de sodio (NaN_3) actúa como conservador. La Tabla 2.2 muestra los datos de las sustancias utilizadas para el solvente general.

Sustancia	Conc. (mM)	Peso Molecular (uma)	g/L	Proveedor
DSS (TSPS)	2	218.32	0.44	F 92754
K_2HPO_4	72	174.18	12.54	JTB 3252-20
KH_2PO_4	28	136.09	3.81	JTB 3246-01
Formato de Sodio	200	68.01	13.60	F 71539

NaN ₃	-	-	1	-
------------------	---	---	---	---

Tabla 2.2 Lista de Sustancias utilizadas para elaborar el solvente general. Se enlistan nombre, concentración requerida, el peso molecular, la masa en gramos necesaria para lograr la concentración por cada litro de agua y el proveedor con su número de catálogo (JTB = J.T. Baker y F = Fluka)

Debido a los fosfatos del solvente y al cadmio y calcio contenidos en GPC y PCh respectivamente, estos metabolitos no son solubles en esta solución. La forma de resolver esto es utilizar para estos metabolitos un solvente sin los fosfatos, lo cual dificulta el ajuste del pH.

Sin considerar NAAG, Scyllo, GPC y PCh, se tienen 12 metabolitos que requieren de 4 litros de este solvente estándar. Al producirlos a la vez, se garantiza que todos los maniquís tendrán las sustancias de referencia a las mismas concentraciones, lo cual es de suma importancia para que el ajuste y escalamiento se realice de la forma más exacta posible. Para el GPC y PCh se tiene cuidado en lograr las mismas concentraciones. NAAG y Scyllo no requieren solvente ya que son simulados.

Una vez que se tienen disueltos los metabolitos en sus respectivos 300 ml de solvente, se mide y ajusta el pH a 7.2, ya sea con hidróxido de sodio (NaOH) y/o ácido clorhídrico (HCl). Si no se ajustara el pH, algunas resonancias pudieran verse afectadas, sobretodo aquellas del NAA y Glu.

Las cantidades de soluto se midieron con básculas de precisión marca Scientech, modelos SL 1000 y SL 210 con resolución de 0.01g y 0.0001 g respectivamente. Las soluciones se mezclaron con un agitador magnético marca VWR, modelo 320. El pH se midió con un pH-metro marca Corning, modelo 320.

Las soluciones conteniendo cada metabolito se vaciaron en matraces esféricos de fondo redondo y cuello largo marca Kimax, modelo K-25200, con capacidad de 250 ml sin considerar el cuello y de 300 ml hasta el borde del mismo. Se tapan cuidando que no queden burbujas de aire utilizando tapones de hule del número 5 y sellándolos con película Parafilm. Se etiquetaron con su respectivo metabolito, concentración y fecha de elaboración y se almacenaron a 5 °C para conservarlos el mayor tiempo posible. Al realizar las mediciones, deben volver a temperatura ambiente. Las interfaces entre medios (agua-cristal, agua-aire) producen inhomogeneidades al campo magnético principal, por ello se evita la formación de burbujas y se prefiere un maniquí esférico a fin de que no haya deformación del campo en función de la forma y posición del maniquí.

2.3 Adquisición de Datos

Se obtuvieron datos en dos equipos de Resonancia Magnética de distintas plataformas:

- Resonador Magnético Gyroscan Intera 1T (Philips Medical Systems, Best, Eindhoven, Holanda), instalado en el Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla.

- Resonador Magnético Signa 3T (GE Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin, E.U.A.), instalado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, Ciudad de México.

Se utilizaron secuencias PRESS por ser las que mayor cantidad de señal proporcionan y por su amplio uso en el medio clínico. Los tiempos de eco fueron seleccionados según las aplicaciones de mayor uso en los respectivos centros de atención visitados.

Debido a la uniformidad de los maniquís y su contenido, mientras mayor sea el volumen del voxel, mayor será la cantidad de señal adquirida. Sin embargo, se deben evitar los bordes del maniquí por las no-uniformidades del campo magnético y la interfaz de los distintos medios (sustancia-cristal-aire). Las dimensiones del voxel no necesariamente deben ser idénticas durante la adquisición para todos los maniquís; sin embargo, es lo más recomendado para lograr que las condiciones de adquisición sean lo más semejantes posible.

El ancho de la banda de frecuencias de excitación debe ser mínimo de 16 ppm, centrada en el pico de resonancia del agua. Para los campos magnéticos involucrados, 16 ppm se traducen a distintos valores en la escala de frecuencias. En la Tabla 2.3 se muestran los valores mínimos en Hz para lograr un ancho de banda (*bandwidth*) aproximado de 16 ppm,

Teslaje	Ancho de Banda	
	Hz	ppm
1	700	16.4
3	2000	15.7

Tabla 2.3 Ancho de Banda mínimo requerido para adquirir los datos en los distintos equipos

En todas las adquisiciones se utilizó tiempo de repetición TR = 10 000 ms. De este modo se garantiza que el vector de magnetización se relaja completamente antes de la próxima excitación produciendo el máximo de señal y evitando la necesidad de corregir por efectos de relajación T₁.

En los casos en que el tiempo de eco es largo (135 ms y 144 ms), no es necesario adquirir los espectros de los metabolitos aspartato, glucosa, taurina, GABA y GPC, ya que su detección en estudios *in vivo* es poco común.

2.3.1 Philips Gyroscan Intera 1T

El tiempo de eco utilizado para la adquisición de datos fue de 144 ms únicamente, ya que es el único utilizado en pacientes en el centro de diagnóstico donde se encuentra este equipo.

Cada maniquí se centró en la antena para cabeza, procurando que todos quedaran en la misma posición. Se ubicó en el centro del maniquí un voxel cúbico con longitud de 40 mm en cada lado, previa adquisición de imágenes de localización en los 3 planos principales.

Para cada metabolito se adquirió un espectro con supresión de agua y uno sin supresión de agua en el mismo voxel. El ancho de banda (*bandwidth*) fue de 1000 Hz (23.5 ppm). La secuencia para adquirir el espectro con supresión de agua incluye un proceso para homogeneizar el campo, conocido por su nombre en inglés, *shimming*. Se realizan 128 promedios en esta secuencia para reducir el ruido.

El espectro adquirido sin supresión de agua posee mayor proporción señal ruido debido a la abundancia de esta molécula, por lo tanto se reduce la cantidad de promedios a 16 para disminuir el tiempo de adquisición. En este caso el *shimming* es completamente automático. Los tiempos de adquisición se muestran en la Tabla 2.4.

Proceso	Tiempos de Adquisición
* <i>Shimming</i>	10 min a 15 min
Espectro con supresión de agua	23 min 53 s
Espectro sin supresión de agua	3 min 16 s

Tabla 2.4 Tiempos de adquisición para los espectros en el Resonador Philips Intera

1T. **Shimming* realizado antes de cada espectro.

2.3.2 GE Signa 3T

Se adquirieron los espectros de los maniqués necesarios para generar dos conjuntos base con tiempos de eco de 35 ms y 144 ms. Los maniqués se colocaron al centro de la antena de 8 canales para cabeza (8HRBRAIN) y previa

adquisición de imágenes de localización se centró un voxel de 30 mm x 20 mm x 20 mm, con el eje más largo ubicado en el plano indicado como anteroposterior.

Para cada metabolito en cada TE se adquirió un solo espectro. El ancho de banda (*bandwidth*) fue de 2000 Hz (15.7 ppm). La secuencia para adquirir el espectro incluye un *shimming* automático previo a cada espectro adquirido. Los tiempos de adquisición se muestran en la tabla 2.5.

Proceso	Tiempos de Adquisición
*Shimming	< 1 min
Espectro	23 min 53 s

Tabla 2.5 Tiempos de adquisición para los espectros en el Resonador GE Signa 3T.

*Shimming realizado antes de cada espectro. En este equipo no se realiza una secuencia sin supresión de agua, ya que se realiza de forma automática antes de la adquisición final y se incluye en el archivo final.

2.4 Transferencia de Datos

El análisis de los datos y la construcción de los Conjuntos Base se realizan a partir de los datos obtenidos directamente por el resonador, comúnmente conocidos como datos en crudo (en inglés *raw data*). Estos archivos se deben guardar, transferir y finalmente, procesar utilizando las utilerías del software LCModel. Para que el software pueda interpretarlos se recomienda se guarden en formatos específicos.

El software LCModel se encuentra instalado con su respectiva licencia en una estación de trabajo Silicon Graphics Octane con sistema operativo IRIX64 en el Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla, Querétaro.

2.4.1 Philips Gyroscan Intera 1T

Los archivos que contienen los datos para procesar se deben exportar a una máquina externa desde la consola con la utilidad para ver y manejar datos de espectroscopia. Para cada espectro adquirido se producen dos archivos con las extensiones .sdat o .SDAT y .spar o .SPAR respectivamente. El primer tipo contiene los datos y el segundo los parámetros de adquisición. Para cada maniquí y tiempo de eco, se deben tener entonces 4 archivos: dos correspondientes al espectro adquirido con supresión de agua y los dos respectivos al espectro obtenido sin supresión de agua, necesario para hacer las correcciones necesarias en el postprocesamiento.

Los datos se exportaron a una PC conectada en red con la consola del equipo y se transfirieron mediante un disco compacto a la estación de trabajo descrita.

2.4.2 GE Signa 3T

Produce los datos más cómodos para procesar, pues no es necesario adquirir un espectro por separado sin supresión de agua. Los archivos probe-P que tienen

la forma Pnnnnn.7 son los más completos en cuanto a información de los parámetros utilizados durante la adquisición de los datos. Estos archivos generalmente se almacenan en la carpeta /usr/g/mrrow y el nombre es asignado por la máquina. Arriba nnnnn representa un número de 5 dígitos que generalmente aumenta en razón de 1024 o 2048 y pueden llegar a sobrescribirse, por lo que es importante hacer un respaldo de aquéllos de interés para un postproceso o análisis. Lo más conveniente es copiar los archivos deseados a otra carpeta en la misma consola, para después transferirlos a un medio de almacenamiento transportable o por red. En particular, los datos de los maniquís se exportaron a la consola del sistema IFIS para grabarlos en un disco compacto (CD).

2.5 LCModel

El paquete LCModel utilizado, versión 6.1-0, incluye un comando denominado *makebasis* cuyo objetivo final es producir un archivo con extensión .basis que es utilizado por LCModel para analizar los espectros de estudios *in vivo*. Este archivo .basis es el Conjunto Base en formato que LCModel es capaz de utilizar.

La rutina *makebasis* hace lo siguiente:

- Corrige todos los espectros de los metabolitos considerados para elaborar el Conjunto Base, de modo que el pico de la referencia DSS (se ajusta a 0.0 ppm) coincida en todos ellos.

- *Autophasing*, que corresponde a una corrección de la fase de la señal adquirida de todos los metabolitos.
- Escala los espectros de los metabolitos unos con otros a partir del pico del formato de sodio (ubicado entre 8.54 ppm y 8.34 ppm).
- Produce un archivo .ps donde se grafican los espectros de los metabolitos considerados.
- Produce el archivo .basis para ser utilizado por LCModel

Para ejecutar *makebasis* es necesario un archivo con extensión .in que contiene los parámetros de adquisición, parámetros de control del proceso y las rutas de acceso a los datos de los espectros adquiridos para cada metabolito que se incluya en el Conjunto Base. Entre los parámetros más importantes se encuentran la secuencia de localización (PRESS), tiempo de eco utilizado, magnitud del campo magnético principal, nombre que llevará el archivo.basis producido y las concentraciones de cada metabolito y las sustancias de referencia.

El nombre de cada Conjunto Base tiene ciertas reglas para su identificación. El nombre debe iniciar con el nombre del fabricante del equipo de RM, incluye la secuencia de localización y el tiempo de eco utilizados, cada uno de estos datos separados por guión bajo. Un ejemplo es el nombre del archivo producido para el Conjunto Base adquirido en el resonador de 3 T,

ge_press_te144_3t.basis

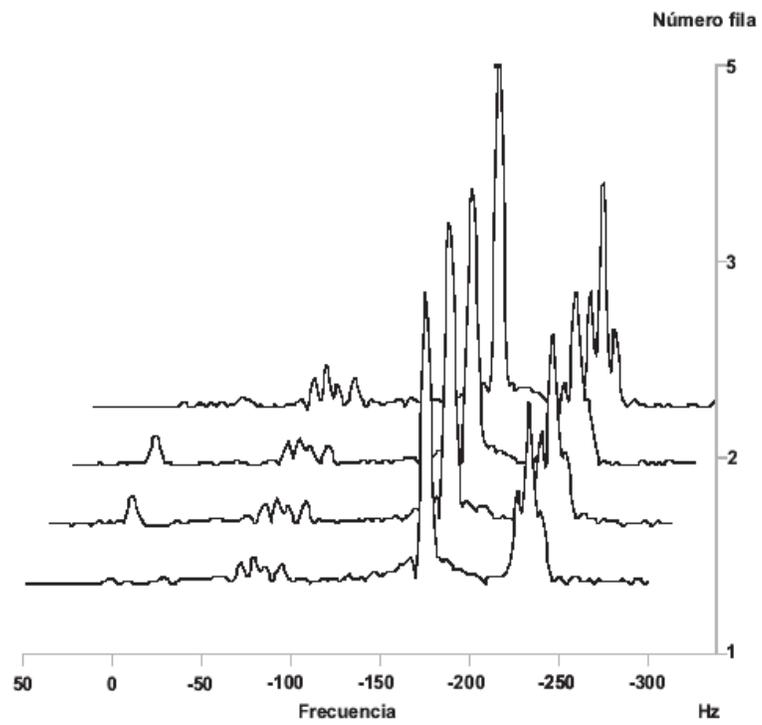
El archivo postscript generado por la rutina *makebasis* permite evaluar el FWHM de los picos principales de los metabolitos NAA, Cr, PCh y GPC. El promedio de estos valores determina el FWHM del Conjunto Base y es una forma de evaluar su calidad.

Para generar cada Conjunto Base, se deben hacer las correcciones por las *eddy currents* en cada espectro considerado para formar parte del Conjunto Base y evaluar la resolución (FWHM) de los picos principales de NAA, Cr, PCh y/o GPC.

2.6 Conservación de NAA

Para evaluar la conservación de la solución del NAA después de 14 meses de estar conservada en refrigeración, se adquirió un espectro en el Resonador Magnético Signa 3T (GE Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin, E.U.A.), con TE de 144 ms y TR de 10 000 ms, y se comparó con el obtenido inicialmente.

CAPITULO 3



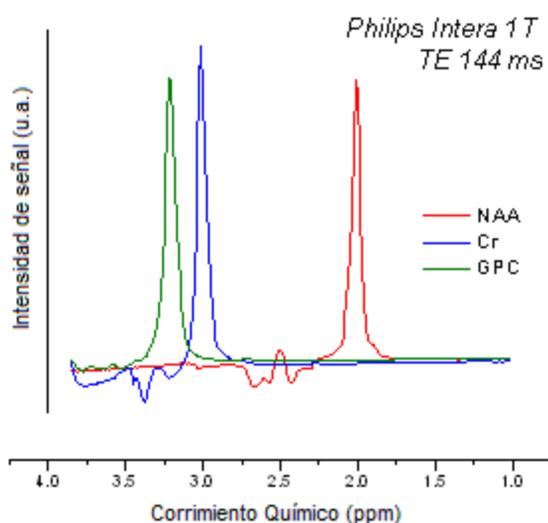
RESULTADOS

3.1 Datos de ERM de Maniquís

Se construyeron conjuntos base para el análisis y cuantificación de estudios de ERM de ^1H *in vivo*. Los conjuntos base se adquirieron en 2 equipos distintos de RM; en uno de ellos se utilizó dos tiempos de eco, resultando en un total de 3 conjuntos base.

Se muestran los espectros de los metabolitos NAA, Cr y GPC o PCh de los 3 conjuntos base, que representan los picos de mayor intensidad en los estudios de ERM de ^1H en el cerebro humano. Se presentan los valores del FWHM, a fin de tener una medida de su calidad.

3.1.1 Philips Intera 1T



Metabolito	FWHM (ppm)
NAA	0.0600
Cr	0.0575
GPC	0.025
Promedio	0.0475

Fig 3.1 Espectros de los metabolitos NAA, Cr y GPC obtenidos para el Conjunto Base en un equipo Philips Intera 1T con TE de 144 ms y los valores de su FWHM.

3.1.2 GE Signa 3T

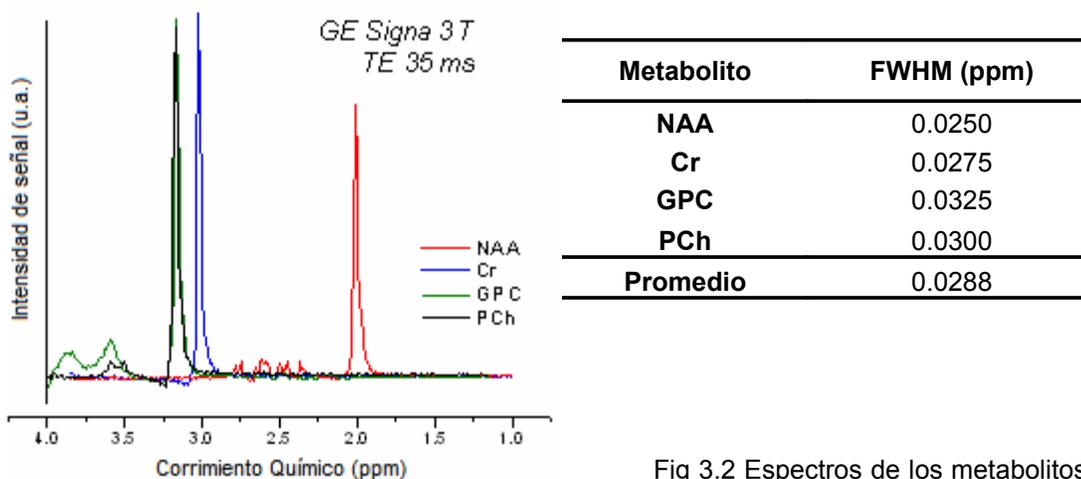


Fig 3.2 Espectros de los metabolitos

NAA, Cr, GPC y PCh obtenidos para el Conjunto Base en un equipo GE Sygna 3.0 T con TE de 35ms y los valores de su FWHM.

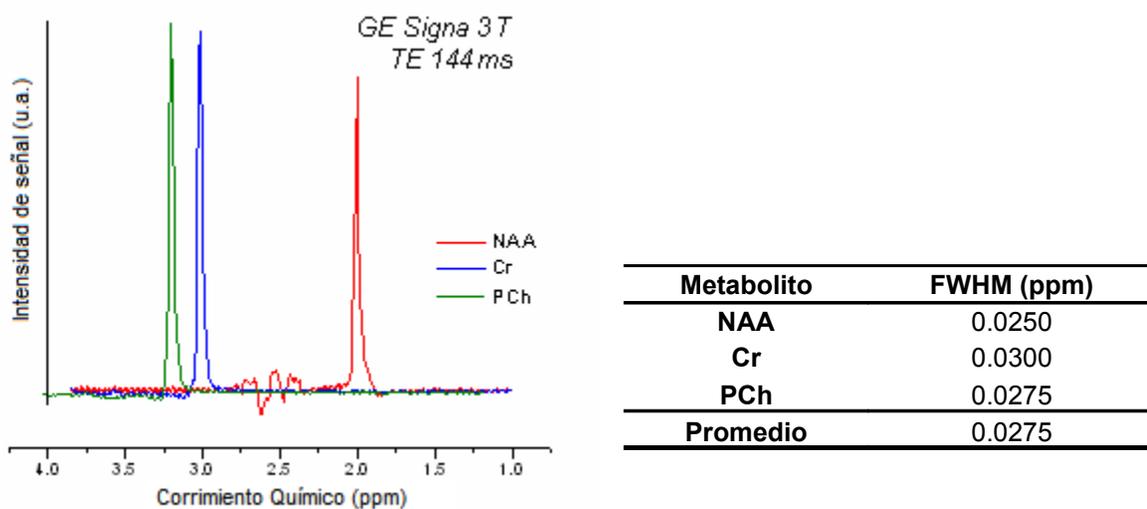


Fig 3.3 Espectros de los metabolitos NAA, Cr, GPC y PCh obtenidos para el Conjunto Base en un equipo GE Sygna 3.0 T con TE de 144ms y los valores de su FWHM.

El promedio del FWHM en el equipo de 1 T fue de 0.0475 ppm, menor de 0.06 ppm, que es la resolución espectral mínima permitida para un conjunto base en un

equipo de 1 T. De igual forma, el conjunto base del equipo de 3 T tiene un FWHM promedio de 0.0275 ppm, menor del límite recomendado de 0.03 ppm para 3 T..

El resultado más importante se ve en la aplicación de estos conjuntos base a casos prácticos. Por ello se analizaron datos de dos proyectos distintos, uno en cada uno de los equipos utilizados. Se estudiaron espectros de pacientes con epilepsia de lóbulo temporal (ELT) con crisis de ansiedad contra un grupo de sujetos control en el equipo de 1 T. También se cuantificaron y compararon espectros de pacientes que dieron positivo a la prueba genética de la enfermedad de Huntington (EH), tanto asintomáticos como sintomáticos, y de sujetos sanos pareados en edad. Los resultados de estos estudios se muestran en los anexos 1 y 2.

3.2 Secuencias Estandarizadas para el Análisis Cuantitativo de ERM de ^1H

Para cuantificar estudios de ERM de ^1H in vivo, se deben adquirir bajo ciertas condiciones y transferir los datos en crudo, tal como se describió en el capítulo de métodos. Se describen los requerimientos que deben cumplir los estudios de ERM de ^1H en cada uno de los centros participantes, para su cuantificación con el software LCModel, utilizando los conjuntos base elaborados.

3.2.1 Philips Gyroscan Intera 1T

Es necesario adquirir dos espectros, uno con supresión de agua y otro idéntico pero sin supresión de agua. Deben ser secuencias PRESS con TE de 144 ms, se recomiendan TR mayor o igual a 2000 ms y método de supresión de agua “exc” pero no son obligatorios. El volumen del voxel no está restringido pero debe tomarse en cuenta que mientras más pequeño sea, menor señal se adquiere y hay mayor interferencia del ruido. Cuando se obtiene el espectro sin supresión de agua, la preparación del equipo debe realizarse como si fuera un estudio de “otros núcleos”, de otro modo el equipo no finaliza la calibración y no permite adquirir el estudio sin supresión de agua. Los datos se deben exportar fuera de la consola del equipo de RM en forma de archivos SPAR y SDAT. Los nombres de estos archivos deben tener el mismo nombre para cada espectro y se recomienda hacer referencia en él, al par que contiene los datos sin supresión de agua. De esta forma se producen los 4 archivos necesarios para cuantificar el espectro obtenido, dos que corresponden al espectro con supresión (uno con extensión SPAR y otro SDAT) y dos que corresponden al espectro sin supresión (SPAR y SDAT). Estos archivos deben ser transferidos a la estación de trabajo que cuenta con el software LCModel, y cuantificarse con el conjunto base llamado

philips_press_te144_1t.basis

3.2.2 GE Signa 3T

Sólo se requiere adquirir un espectro por cada estudio que se desee cuantificar. Deben utilizarse secuencias PRESS con TE de 35 ms o 144 ms. El volumen del voxel no está restringido pero debe tomarse en cuenta que mientras más pequeño sea, menor señal se adquiere y hay mayor interferencia del ruido. Los equipos de 3 T proporcionan mayor señal, lo que se puede aprovechar para utilizar voxeles pequeños, incluso del orden de 1 cm³. Los datos crudos se guardan en forma de archivos Pxxxxx.7, donde xxxxx se sustituye por un número generado secuencialmente en pasos de 1024, por lo que se recomienda su pronta exportación fuera de la consola del equipo de RM para evitar se sobrescriban. No se recomienda cambiar el nombre a los archivos, ya que son reconocidos de esta manera por el software LCModel; lo más conveniente es llevar registro aparte de cada espectro adquirido. Estos archivos deben ser transferidos a la estación de trabajo que cuenta con el software LCModel, y ser cuantificados con el conjunto base que le corresponda según el TE utilizado,

ge_press_te144_3t.basis, ó

ge_press_te35_3t.basis

3.3 Conservación de NAA

El espectro obtenido inicialmente y el obtenido 14 meses después, fueron analizados con el conjunto base elaborado para el equipo de RM de 3 T. Se compararon cualitativamente las gráficas de los espectros y cuantitativamente, las concentraciones y el FWHM.

Al colocar el matraz a contraluz, se puede observar que la solución que contiene al NAA conserva su aspecto traslucido, claro, pero con algunos cuerpos blancos de tamaño pequeño que se observan al prestar la suficiente atención. Las concentraciones reportadas por LCModel sugieren que la concentración decreció en un 2%, una diferencia pequeña, pero quizá debida a la decantación del NAA, disminuyendo ligeramente su concentración en la solución involucrada en el voxel de interés. El FWHM aumentó en un 90%, de 0.010 ppm a 0.019 ppm, una diferencia que sin embargo, lo mantiene debajo del límite recomendado de 0.03 ppm. Se aprecia que no hay diferencia significativa en los picos que constituyen el espectro, sugiriendo que la composición química se mantiene sin degradación. El cambio en el FWHM puede deberse a inhomogeneidades presentes en el campo magnético del equipo que no pueden ser corregidas por el proceso de *shimming*.

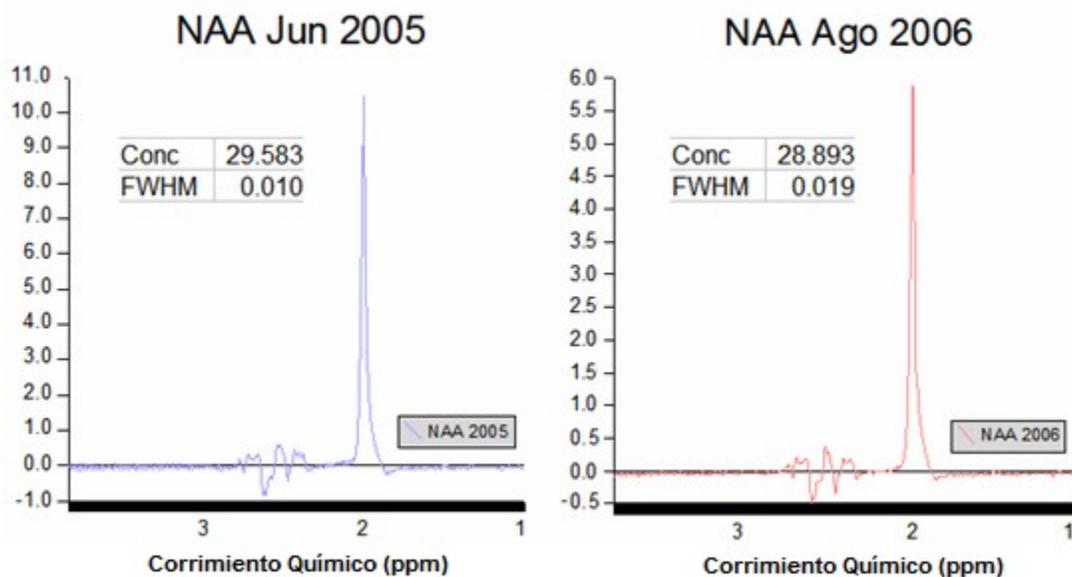


Fig. 3.4 Gráficas de los espectros de NAA obtenidas en el equipo de RM Signa 3 T con técnica PRESS, TR 10 000 ms y TE 144 ms. El espectro a la derecha fue adquirido 14 meses después que el que se presenta a la izquierda. Nótese las diferencias en la concentración y el FWHM. La forma del espectro se conserva.

CONCLUSIONES

Se establecieron los métodos para la cuantificación de estudios de ERM de ^1H en dos equipos de resonancia magnética. El primero, equipo de 1 T instalado en el Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla y el segundo, de 3 T instalado en el Instituto Nacional de Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Se construyeron tres conjuntos base que contienen cada uno la información de los metabolitos individuales, por ello, la cuantificación es posible en el primer equipo utilizando un tiempo de eco de 144 ms y en el segundo, de 35ms y 144ms, que corresponden a los estudios más comunes realizados en ambos centros de diagnóstico. Como era de esperarse, los espectros adquiridos de los maniquís fabricados, presentan mejor resolución en el equipo de 3 T, pero en ambos equipos la resolución está dentro de los límites deseables [15]. Los resultados de este trabajo brindan la posibilidad de cuantificar de manera robusta los estudios de ERM de ^1H a partir de datos adquiridos *in vitro* y la comparación de resultados entre distintos sujetos, potenciando la utilidad de la técnica al permitir estudios de grupos en los equipos de RM utilizados.

ANEXO 1

ERM a 1 T en Pacientes con Epilepsia de lóbulo Temporal

Epilepsia de Lóbulo Temporal

La epilepsia es una enfermedad crónica de causas diversas, caracterizada por crisis recurrentes debidas a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales, asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas. No todas las personas que padecen una crisis epiléptica se diagnostican como epilépticas. Se consideran epilépticos cuando padecen por lo menos dos convulsiones.

Las crisis epilépticas son las manifestaciones clínicas (síntomas y signos) de la actividad anormal, excesiva y/o hipersincrónica de las neuronas de la corteza cerebral. La crisis puede durar desde unos segundos hasta varios minutos. Hay más de 20 tipos diferentes de crisis epilépticas.

Los síntomas que experimenta una persona durante una crisis epiléptica dependen del lugar en el cerebro en el cual ocurre la alteración de la actividad eléctrica. Una persona que tiene una *crisis tonicoclónica* puede gritar, perder el sentido y desplomarse al piso, ponerse rígido y con espasmos musculares. Otro tipo de crisis epiléptica es la denominada *crisis parcial compleja*, en la que el paciente puede parecer confundido o aturdido y no podrá responder a preguntas ni instrucciones. Otras personas tienen ataques muy leves que ni siquiera son notados por otros. Algunas veces, la única manifestación de la crisis epiléptica es un parpadeo rápido o algunos segundos de mirada perdida con desconexión del medio; a este tipo de crisis epiléptica se lo denomina *ausencia* y es relativamente frecuente en la infancia.

La epilepsia puede tener muchas causas; en unos casos es debida a lesiones cerebrales de cualquier tipo (traumatismos craneales, secuelas de meningitis, tumores, etc.) pero en muchos casos no hay ninguna lesión, sino únicamente una predisposición de origen genético a padecer las crisis.

Aspectos Históricos

En antiguos textos mesopotámicos se describen ya sus síntomas típicos como enfermedad llamada *bennu*, en egipcio fénix, en referencia a la capacidad de esta ave de resucitar de sus cenizas o a los ciclos naturales, porque la epilepsia se consideraba una muerte recurrente. Se comprueba también que no era infrecuente: en el código de Hammurabi, cuerpo legislativo de la Babilonia del siglo

XVII a.C., se establece que, si se descubre que un esclavo adquirido recientemente sufre *bennu*, puede ser devuelto a su anterior propietario en el plazo de un mes.

El cuerpo de quien padece una crisis epiléptica parece no obedecer a su dueño, sino a voluntad ajena. De ahí que se relacionara con la deidad. Los seguidores de la religión tibetana *bon* tenían por elegidos a quienes la padecían, mientras que en la antigüedad judeocristiana se consideraba su padecimiento como un castigo divino o como obra de demonios.

El Evangelio de San Marcos (9, 4) incluye una descripción de la época que ilustra a la perfección una crisis epiléptica: "Maestro, te he traído a mi hijo, que tiene un espíritu mudo, y dondequiera que se apodera de él, le derriba y le hace echar espumarajos y rechinar los dientes y se queda rígido..." La pretendida curación consistía habitualmente en la expulsión del espíritu maligno mediante un poderoso exorcismo.

Pero no tardó en cuestionarse el origen sobrenatural de la epilepsia. En el siglo V a.C. Hipócrates observó en soldados y gladiadores que las heridas por traumatismo craneoencefálico se asociaban con cierta frecuencia a ataques epilépticos, desconcertantemente similares a los que observaba en sus propios pacientes.

Amígdala

Los núcleos amigdalinos (del griego *amygdala*, “almendra”), son un importante componente del sistema límbico, tienen forma de almendra y se localizan en la punta del lóbulo temporal bajo la corteza del uncus y rostrales al hipocampo y cuerno inferior del ventrículo lateral. Los experimentos de estimulación y ablación por lo general afectan estructuras neurales adyacentes. Las intrincadas conexiones neurales de la amígdala hacen difícil atribuir a ésta una conducta observada. Sin embargo, se notan algunas manifestaciones que ocurren después de la estimulación o ablación de la amígdala.

Después de la estimulación de la amígdala se observan cambios en el ritmo cardíaco, respiración, presión sanguínea y motilidad gástrica. Al parecer hay dos regiones en la amígdala que son antagonistas una con otra con respecto a la conducta emocional y alimentación. Las lesiones en el grupo nuclear corticomediale de la amígdala resultan en afagia, disminución del tono emocional, miedo, tristeza y agresión. En contraste, las lesiones del grupo nuclear basolateral producen hiperfagia, felicidad y reacciones placenteras. La estimulación del grupo nuclear basolateral de la amígdala se relaciona con miedo y huida. La estimulación del grupo nuclear corticomediale produce una reacción de defensa y agresividad. La conducta de ataque provocada por la estimulación amigdalina difiere de la inducida por la estimulación hipotalámica en su aparición y extinción gradual después de la aplicación y cese del estímulo. En contraste, la conducta de ataque provocada en el hipotálamo se inicia y extingue casi en forma inmediata después

de la aplicación y cese del estímulo. También resulta interesante el hecho de que la estimulación septal previa evita la aparición de la conducta agresiva causada tanto por la amígdala como por el hipotálamo.

La estimulación del grupo nuclear basolateral de la amígdala produce una respuesta de despertamiento similar a la que sigue a la estimulación del sistema reticular activador del tallo cerebral pero independiente de ésta. La respuesta amigdalina es independiente de la provocada por el sistema reticular activador, ya que puede ser producida después de lesiones a nivel de la formación reticular del tallo cerebral. En contraste, la estimulación del grupo nuclear corticomediale de la amígdala produce el efecto inverso (una disminución en el despertamiento y sueño). Sin embargo, el efecto total neto de la amígdala es facilitatorio, ya que la ablación de la amígdala produce un animal perezoso, hipoactivo, pacífico y manso. Dichos animales evitan la interacción social y pueden volverse aislados desde el punto de vista social.

Los experimentos en animales confirman la importancia de la amígdala en la organización de la conducta relacionada con miedo. La emoción bilateral de la amígdala inhibe las respuestas naturales de los animales en relación con el miedo. La estimulación eléctrica de la amígdala provoca una conducta defensiva o relacionada con miedo. Las proyecciones amigdaloides hacia el hipotálamo a través de la vía amigdalofugal ventral parecen ser esenciales para la conducta que se relaciona con miedo.

La estimulación de la amígdala durante una intervención quirúrgica cerebral en seres humanos se asocia con diversas reacciones autonómicas y emocionales y una sensación de miedo y ansiedad. Algunos de estos pacientes manifiestan una ilusión de reconocimiento similar a un recuerdo que se conoce como fenómeno de *déjà vu* (término francés que significa “ya visto”). El fenómeno de lo ya visto, así como ilusiones olfatorias y gustatorias, son experiencias frecuentes en los pacientes que sufren de crisis del lóbulo temporal.

En los seres humanos se ha usado la destrucción de ambas amígdalas para aliviar la epilepsia intratable y para el tratamiento de la conducta violenta. Dichos pacientes por lo general se vuelven complacientes y sedados y muestran cambios significativos en la conducta emocional.

Debe señalarse que muchas, si no todas, de estas funciones pueden observarse después de la estimulación o ablación de otras regiones cerebrales, en especial el hipotálamo y las regiones septales. Se propone que la amígdala desempeña un papel integrativo en todas estas funciones.

MÉTODOS

Se obtuvieron espectros de la amígdala cerebral de ambos hemisferios de 12 pacientes (edad promedio 34 años) del Hospital General de Querétaro con diagnóstico de Epilepsia de Lóbulo Temporal y similarmente, de 5 sujetos control (edad promedio 29 años). Los estudios se realizaron bajo consentimiento

informado en un Resonador Magnético Gyroscan Intera 1T (Philips Medical Systems, Best, Eindhoven, Holanda), instalado en el Instituto de Neurobiología de la UNAM.

- Criterios de exclusión:
 - Presencia de marcapasos
 - Padecer de claustrofobia
 - Padecer de otra enfermedad neurológica (infarto, tumor, etc.)
 - No autorización de la realización del estudio
 - No estar en condiciones de ser evaluado

- Secuencias realizadas:

Entre las secuencias realizadas se encuentran:

1. Localizador
2. T₁ axial
3. T₁ FFE 3D
4. T₂ coronal y sagital
5. Espectroscopia de ¹H con técnica univoxel con supresión de agua
6. Espectroscopia de ¹H univoxel sin supresión de agua

a) Tamaño del voxel (cm): 2 x 2 x 2

- b) PRESS con TE de 144 ms, TR 2000 ms
- c) Se guardaron los datos crudos para su análisis subsecuente por medio del programa LCModel utilizando la base de datos adquirida en este proyecto
- d) Regiones bajo estudio. Amígdala del lóbulo temporal de ambos hemisferios.

RESULTADOS

Dos pacientes y dos controles presentaron incomodidad al estudio por lo que no fue posible adquirir los espectros en ambos hemisferios, teniendo un total de 22 espectros de pacientes y 8 espectros de sujetos control.

De los 22 espectros de pacientes, sólo en 7 de ellos se pudieron cuantificar los metabolitos de interés (NAA+NAAG, Cr y GPC+PCh). En los 8 espectros de los sujetos control se pudieron cuantificar los metabolitos de interés.

Se compararon las concentraciones en unidades institucionales de NAA+NAAG, Cr y GPC+PCh. Los resultados se compararon usando una prueba t para grupos independientes. Sólo las diferencias con $p < 0.05$ fueron consideradas como significativas. Los grupos se clasificaron en pacientes (P) y controles (C).

La concentración de NAA+NAAG fue la única que presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambos grupos (fig A1.3), siendo menor en el grupo de pacientes.

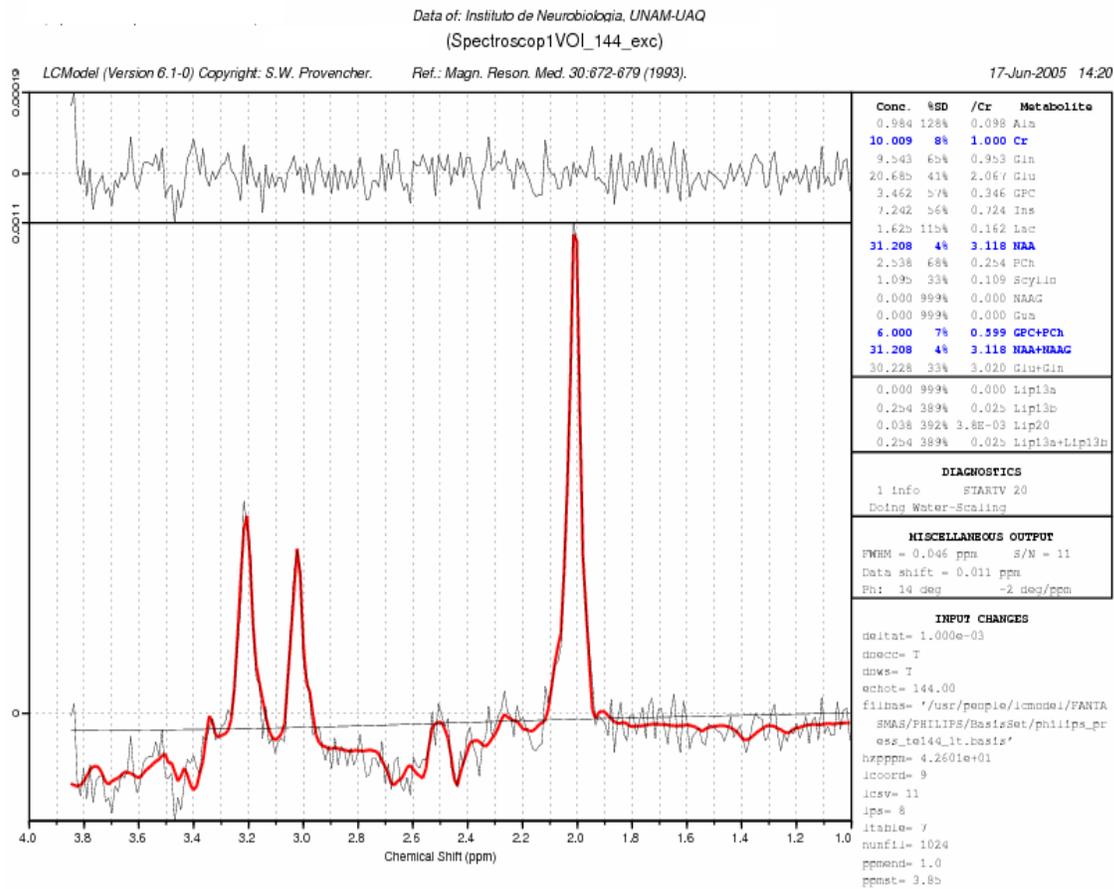


Fig. A1.1 Gráfica de un espectro de ^1H de la amígdala del lóbulo temporal izquierdo de un sujeto control, analizado con LCModel. Se muestra el espectro (negro) y el ajuste de la combinación lineal de los espectros que conforman el conjunto base (rojo). Derecha arriba, se muestran las concentraciones calculadas en unidades institucionales a partir del ajuste, la desviación estándar y la concentración relativa a la Creatina (Cr); en azul se muestran las concentraciones calculadas con una desviación estándar menor al 20%.

Protocolo Espectroscopia PELT (2005.06.07 22:08:23.15000) 8.0mL,
TE/TR/NS=144/2000/128 (Spectroscop1VOI_144_exc)

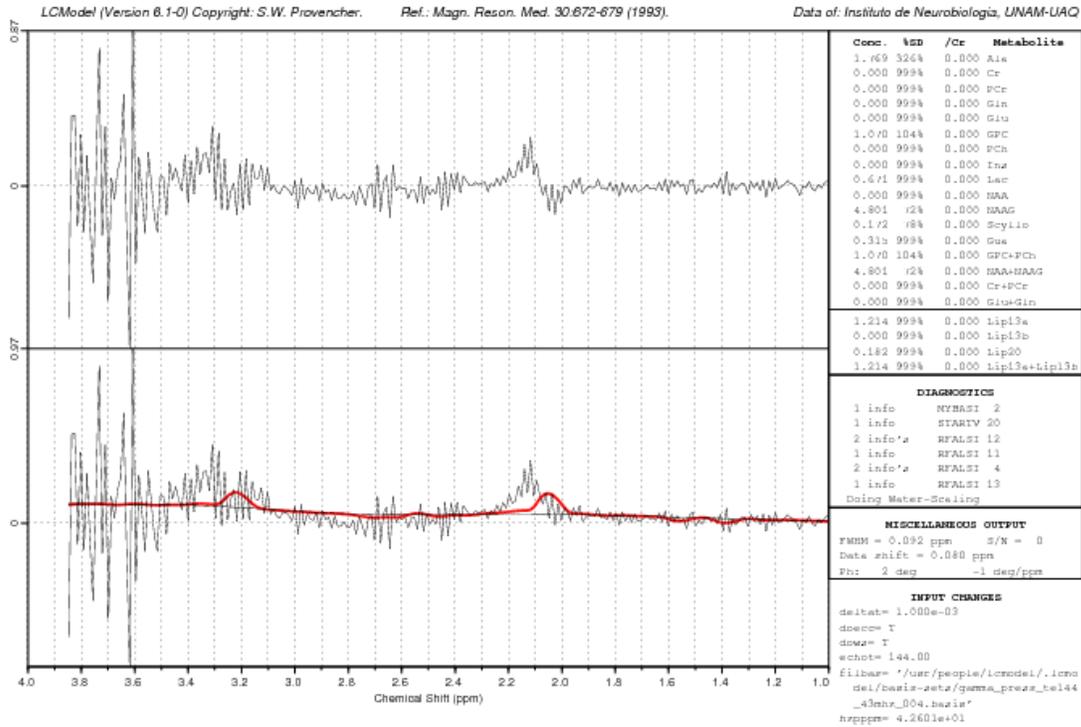


Fig. A1.2 Gráfica de un espectro de ^1H de la amígdala del lóbulo temporal izquierdo de un paciente con ELT, analizado con LCModel. Se muestra el espectro (negro) y el ajuste de la combinación lineal de los espectros que conforman el conjunto base (rojo). Derecha arriba, se muestran las concentraciones calculadas en unidades institucionales a partir del ajuste, que en este caso no es posible debido a la pobre razón señal-ruido, la desviación estándar y la concentración relativa a la Creatina (Cr).

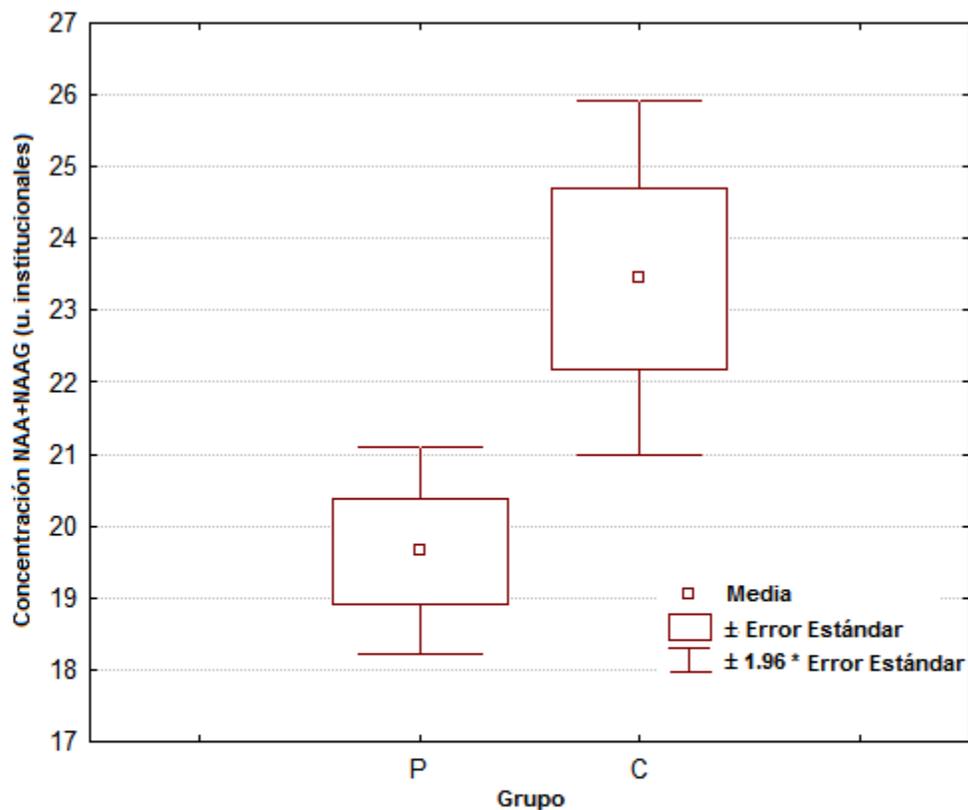


Fig
A1.3

Variable	Media P	Media C	Valor t	p
NAA+NAAG	19.65471	23.44600	-2.50214	0.026482
Cr	10.73614	9.83863	0.92880	0.369920
GPC+PCh	6.26714	6.54063	-0.48967	0.632530

Gráfica que muestra las concentraciones promedio de NAA+NAAG para cada grupo (P, grupo pacientes; C, grupo control). El grupo de pacientes presenta una concentración menor ($t = -2.5$, $p = 0.026 < 0.05$). La tabla muestra la media en cada grupo, valor t y el valor p para los metabolitos NAA+NAAG, Cr, GPC+PCh.

DISCUSIÓN

La baja calidad en la señal de los espectros se debe principalmente a que en la región de la amígdala coexisten líquido cefalorraquídeo, una concentración importante de lípidos y flujo sanguíneo, que en su conjunto producen variaciones de campo que distorsionan la señal. Es interesante notar que los espectros que no pudieron ser cuantificados, corresponden a estudios de los pacientes con ELT. Se ha reportado una disminución en el volumen del hipocampo en pacientes con ELT, lo que implicaría una menor proporción de tejido de interés en el volumen de estudio y con ello, disminución en la cantidad y calidad de la señal.

La disminución en la concentración de NAA+NAAG, refleja pérdida de función neuronal o bien pérdida neuronal. Estos resultados coinciden con la literatura actual y respaldan la relación directa entre los cambios de conducta producidos durante las crisis de ansiedad en pacientes con ELT y los cambios metabólicos encontrados en la región de la amígdala. Recientemente se ha correlacionado la disminución de la concentración de NAA con la densidad de GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), sustancia producida por astrocitos como respuesta a lesión neuronal. Lo que sugiere que en la Epilepsia de lóbulo temporal, la disminución de NAA se relaciona más con lesión o daño neuronal que con alteraciones directas en la densidad neuronal.

ANEXO 2

ERM de 'H a 3 T en Pacientes con Enfermedad de Huntington

Enfermedad de Huntington

En 1872 George Huntington, médico norteamericano, describió una enfermedad hereditaria caracterizada por fuertes movimientos involuntarios. Debido a que el nombre griego para danza es corea llamó a la enfermedad corea hereditaria. Para honrar su hallazgo esta enfermedad lleva su nombre, corea de Huntington. Sin embargo, cabe notar que la enfermedad no siempre presenta los movimientos coreiformes descritos por el doctor Huntington.

En 1963 dos neurólogos hicieron la siguiente anotación: "El uso deliberado del término enfermedad de Huntington en lugar de corea de Huntington puede servirnos como recordatorio de que existen otras formas además de la corea". Desde entonces, y con el fin de ser más precisos, la alteración se conoce como enfermedad de Huntington.

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurológica hereditaria. Los síntomas físicos pueden incluir movimientos involuntarios, gesticulaciones, pérdida del control del movimiento y alteraciones en la marcha. También se presentan cambios en la personalidad acompañados de fallas de memoria y deterioro de las capacidades intelectuales. En un inicio la enfermedad se manifiesta como espasmos musculares leves, falta de coordinación y algunas veces con cambios en la personalidad. A medida que la enfermedad progresa el deterioro intelectual produce alteraciones en el habla y la memoria.

La primera manifestación es una mueca facial transitoria, abriendo y cerrando la boca, elevación de la ceja, movimientos de la cabeza y de extensión y flexión de los dedos. Temprano en el curso de la enfermedad estos movimientos sugieren un tic nervioso que puede ser ocultado por amanerismo y al incorporarse actos casi intencionales. La EH progresa a disartria, disfagia, desviación cubital de la mano y movimientos alternados de extensión-pronación y flexión-supinación de los dedos. Más tarde en el curso de la enfermedad, la coreoatetosis, es el movimiento más constante, importantes muecas, meciendo, asintiendo y balanceando la cabeza. La marcha adquiere la apariencia de danza con irregulares sacudidas, inmovilidad de las piernas y el tronco. A pesar de lo pronunciado de la coreoatetosis, tiende a decrecer durante el día y a desaparecer durante el sueño. En estadios avanzados, los movimientos se vuelven lentos y adquieren características atetósicas o una franca distonía (rotación interna de los hombros, puños apretados, flexión de las rodillas e inversión del pie). Algunos pacientes manifiestan movimientos anormales de los ojos, como son alteraciones supranucleares de la mirada voluntaria,

nistagmo optoquinectico y un tercio de los pacientes presenta aumento del reflejo tendinoso profundo.

La corea puede estar ausente en la EH y los movimientos anormales consisten en temblores o mioclonus (forma rígido-akinética); alrededor de un octavo de los pacientes presentan parkinsonismo (variedad de Westphal), esta variante prevalece en pacientes con EH juvenil. Otra característica de esta variante es una herencia paterna, demencia temprana, mioclonus, temblor durante el curso de la enfermedad y corta duración de la enfermedad. A diferencia de los casos en adultos por arriba de un 50 % de la juvenil, presenta manifestaciones de convulsiones generalizadas.

Los trastornos de la deglución pueden ocasionar la muerte por broncoaspiración. El deterioro cognitivo inicia por lo general al mismo tiempo que los desórdenes del movimiento, pero no es obligatorio.

Manifestaciones cognitivas:

- Disminución en la velocidad de sistema psicomotor
- Disminución de la selección y para sostener la atención
- Disminución de la conducta de iniciativa, espontaneidad y compromiso
- Disminución del IQ con discrepancia del rendimiento verbal
- Disminución de la fluencia verbal y la producción verbal

- Falla de la memoria retroactiva, mejor reconocimiento

Las manifestaciones psiquiátricas más comunes son de orden afectivo. La depresión mayor relacionada con EH, se caracteriza por un sentimiento de minusvalía o de culpa, cambios en el patrón del sueño, apetito, ansiedad, pérdida de energía y de la libido, aunque en algunos casos se incrementa esta última. Otro trastorno psiquiátrico es la irritabilidad severa.

Un tercer síntoma es la apatía, que puede estar presente en cualquier periodo de la enfermedad. Pierden la habilidad para trabajar, conducir y su interrelación con los demás.

Con el tiempo, la pérdida de células nerviosas en varias regiones del cerebro hace que el paciente con enfermedad de Huntington presente mayor incapacidad y dificultad para valerse por sí mismo. Aun cuando la enfermedad no es mortal, la condición de debilidad del paciente produce complicaciones como neumonía, problemas cardíacos o infecciones que eventualmente llevan a la muerte.

La enfermedad de Huntington es difícil de diagnosticar. En ocasiones se confunde con otras enfermedades neurológicas. Los síntomas generalmente aparecen después de los 30 años y antes de los 45. Ocasionalmente los primeros síntomas aparecen en la infancia. Alrededor del 5 % al 10 % de los pacientes que sufren la EH padecen la forma juvenil, la cual comienza antes de los 20 años. Los hombres y mujeres de todos los grupos raciales se ven afectados de igual manera.

El gen de la EH está en el brazo corto de cromosoma 4 y resulta del incremento del número de repeticiones CAG en el gen de la huntingtina. Un gen mutado de origen paterno augura un comienzo más temprano, así como una evolución más rápidamente progresiva. El gen normal tiene 3 bases de DNA compuesta por la secuencia CAG. La mutación genética consiste en un segmento de DNA inestable, donde varios pares de bases se repiten docenas de veces. La expansión del trinucleótido repetido (CAG_n) origina la enfermedad de Huntington por su efecto sobre la expresión o estructura de la proteína codificada por el gen 1T15.

No de repeticiones CAG	Resultado
2-27	Resultado normal, no desarrollo de la EH
28-35	El individuo no desarrollará la EH, pero la generación siguiente tiene riesgo cuando el portador es varón.
36-39	Algunos, pero no todos, desarrollarán la EH. La siguiente generación también tiene riesgo.
>40	Desarrollarán la EH

Cuadro A2.1: número de repeticiones de CAG por el diagnóstico molecular de la enfermedad de Huntington.

Cada hijo de un padre con EH tiene una probabilidad del 50% de heredar la enfermedad independientemente de si sus hermanos o hermanas la hayan heredado. Si el hijo (a) no hereda el gen de sus padres entonces no tiene EH y por lo tanto no se la transmitirá a su descendencia. Si por el contrario la persona ha heredado el gen desarrollará la enfermedad tarde o temprano.

Se cree que en México existen alrededor de 8000 personas con enfermedad de Huntington. Las estadísticas exactas son difíciles de obtener no sólo porque en nuestro país no se cuenta con la infraestructura para llevar a cabo censos en este tipo de enfermedades, sino porque la enfermedad es difícil de diagnosticar y muchas personas optan por esconder a sus familiares con EH. Debido a que la enfermedad de Huntington es hereditaria y muchas veces se ha catalogado como una enfermedad mental, los familiares han negado su existencia a través de generaciones.

El estrés psicológico de una familia afectada por la enfermedad es enorme. En la actualidad los avances en la ciencia y tecnología médicas han hecho posible el diagnóstico predictivo de la EH mediante técnicas muy sofisticadas de biología molecular. Debido a que la enfermedad se manifiesta entre la 3ª o 4ª. década de la vida, por lo general, los portadores del gen han finalizado su etapa reproductiva.

Aún cuando se lleva a cabo investigación activa a nivel internacional y se ha logrado desarrollar la posibilidad de predecir la enfermedad, el tratamiento continúa siendo paliativo y la cura todavía no se ha descubierto.

Antecedentes

En estudios de neuropatología se han encontrado alteraciones neuroquímicas en la corteza cerebral en la enfermedad de Huntington. La ERM ha sido utilizada para medir alteraciones neuroquímicas en la EH *in vivo*. En particular, la ERM de ^1H ha sido útil para identificar alteraciones en distintos marcadores de estrés oxidativo. El lactato es producto de la glicolisis y se acumula cuando el

metabolismo oxidativo no se puede llevar a cabo por falta de los requerimientos energéticos. En algunos estudios, se ha encontrado que la concentración de lactato puede llegar a ser cuatro veces mayor en el estriado de individuos con la EH , aunque otro estudio no encontró diferencias en las concentraciones de lactato . El pico de lactato es pequeño y se puede sobreponer con otros picos de lípidos e incluso el ruido, por ello es un marcador difícil de seguir. Se han encontrado mayores concentraciones de colina en el estriado y regiones frontales de pacientes, lo que pudiera reflejar ruptura de membranas neuronales. Similarmente se han encontrado niveles menores de NAA en el estriado, reflejando una probable pérdida neuronal . Con la progresión de la enfermedad, se ha mostrado que los niveles de NAA decrecen de forma progresiva . En algunos estudios, también se ha encontrado reducción en los niveles de creatina y se han correlacionado con la escala motora del UHDRS (Unified Huntington's Disease Rating Scale) .

MÉTODOS

Se estudiaron 10 sujetos (edad promedio 45 años, 4 hombres) del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía con diagnósticos predictivo positivo (4 pacientes asintomáticos y 3 pacientes sintomáticos) y 3 individuos con diagnóstico negativo de la enfermedad de Huntington, por marcadores genéticos. Los estudios se realizaron bajo consentimiento informado en un Resonador Magnético Signa 3T (Excite II, GE Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin, E.U.A.), instalado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, Ciudad de México.

- Criterios de inclusión:
 - Negativo o positivo (sintomáticos y asintomáticos) a la prueba genética de la enfermedad de Huntington
 - Consentimiento de realización de estudio

- Criterios de exclusión:
 - Presencia de marcapasos
 - Padecer de claustrofobia
 - Padecer de otra enfermedad neurológica (infarto, tumor, etc.)
 - No estar en condiciones de ser evaluado

Secuencias realizadas

Entre las secuencias realizadas se encuentran:

1. Localizador
2. T₂ axial
3. FLAIR axial
4. SPGR 3D
5. Espectroscopía de ¹H con técnica univoxel,
 - a) Tamaño del voxel (cm): 2 x 2 x 2

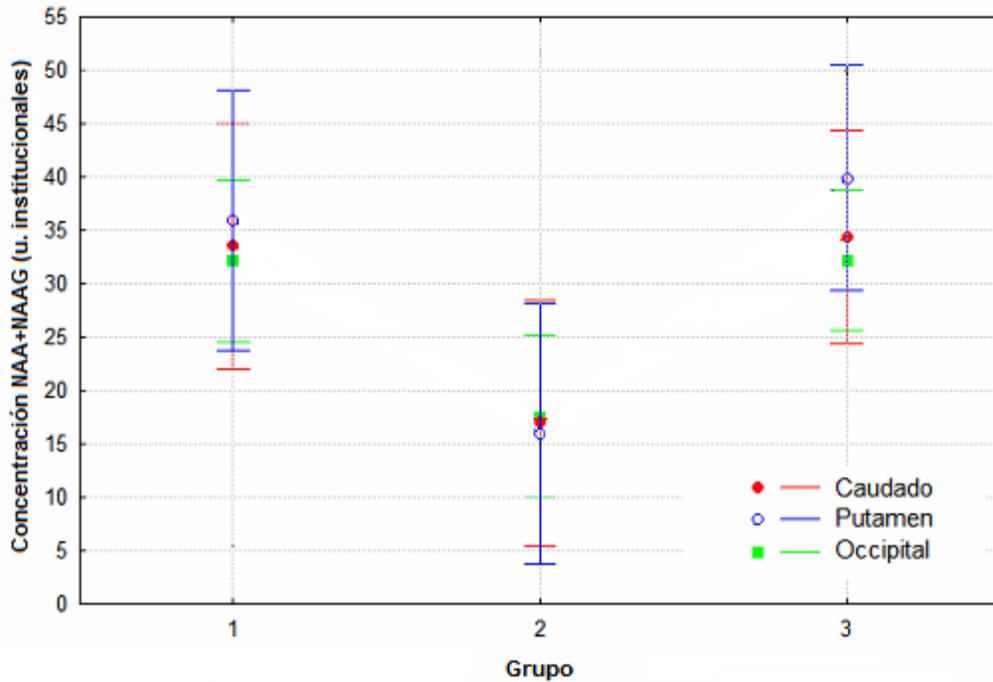
- b) PRESS con TE de 144 ms, TR 1500 ms
- c) Se guardaron los datos crudos para su análisis subsecuente por medio del programa LCModel utilizando la base de datos adquirida en este proyecto
- d) Regiones bajo estudio. Cabeza del núcleo caudado, putamen y corteza occipital, en el hemisferio izquierdo

RESULTADOS

Se compararon las concentraciones en unidades institucionales de Cr, Pch y NAA+NAAG, ya que fueron los únicos metabolitos que se detectaron con un intervalo de confianza mayor al 75 % en todos los pacientes. Los resultados se compararon usando un análisis de varianza con la prueba de Fisher para determinar la significancia estadística de las diferencias. Sólo las diferencias con $p < 0.05$ fueron consideradas como significativas. Los grupos se clasificaron en: Grupo 1, sujetos con resultado negativo a la prueba genética de EH, sujetos control; Grupo 2, sujetos con la prueba genética positiva a la EH y que presentan síntomas; Grupo 3, sujetos con la prueba genética positiva a la EH, que no presentan síntomas (asintomáticos).

Respecto a los dos grupos restantes, el grupo 2, pacientes sintomáticos, mostró concentraciones significativamente menores de Cr y NAA+NAAG en las tres regiones estudiadas (aprox. 50%, Fig. A2.1 y A2.2), y la concentración de PCh fue menor (aprox. 35%, Fig A2.3) únicamente en putamen. En el núcleo caudado,

la concentración de PCh fue menor en el grupo de pacientes sintomáticos al compararlo con el grupo de pacientes asintomáticos.



NAA+NAAG (caudado) Probabilidad pruebas post hoc				NAA+NAAG (putamen) Probabilidad pruebas post hoc				NAA+NAAG (occipital) Probabilidad pruebas post hoc			
Gpo	{1}	{2}	{3}	Gpo	{1}	{2}	{3}	Gpo	{1}	{2}	{3}
1	33.524	16.968	34.412	1	35.909	15.956	39.921	1	32.181	17.585	32.163
2		0.047735	0.894656	2		0.028724	0.573784	2		0.014723	0.996840
3	0.047735		0.030687	3	0.028724		0.009674	3	0.014723		0.010917
	0.894656	0.030687			0.573784	0.009674			0.996840	0.010917	

Fig. A2.1 Gráfica que muestra las concentraciones promedio de NAA+NAAG en cada una de las regiones estudiadas (caudado, en rojo; putamen en azul; L. occipital en verde) para cada grupo (Grupo 1, genéticamente negativos a EH ; Grupo 2, genéticamente positivos sintomáticos; Grupo 3, genéticamente positivos asintomáticos). Las barras denotan el intervalo de confianza (95 %). Las tablas muestran en rojo los valores donde $p < 0.05$, obtenidas mediante la prueba de Fisher. Se observa que las diferencias son significativas para el grupo de pacientes sintomáticos en las tres regiones al compararlas contra el grupo 1 y grupo 3. Entre los grupos 1 y 3, no se encuentran diferencias significativas.

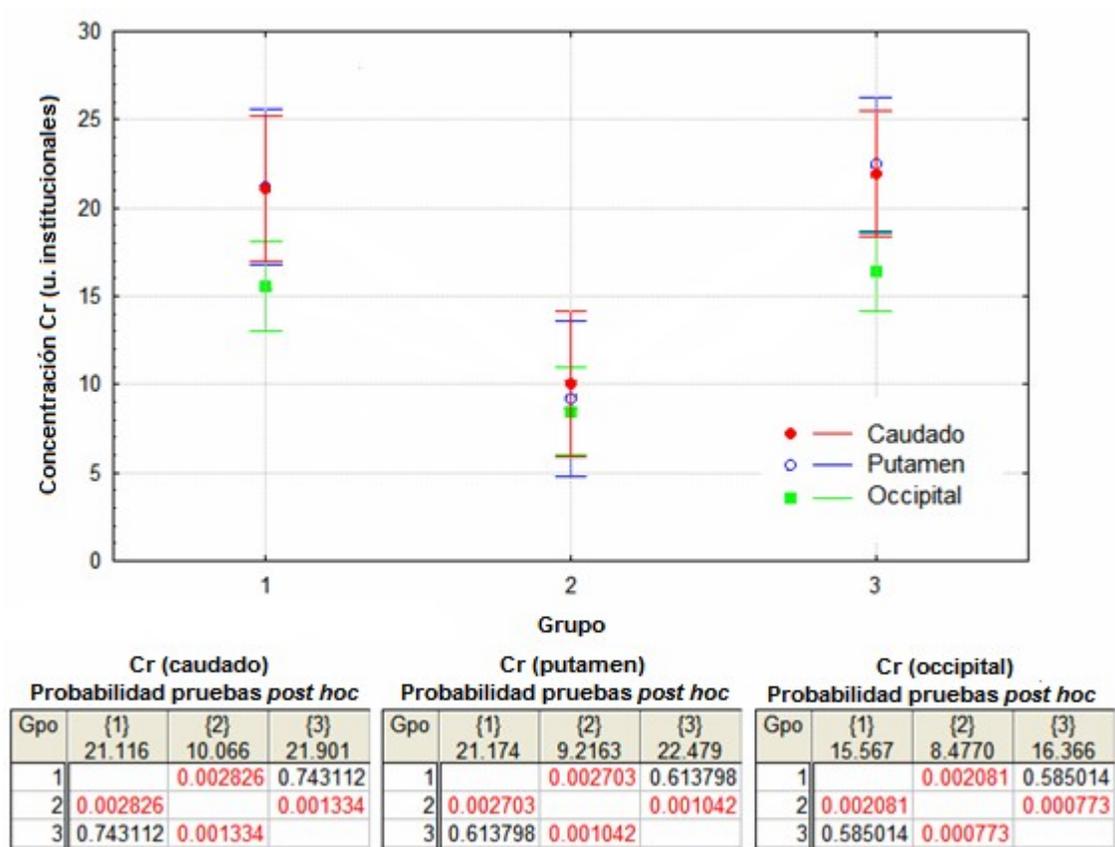
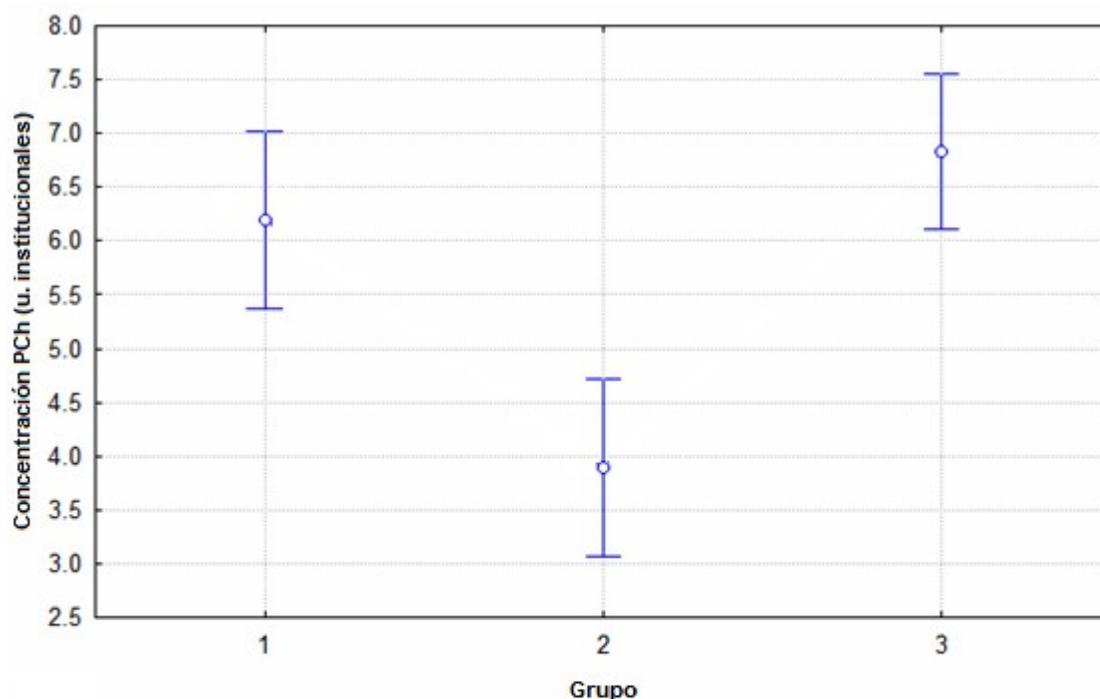


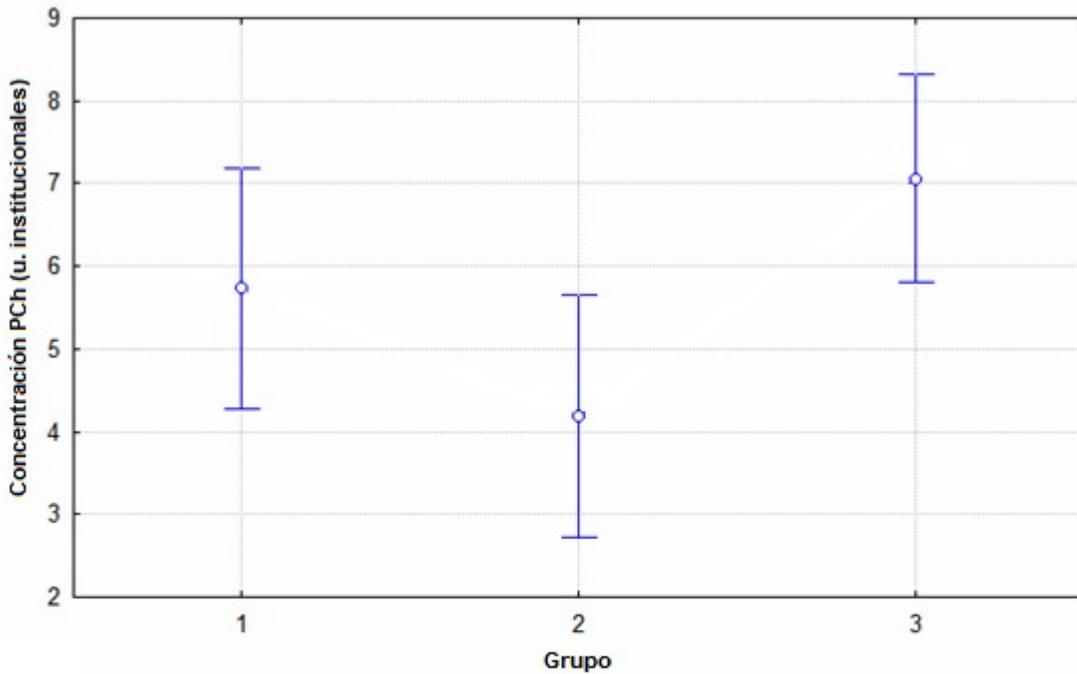
Fig. A2.2 Gráfica que muestra las concentraciones promedio de Cr en cada una de las regiones estudiadas (caudado, en rojo; putamen en azul; L. occipital en verde) para cada grupo (Grupo 1, genéticamente negativos a EH ; Grupo 2, genéticamente positivos sintomáticos; Grupo 3, genéticamente positivos asintomáticos). Las barras denotan el intervalo de confianza (95 %). Las tablas muestran en rojo los valores donde $p < 0.05$, obtenidas mediante la prueba de Fisher. Se observa que las diferencias son significativas para el grupo de pacientes sintomáticos en las tres regiones al compararlas contra el grupo 1 y grupo 3. Entre los grupos 1 y 3, no se encuentran diferencias significativas.



PCh (putamen)
Probabilidad pruebas *post hoc*

Gpo	{1}	{2}	{3}
	6.2020	3.8953	6.8305
1		0.002294	0.216113
2	0.002294		0.000385
3	0.216113	0.000385	

Fig. A2.3 Gráfica que muestra las concentraciones promedio de PCh en putamen para cada grupo (Grupo 1, genéticamente negativos a EH ; Grupo 2, genéticamente positivos sintomáticos; Grupo 3, genéticamente positivos asintomáticos). Las barras denotan el intervalo de confianza (95 %). La tabla muestran en rojo los valores de $p < 0.05$, obtenidas mediante la prueba de Fisher. Se observa que la diferencia es significativa para el grupo de pacientes sintomáticos. Entre los grupos 1 y 3, no se encuentran diferencias significativas. En el resto de las regiones no se encontró diferencia significativa entre los grupos.



PCh (caudado)
Probabilidad pruebas *post hoc*

Gpo	{1}	{2}	{3}
1	5.7357	4.1850	7.0648
2	0.118783		0.009620
3	0.147464	0.009620	

Fig. A2.4 Gráfica que muestra las concentraciones promedio de PCh en el núcleo caudado para cada grupo (Grupo 1, genéticamente negativos a EH ; Grupo 2, genéticamente positivos sintomáticos; Grupo 3, genéticamente positivos asintomáticos). Las barras denotan el intervalo de confianza (95 %). La tabla muestran en rojo los valores de $p < 0.05$, obtenidas mediante la prueba de Fisher. Se observa que la diferencia es significativa para el grupo de pacientes sintomáticos comparada con el grupo asintomático.

DISCUSIÓN

La disminución en la señal de NAA+NAAG en pacientes sintomáticos refleja daño neuronal en las tres regiones estudiadas y concuerda con la atrofia reportada en pacientes de la EH . La concentración de la Creatina, Cr, parece ser un marcador de la evolución de la enfermedad de Huntington, ya que únicamente se encontró alterada en los pacientes sintomáticos.

Es interesante observar la diferencia en los niveles de concentración de Pch en el núcleo caudado entre los pacientes sintomáticos y asintomáticos, reflejando los diferentes estadios de la EH. Este mismo comportamiento se vio con las concentraciones de NAA y Cr.

Es necesario hacer notar que la muestra fue pequeña y seguramente se obtendrán resultados más específicos al aumentar el número de pacientes. Un estudio longitudinal sería de gran interés para el entendimiento de la EH y para intentar correlacionar las concentraciones de Cr y PCh con la progresión de la enfermedad, así como para determinar si los cambios en NAA+NAAG son causa o consecuencia de los síntomas.

REFERENCIAS

1. Purcell, E.M., H.C. Torrey, and R.V. Pound, Resonance Absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys. Rev.*, 1946. 69: p. 37-38.
2. Bloch, F., W.W. Hansen, and M.E. Packard, Nuclear Induction. *Phys. Rev.*, 1946. 69: p. 127.
3. Bloch, F., Nuclear Induction. *Phys. Rev.*, 1946. 70: p. 460-473.
4. Bloch, F., W.W. Hansen, and M. Packard, The nuclear induction experiment. *Phys. Rev.*, 1946. 70: p. 474-485.
5. Damadian, R., Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science*, 1971. 171(976): p. 1151-3.
6. Banker, P., *Fundamental of Human Spectroscopy*. 1999.
7. Lenkinski, R., *MR Spectroscopy*. 1997. 163-174.
8. Radda, G.K., The use of NMR spectroscopy for the understanding of disease. *Science*, 1986. 233(4764): p. 640-5.
9. Ganong, W., *Fisiología Médica*. 1991: Ed. El Manual Moderno.
10. Haase, A., et al., ¹H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging. *Phys Med Biol*, 1985. 30(4): p. 341-4.
11. Govindaraju, V., K. Young, and A.A. Maudsley, Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed*, 2000. 13(3): p. 129-53.
12. Salibi, N.M. and M.A. Brown, *Clinical MR spectroscopy : first principles*. 1998, New York: Wiley-Liss. x, 220 p.
13. Provencher, S.W., Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med*, 1993. 30(6): p. 672-9.
14. Provencher, S.W., Automatic quantitation of localized in vivo ¹H spectra with LCModel. *NMR Biomed*, 2001. 14(4): p. 260-4.
15. Provencher, S.W., *LCModel and LCMgui User's Manual*. 2004: www.s-provencher.com.
16. Kreis, R., T. Ernst, and B.D. Ross, Absolute Quantitation of Water and Metabolites in the Human Brain. II. Metabolites Concentrations. *J Magn Reson*, 1993. Series B 102: p. 9-19.
17. Bottomley, P.A., Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo. *Ann NY Acad Sci*, 1990. 508: p. 333-348.
18. Ordidge, R.J., et al., Volume Selection for in vivo biological spectroscopy, in *Magnetic Resonance in Biology and Medicine*. 1985, Mc Graw-Hill: New Delhi. p. 387-397.
19. Frahm, J., et al., Localized high-resolution proton NMR spectroscopy using stimulated echoes: initial applications to human brain in vivo. *Magn Reson Med*, 1989. 9(1): p. 79-93.
20. Frahm, J., et al., Improvements in localized proton NMR spectroscopy of human brain: water suppression, short echo times, and 1ml resolution. *J Magn Reson*, 1990. 90: p. 464-473.
21. Hahn, E.L., Spin Echoes. *Phys. Rev.*, 1950. 80: p. 580-594.

22. Moonen, C.T.W. and P.C.M. van Zijl, Highly effective water suppression for in vivo proton NMR spectroscopy (DRYSTEAM). *J Magn Reson*, 1990. 88: p. 28-41.
23. De Graaf, R.A., *In vivo NMR spectroscopy : principles and techniques*. 1998, Chichester ; New York: John Wiley & Sons. xxi, 508 p.
24. Frahm, J., et al., Localized proton NMR spectroscopy in different regions of the human brain in vivo. Relaxation times and concentrations of cerebral metabolites. *Magn Reson Med*, 1989. 11(1): p. 47-63.
25. Hetherington, H.P., et al., Evaluation of cerebral gray and white matter metabolite differences by spectroscopic imaging at 4.1T. *Magn Reson Med*, 1994. 32(5): p. 565-71.
26. Petroff, O.A., R.K. Yu, and T. Ogino, High-resolution proton magnetic resonance analysis of human cerebrospinal fluid. *J Neurochem*, 1986. 47(4): p. 1270-6.
27. Pouwels, P.J. and J. Frahm, Regional metabolite concentrations in human brain as determined by quantitative localized proton MRS. *Magn Reson Med*, 1998. 39(1): p. 53-60.
28. Wang, Y. and S.J. Li, Differentiation of metabolic concentrations between gray matter and white matter of human brain by in vivo ¹H magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med*, 1998. 39(1): p. 28-33.
29. Birken, D.L. and W.H. Oldendorf, N-acetyl-L-aspartic acid: a literature review of a compound prominent in ¹H-NMR spectroscopic studies of brain. *Neurosci Biobehav Rev*, 1989. 13(1): p. 23-31.
30. Bruhn, H., et al., Cerebral metabolism in man after acute stroke: new observations using localized proton NMR spectroscopy. *Magn Reson Med*, 1989. 9(1): p. 126-31.
31. Gideon, P. and O. Henriksen, In vivo relaxation of N-acetyl-aspartate, creatine plus phosphocreatine, and choline containing compounds during the course of brain infarction: a proton MRS study. *Magn Reson Imaging*, 1992. 10(6): p. 983-8.
32. Arnold, D.L., et al., Proton magnetic resonance spectroscopy of human brain in vivo in the evaluation of multiple sclerosis: assessment of the load of disease. *Magn Reson Med*, 1990. 14(1): p. 154-9.
33. Kuzniecky, R., et al., Proton spectroscopic imaging at 4.1 tesla in patients with malformations of cortical development and epilepsy. *Neurology*, 1997. 48(4): p. 1018-24.
34. Kuzniecky, R., et al., Magnetic resonance spectroscopic imaging in temporal lobe epilepsy: neuronal dysfunction or cell loss? *Arch Neurol*, 2001. 58(12): p. 2048-53.
35. Wittsack, H.J., et al., Quantitative measurements with localized ¹H MR spectroscopy in children with Canavan's disease. *J Magn Reson Imaging*, 1996. 6(6): p. 889-93.
36. Barany, M. and T. Glonek, Identification of diseased states by phosphorus-31 NMR, in *Phosphorus-31 NMR. Principles and Applications*, D.G. Gorenstein, Editor. 1984, Academic Press: New York. p. 511-545.

37. Gadian, D.G., Nuclear magnetic resonance and its applications to living systems. Oxford science publications. 1982, Oxford New York: Clarendon Press ; Oxford University Press. x, 197 p., [5] p. of plates.
38. Gadian, D.G., et al., ³¹P NMR in living tissue: The road from a promising to an important tool in biology, in Biological Applications of Magnetic Resonance, R.G. Shulman, Editor. 1979, Academic Press: New York. p. 463-535.
39. Hollis, D.P., Phosphorus NMR of cells, tissues and organelles, in Biological Magnetic Resonance, L.J. Berliner and J. Reuben, Editors. 1980, Plenum Press: New York. p. 1-44.
40. Rudin, M. and A. Sauter, In vivo phosphorus-31 NMR: Potential and limitations, in NMR Basic Principles and Progress, P. Diehl, et al., Editors. 1992, Springer-Verlag: Berlin. p. 161-188.
41. Walliman, T., et al., Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.*, 1992. 281: p. 21-40.
42. Arus, C., C. Yen, and M. Barany, Proton nuclear magnetic resonance spectra of excised rat brain. Assignment of resonances. *Physiol Chem Phys Med NMR*, 1985. 17(1): p. 23-33.
43. Fan, T.W., et al., Combined use of ¹H-NMR and GC-MS for metabolite monitoring and in vivo ¹H-NMR assignments. *Biochim Biophys Acta*, 1986. 882(2): p. 154-67.
44. Petroff, O.A., et al., High-field proton magnetic resonance spectroscopy of human cerebrum obtained during surgery for epilepsy. *Neurology*, 1989. 39(9): p. 1197-202.
45. Behar, K.L. and T. Ogino, Assignment of resonance in the ¹H spectrum of rat brain by two-dimensional shift correlated and J-resolved NMR spectroscopy. *Magn Reson Med*, 1991. 17(2): p. 285-303.
46. Michaelis, T., et al., On the identification of cerebral metabolites in localized ¹H NMR spectra of human brain in vivo. *NMR Biomed*, 1991. 4(2): p. 90-8.
47. van Zijl, P.C. and C.T. Moonen, In situ changes in purine nucleotide and N-acetyl concentrations upon inducing global ischemia in cat brain. *Magn Reson Med*, 1993. 29(3): p. 381-5.
48. Cerdan, S., et al., ¹H NMR detection of cerebral myo-inositol. *FEBS Lett*, 1985. 187(1): p. 167-72.
49. Gullans, S.R., et al., Accumulation of major organic osmolytes in rat renal inner medulla in dehydration. *Am J Physiol*, 1988. 255(4 Pt 2): p. F626-34.
50. Renshaw, P.F., M.D. Schnall, and J.S. Leigh, Jr., In vivo ³¹P NMR spectroscopy of agonist-stimulated phosphatidylinositol metabolism in cat brain. *Magn Reson Med*, 1987. 4(3): p. 221-6.
51. Behar, K.L., et al., High-resolution ¹H nuclear magnetic resonance study of cerebral hypoxia in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. 80(16): p. 4945-8.

52. Fenstermacher, M.J. and P.A. Narayana, Serial proton magnetic resonance spectroscopy of ischemic brain injury in humans. *Invest Radiol*, 1990. 25(9): p. 1034-9.
53. Duijn, J.H., et al., Human brain infarction: proton MR spectroscopy. *Radiology*, 1992. 183(3): p. 711-8.
54. Bruhn, H., et al., Noninvasive differentiation of tumors with use of localized H-1 MR spectroscopy in vivo: initial experience in patients with cerebral tumors. *Radiology*, 1989. 172(2): p. 541-8.
55. Frahm, J., et al., Localized proton NMR spectroscopy of brain tumors using short-echo time STEAM sequences. *J Comput Assist Tomogr*, 1991. 15(6): p. 915-22.
56. Kugel, H., et al., Human brain tumors: spectral patterns detected with localized H-1 MR spectroscopy. *Radiology*, 1992. 183(3): p. 701-9.
57. Gyngell, M.L., et al., Cerebral glucose is detectable by localized proton NMR spectroscopy in normal rat brain in vivo. *Magn Reson Med*, 1991. 19(2): p. 489-95.
58. Merboldt, K.D., et al., Decrease of glucose in the human visual cortex during photic stimulation. *Magn Reson Med*, 1992. 25(1): p. 187-94.
59. Gruetter, R., et al., Detection and assignment of the glucose signal in 1H NMR difference spectra of the human brain. *Magn Reson Med*, 1992. 27(1): p. 183-8.
60. Chen, W., et al., Localized 1H NMR measurement of glucose consumption in the human brain during visual stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(21): p. 9896-900.
61. Petroff, O.A., T. Ogino, and J.R. Alger, High-resolution proton magnetic resonance spectroscopy of rabbit brain: regional metabolite levels and postmortem changes. *J Neurochem*, 1988. 51(1): p. 163-71.
62. de Graaf, A.A. and W.M. Bovee, Improved quantification of in vivo 1H NMR spectra by optimization of signal acquisition and processing and by incorporation of prior knowledge into the spectral fitting. *Magn Reson Med*, 1990. 15(2): p. 305-19.
63. Hiltunen, Y., et al., A lineshape fitting model for 1H NMR spectra of human blood plasma. *Magn Reson Med*, 1991. 21(2): p. 222-32.
64. Nelson, N., A novel method for the detection of receptors and membrane proteins by scintillation proximity radioassay. *Anal Biochem*, 1987. 165(2): p. 287-93.
65. Webb, S., D.J. Collins, and M.O. Leach, Quantitative magnetic resonance spectroscopy by optimized numerical curve fitting. *NMR Biomed*, 1992. 5(2): p. 87-94.
66. Bernasconi, N., J. Natsume, and A. Bernasconi, Progression in temporal lobe epilepsy: differential atrophy in mesial temporal structures. *Neurology*, 2005. 65(2): p. 223-8.
67. Goncalves Pereira, P.M., et al., MR volumetric analysis of the piriform cortex and cortical amygdala in drug-refractory temporal lobe epilepsy. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2005. 26(2): p. 319-32.
68. Li, L.M., et al., Lateralization of temporal lobe epilepsy (TLE) and discrimination of TLE from extra-TLE using pattern analysis of magnetic

- resonance spectroscopic and volumetric data. *Epilepsia*, 2000. 41(7): p. 832-42.
69. Vainio, P., et al., Reduced N-acetylaspartate concentration in temporal lobe epilepsy by quantitative 1H MRS in vivo. *Neuroreport*, 1994. 5(14): p. 1733-6.
 70. Duc, C.O., et al., Quantitative 1H MRS in the evaluation of mesial temporal lobe epilepsy in vivo. *Magn Reson Imaging*, 1998. 16(8): p. 969-79.
 71. Kikuchi, S., et al., A study of the relationship between the seizure focus and 1H-MRS in temporal lobe epilepsy and frontal lobe epilepsy. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2000. 54(4): p. 455-9.
 72. He, H., T. Shen, and X. Chen, [Comparison of (1)H MRS, PET and EEG in lateralization of temporal lobe epilepsy]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2001. 81(20): p. 1242-5.
 73. Kantarci, K., et al., Comparative diagnostic utility of 1H MRS and DWI in evaluation of temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 2002. 58(12): p. 1745-53.
 74. He, H.J., et al., [Prognostic value of MRI and 1H MRS in patients with temporal lobe epilepsy]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2003. 83(18): p. 1586-91.
 75. Duzel, E., et al., Measures of hippocampal volumes, diffusion and 1H MRS metabolic abnormalities in temporal lobe epilepsy provide partially complementary information. *Eur J Neurol*, 2004. 11(3): p. 195-205.
 76. Hetherington, H.P., et al., 1H and 31P spectroscopic imaging of epilepsy: spectroscopic and histologic correlations. *Epilepsia*, 2004. 45 Suppl 4: p. 17-23.
 77. Eng, L.F., R.S. Ghirnikar, and Y.L. Lee, Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*, 2000. 25(9-10): p. 1439-51.
 78. Jenkins, B.G., et al., 1H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers. *Neurology*, 1998. 50(5): p. 1357-65.
 79. Koroshetz, W.J., et al., Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10. *Ann Neurol*, 1997. 41(2): p. 160-5.
 80. Hoang, T.Q., et al., Quantitative proton-decoupled 31P MRS and 1H MRS in the evaluation of Huntington's and Parkinson's diseases. *Neurology*, 1998. 50(4): p. 1033-40.
 81. Ferrante, R.J., et al., Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*, 2000. 20(12): p. 4389-97.
 82. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*, 1993. 72(6): p. 971-83.
 83. Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. Huntington Study Group. *Mov Disord*, 1996. 11(2): p. 136-42.
 84. Rosas, H.D., et al., Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology*, 2003. 60(10): p. 1615-20.