



UNSAM
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN
ESCUELA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

ESCUELA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Tesis de Licenciatura en Diagnóstico por Imágenes

*“Cuantificación y análisis de la distribución espacial del radiotrazador
 ^{18}F -DOPA en sujetos con enfermedad de Parkinson mediante el uso de imágenes
cerebrales multimodales”*

Estudiante: Tec. Analía Paola Martino

Director: Dr. Federico Biafore

Codirector: Lic. Leandro Urrutia

Lugar de trabajo: ECyT, UNSAM

Jurado:

1. Dr. David Huanambal
2. Dra. Natalia Inés González
3. Lic. Marcelo Ruffolo

Mayo de 2017

Índice

➤ Índice	3
➤ Resumen	4
➤ Objetivos	7
1. Enfermedad de Parkinson	9
1.1 Introducción	9
1.2 Fisiología y Fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson	9
1.3 Síntomas	12
1.4 Causas de la Enfermedad	14
1.5 Diagnóstico	14
1.6 Tratamiento de la Enfermedad de Parkinson	16
2. ¹⁸ F-fluorodopa y el sistema dopaminérgico	18
2.1 Introducción	18
2.2 Dopamina y FDOPA	19
2.3 Imágenes Cerebrales con FDOPA. Cuantificación	21
3. Metodología	23
3.1 Sujetos Analizados	23
3.2 Protocolo de adquisición de imágenes FDOPA. PET/TC/RM	25
3.3 Procesamiento de las imágenes PET y RM	26
3.4 Corrección por efecto de volumen parcial	30
3.5 Análisis Estadístico	33
4. Resultados	34
4.1 Introducción	34
4.2 Índices relativos de cuantificación de estudios con FDOPA	34
4.3 Corrección de efecto de volumen parcial (EVP)	42
5. Conclusiones	47
➤ Bibliografía	49
➤ Apéndice N°1	52

Resumen

En el presente trabajo de tesis se evaluaron diferentes indicadores cuantitativos así como la distribución espacial del radiotrazador ^{18}F -DOPA en putámenes y caudados en individuos con Enfermedad de Parkinson (EP) y sujetos control, utilizando técnicas avanzadas de segmentación de imágenes multimodales (PET/TC y RM). El método de trabajo propuesto permite minimizar diversas fuentes de error operador-dependiente al evitar la necesidad de definir las regiones de interés de manera manual.

Para ambas estructuras anatómicas se evaluaron indicadores como la captación promedio, máxima, la diferencia entre la captación máxima y mínima, así como la captación en sectores específicos gracias al análisis de la distribución espacial del radiotrazador. Todos los indicadores cuantitativos propuestos generaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Los índices obtenidos a partir de los putámenes son los que presentaron mayor significación estadística.

El análisis realizado de las curvas de distribución espacial de la ^{18}F -DOPA permite diferenciar específicamente los sectores más afectados en cada estructura.

Se abordó el problema de la corrección del Efecto de Volumen Parcial (EVP) en la cuantificación estriatal de ^{18}F -DOPA. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios por una segmentación inapropiada de los putámenes.

El método propuesto de análisis y cuantificación puede aplicarse en la práctica clínica diaria otorgándole al profesional médico mayor información para realizar un diagnóstico, seguimiento y analizar el impacto de terapias farmacológicas.

Agradecimientos

Quiero agradecer el haber hecho posible la realización de esta tesis, a la Dra. María Bastianello del Instituto CEMIC y a la Escuela de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de San Martín.

A mi director de tesis el Profesor Federico Biafore, por la dedicación y paciencia durante el tiempo que llevó este trabajo, además de todos los conocimientos que supo enseñarme.

A mis padres por sus sacrificios para poder formarme en esta profesión, a mis hermanas por todo su infinito amor, en especial a mi hermana María Inés que supo aportar sus conocimientos en programación.

A mi esposo Diego, por su amor incondicional, apoyo constante y que me brindó sus conocimientos en medicina siendo el gran motor para motivarme a obtener mi título. A mis hijos Fabrizio y Thiago, que me enseñaron a nunca darme por vencida.

A mis suegros, cuñados, cuñada, mis sobrinos Iñaki, Julene, Santino y el bebé que está creciendo en el vientre de mi hermana Sandra, por acompañarme en todo este tiempo, dándome ánimos y por nunca hacerme olvidar que el fruto de un buen trabajo solo puede ser satisfactorio si se emplean esfuerzo, dedicación y responsabilidad.

A todos mis amigos que en cada llamada siempre me alentaban.

Pero principalmente a Dios que me dio vida y salud para llegar hasta el final.

Objetivos

1. Analizar estrategias de cuantificación del radiotrazador ^{18}F -DOPA en los putámenes y caudados de sujetos con Enfermedad de Parkinson y controles mediante el uso de imágenes cerebrales multimodales (PET/TC y RM).
2. Estudiar la distribución espacial del radiotrazador ^{18}F -DOPA en los putámenes y caudados de ambos grupos con el fin de obtener información cualitativa y cuantitativa que refleje el déficit de dopamina.
3. Analizar el efecto de la corrección por volumen parcial en la cuantificación estriatal de ^{18}F -DOPA.

1. Enfermedad de Parkinson

1.1 Introducción

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central descrito por primera vez en 1817 por el médico británico James Parkinson (1755-1824). El gran mérito de J. Parkinson consistió en relacionar un conjunto de síntomas (motores principalmente) en una entidad común, dando como explicación del fenómeno una alteración en el funcionamiento de la médula espinal, que podría extenderse al bulbo, pero descartando un compromiso de estructuras cerebrales superiores ya que en sus investigaciones no observó “modificaciones del intelecto ni de los sentidos” [1].

En el año 1913 Constantin Tretiakoff descubrió que la lesión básica de la EP se asentaba en la sustancia *nigra* (ganglios basales). Recién en el año 1956 el sueco Arvid Carlsson estableció a partir de un modelo animal que la noradrenalina y la dopamina (no reconocida en ese tiempo como neurotransmisor) estaban reducidas en la EP. Carlsson sostuvo que la dopamina era un neurotransmisor y la sintomatología parkinsoniana se debía a su disminución, lo cual inicialmente fue objetado. Sin embargo, su hipótesis fue corroborada y en el año 2000 se le concedió el Premio Nobel de Fisiología [1].

La enfermedad de Parkinson es el segundo trastorno crónico neurodegenerativo más habitual a nivel mundial, luego de la enfermedad de Alzheimer en adultos mayores de 65 años [1,2]. La Fundación para la Enfermedad de Parkinson de Estados Unidos afirma que mundialmente hay aproximadamente 10 millones de personas diagnosticadas y que afecta una y media veces más a hombres que a mujeres [2].

Según la Asociación Civil Enfermedad de Parkinson (ACEPAR) [3] se estima que en la República Argentina 70.000 personas padecen EP.

1.2 Fisiología y fisiopatología de la EP

Para describir las bases de la fisiopatología de la EP se describen, en primer término, los ganglios basales del cerebro, sus interacciones y funciones.

Los ganglios basales son estructuras neuronales subcorticales que forman un circuito de núcleos de sustancia gris interconectados entre sí (Fig.1.1). Dichas estructuras son el *cuervo*

estriado -compuesto por el *núcleo caudado* y el *putamen*-, el *globo pálido* (interno y externo) así como el *núcleo subtalámico* y la *sustancia nigra* (parte reticulada y la parte compacta) [1].

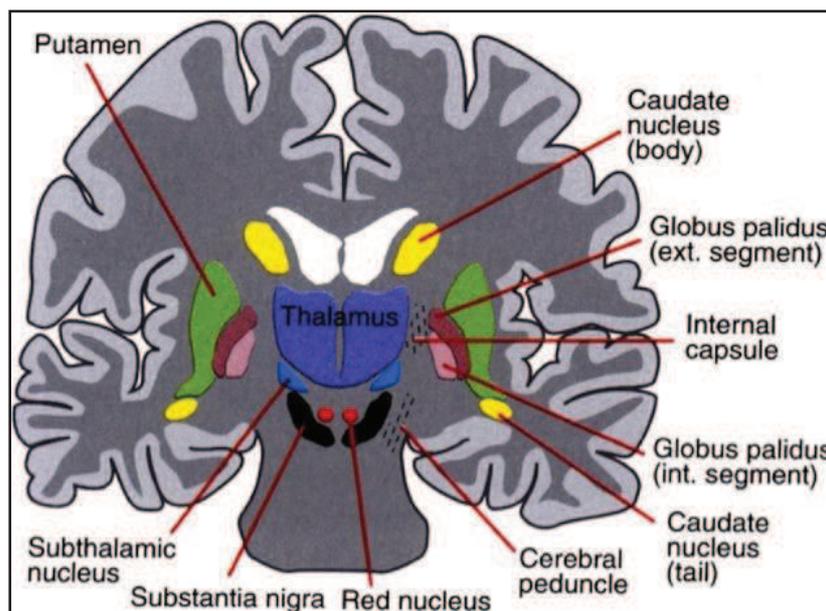
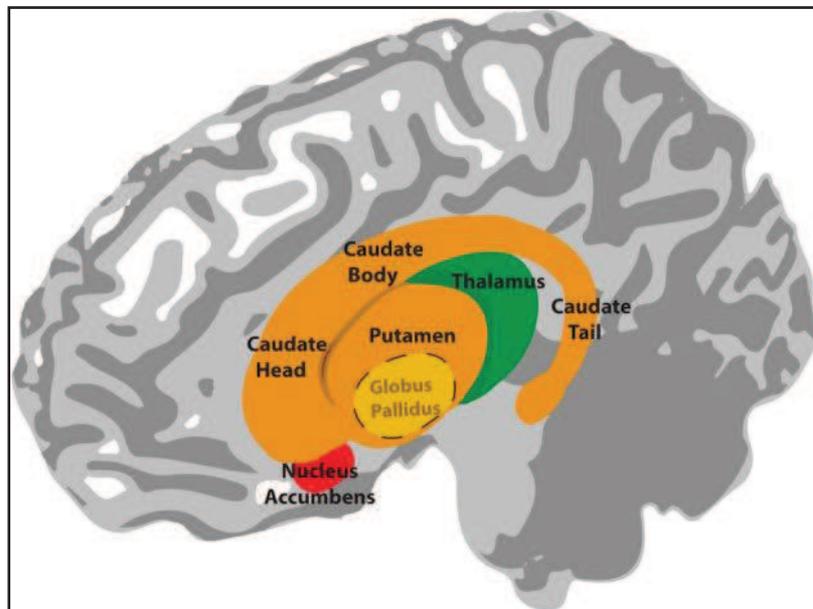


Fig.1.1 Ganglios basales. Sup.: Esquema 3D [4]. Inf.: Corte coronal [5].

La función de los ganglios basales radica, fundamentalmente, en el control de los movimientos en interacción con el cerebelo, la corteza motora, las vías corticoespinales y los núcleos motores del tronco encefálico.

Las neuronas estriatales se activan por efecto del aminoácido *glutamato* de las neuronas de la corteza. Para la interconexión de los ganglios basales, se emplea principalmente el transmisor inhibitor GABA (ácido gamma-aminobutírico) [1,6].

Los ganglios basales ejercen un efecto inhibitorio sobre el tálamo, a través de las neuronas GABAérgicas del globo pálido interno y de la sustancia *nigra* reticular. Estas neuronas se activan por efecto del glutamato de las neuronas del núcleo subtalámico (Fig.1.2).

Finalmente, las neuronas estriatales se activan parcialmente por efecto de la *dopamina* que procede de la sustancia *nigra* (parte reticulada), así como a través de las neuronas colinérgicas. La dopamina puede considerarse como un modulador, ya que en función del receptor al que se una provocará excitación o inhibición. Los receptores llamados D1 localizados en las fibras del globo pálido interno y de la sustancia *nigra* son excitatorios. Los receptores llamados D2 localizados en las fibras del globo pálido externo son inhibitorios [1,6].

Un desequilibrio entre los efectos inhibitorios y activadores tiene un efecto persistente sobre la capacidad motora: una inhibición demasiado fuerte de los núcleos del tálamo produce un efecto hipoquinético; una inhibición demasiado débil provoca un efecto hiperquinético [1,6].

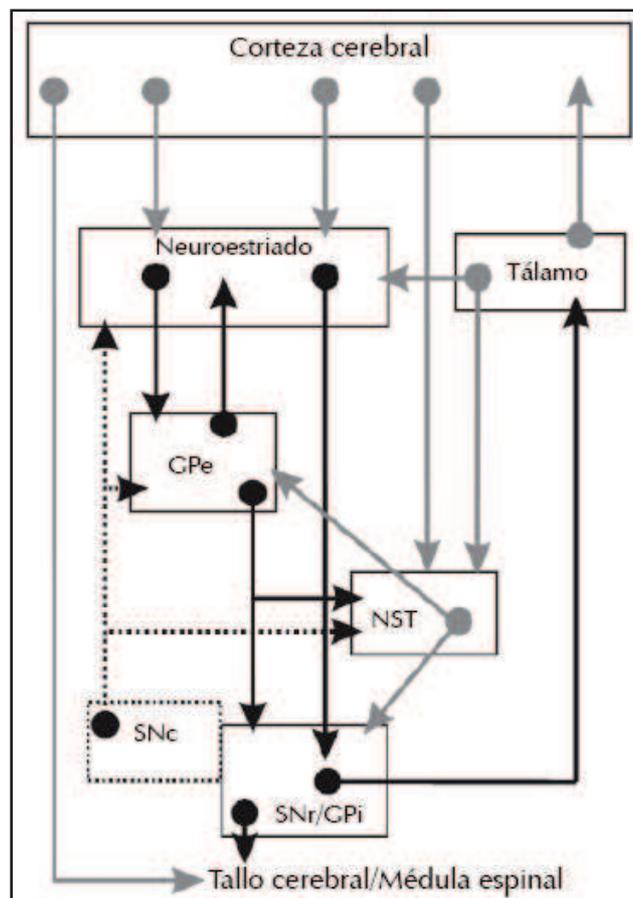


Fig. 1.2. Esquema de control motor del circuito de los ganglios basales.
 Eferencias inhibitorias (flechas negras). Eferencias excitatorias (flechas grises).
 Eferencias de la sustancia nigra compacta (SNc) (flechas punteadas).
 GPe: globo pálido externo; NST: núcleo subtalámico; SNr: sustancia nigra reticulada;
 GPi: globo pálido interno [6].

La EP es una patología que implica la destrucción de la sustancia *nigra* (parte compacta) que influye a través de las vías dopaminérgicas sobre las células GABAérgicas en el cuerpo estriado [1,7].

La destrucción celular en la sustancia *nigra* disminuye la respectiva inervación dopaminérgica del cuerpo estriado con la consecuente inhibición de las neuronas estriatales, las que normalmente inhiben neuronas en el globo pálido externo [1,7]. Esto provoca una desinhibición de las neuronas glutamatergicas en el núcleo subtalámico y con ello, una mayor actividad de las neuronas inhibitorias del globo pálido interno y de la parte reticulada de la sustancia *nigra*. Además, cesa la activación dopaminérgica de las neuronas estriatales. El resultado es una inhibición excesiva del tálamo (transmisor GABA). La inhibición del tálamo suprime los movimientos voluntarios. La ausencia de la modulación dopaminérgica afecta además la inhibición de los movimientos involuntarios [1,6,7].

La destrucción celular se produce probablemente en parte por apoptosis, donde a la producción de radicales libres se le adjudica un rol primordial. La pérdida neuronal en la sustancia *nigra* (parte compacta) debe ser mayor al 70% para que aparezcan los síntomas característicos [1].

Diversos estudios han mostrado que las personas con EP también tienen pérdida de las terminaciones nerviosas que producen el neurotransmisor norepinefrina. La norepinefrina, estrechamente relacionada con la dopamina, es el mensajero químico principal del sistema nervioso simpático, la parte del sistema nervioso que controla muchas funciones automáticas del cuerpo, como el pulso y la presión arterial [1].

1.3 Síntomas

La EP pertenece a un grupo de enfermedades llamadas trastornos del movimiento, que se caracteriza por la presencia de síntomas motores y síntomas no motores.

- Síntomas Motores

Existen 4 síntomas típicos que definen la enfermedad. Según los criterios de diagnóstico actuales, para diagnosticar a un paciente de EP éste deberá presentar al menos 3 de los siguientes síntomas [7-9]:

- Temblor*: Hasta un 70% de los afectados comienzan con temblor como primer síntoma de la enfermedad. El temblor Parkinsoniano es característicamente un temblor de reposo. Típicamente suele comenzar en las extremidades, afectando a la mano o a un pie, pero también puede afectar a la mandíbula o a la cara (párpados, labios). El temblor

se suele difundir al otro lado del cuerpo a medida que avanza la enfermedad, aunque generalmente será más marcado en el lado en que éste comenzó.

- b. *Rigidez*: La rigidez constituye un aumento del tono muscular: los músculos están constantemente tensos y no se pueden relajar bien. La rigidez puede provocar i) reducción de la amplitud de los movimientos, ii) dificultad para girarse en la cama o incorporarse de una silla, iii) dolor y calambres en las extremidades y sensación de tensión en el cuello o la espalda y iv) disminución de la expresividad facial por la rigidez de la musculatura de la cara.
- c. *Bradicinesia*: Lentitud para realizar un movimiento. El paciente con EP tardará en realizar una tarea más tiempo de lo que previamente hubiera necesitado, puede tener dificultad para iniciar un movimiento o cesar bruscamente una actividad que esté llevando a cabo, así como en tareas motoras finas de la vida cotidiana como abrocharse los botones, cortar la comida, atarse los cordones de los zapatos o cepillarse los dientes. La “marcha Parkinsoniana” también es una manifestación de la bradicinesia. Se trata de una marcha lenta, a pasos cortos, arrastrando los pies y con una disminución o ausencia del braceo.
- d. *Inestabilidad postural*: A medida que la enfermedad avanza, los pacientes Parkinsonianos tienden a adoptar una postura encorvada, con una flexión del tronco hacia delante, o incluso lateralmente, lo que contribuye al desequilibrio.

- Síntomas No Motores

Aunque menos conocidos, son parte importante de la enfermedad, ya que pueden llegar a provocar grandes interferencias en el día a día de los pacientes [7-9].

- a. *Trastornos del sueño*: Son altamente frecuentes en esta enfermedad. Un tercio de los pacientes presentan insomnio. También pueden tener sueños muy vívidos, somnolencia diurna o alteración del ciclo vigilia-sueño.
- b. *Pensamiento y memoria*: Los pacientes con EP pueden presentar lentitud en el pensamiento o cambios en su razonamiento, memoria o concentración, y algunos pacientes con EP desarrollarán deterioro cognitivo.
- c. *Trastornos neuropsiquiátricos*: Alteraciones del estado de ánimo como depresión, ansiedad y apatía.

1.4 Causas de la enfermedad

La EP es a la vez crónica, persiste durante un extenso período de tiempo, y progresiva, sus síntomas empeoran con el tiempo. Aunque algunos casos de Parkinson parecen ser hereditarios y otros pueden rastrearse a mutaciones genéticas específicas, en la mayoría de los casos la enfermedad no parece ser hereditaria [1,7].

1.5 Diagnóstico

La EP es la forma más común de parkinsonismo, nombre de un grupo de trastornos con características y síntomas similares. La EP también se llama parkinsonismo primario o EP idiopática (trastorno para el cual aún no se ha encontrado la causa). Aunque la mayoría de las formas de parkinsonismo son idiopáticas, existen algunos casos donde la causa se conoce o se sospecha o donde los síntomas son consecuencia de otro trastorno [1,7].

El diagnóstico clínico del síndrome parkinsoniano no siempre es fácil, ya que en muchas ocasiones estos síntomas no se presentan de forma clara. Los criterios clínicos de diagnóstico no son suficientemente exactos, principalmente en las fases iniciales de la enfermedad. Los síntomas tempranos de la EP son tenues y se producen gradualmente. Este período muy temprano puede durar largo tiempo antes de que aparezcan los síntomas más clásicos y obvios [2,7-9].

Un factor de riesgo para la enfermedad es la edad. La edad promedio de inicio es de 60 años, y la incidencia aumenta significativamente con la misma. Sin embargo, alrededor del 5 al 10 por ciento de las personas con EP tiene una enfermedad de “inicio temprano” que comienza antes de los 50 años de edad [2,7].

Actualmente no existen pruebas sanguíneas o de laboratorio que hayan demostrado ser útiles para diagnosticar EP esporádica. Por ello el diagnóstico se basa en gran medida en la historia clínica y en un examen neurológico del paciente. Los signos y síntomas tempranos de la EP a veces pueden ser descartados como los efectos del envejecimiento normal [7-9].

Diagnóstico de la EP por imágenes.

Dado que muchas otras enfermedades tienen características similares a la EP pero requieren tratamientos diferentes, resulta fundamental hacer un diagnóstico preciso para que los pacientes puedan recibir el tratamiento adecuado.

Actualmente los especialistas médicos disponen de diversas técnicas de neuroimagen (anatómicas y funcionales) que son utilizadas como parte del conjunto de herramientas disponibles para diagnosticar la EP o descartarla por una patología similar.

A continuación se describen brevemente las características principales de las modalidades de neuroimagen más utilizadas ante la sospecha de EP [9-11]:

a. *Tomografía computada.*

La tomografía computada cerebral (TC) no evidencia alteraciones específicas en la EP. Sin embargo, su uso permite excluir el posible origen secundario del cuadro clínico (por ej. lesiones vasculares).

b. *Resonancia magnética.*

La resonancia magnética (RM) cerebral es generalmente normal en la EP idiopática. En algunos casos es posible observar una hipointensidad de la *parte compacta* de la sustancia negra (secuencia T2) en pacientes con la EP.

c. *Tomografía Computada por Emisión de Fotón Único (SPECT).*

Este tipo de estudio ha tenido amplia difusión por la introducción comercial de marcadores específicos para las terminales dopaminérgicas, que permiten su uso en los casos en los que el diagnóstico clínico de la EP no es seguro.

- El ^{123}I -FP-CIT (N- ω -fluoropropil-2-carbometoxi-3-[4-Iodofenil] nortropano) es un marcador que se liga selectivamente al transportador cerebral de dopamina (DAT) en el estriado y puede considerarse como un indicador de la degeneración del sistema dopaminérgico. Diversos estudios han demostrado que dicho marcador permite discriminar entre los pacientes con parkinsonismo, pacientes con temblor esencial (TE) o sujetos de control sanos. Una reducción bilateral en la captación respecto a los sujetos de control puede encontrarse desde las primeras fases de la enfermedad e incluso también en la fase pre-sintomática. Sin embargo, este examen no permite el diagnóstico diferencial entre la EP idiopática y los parkinsonismos atípicos.
- El ^{123}I -IBZM (Iodobenzamida) se utiliza para cuantificar la densidad de los receptores dopaminérgicos D2 en el estriado. La presencia de una densidad normal de los receptores dopaminérgicos estriatales puede afianzar el diagnóstico diferencial entre la EP y parkinsonismos atípicos.
- Otros marcadores de SPECT, como el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO (hexametil-propilen-aminoxima) o el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECD (etil-cisteinato-dímero) reflejan el flujo cerebral, que puede considerarse un indicador de la actividad sináptica neuronal. Este tipo de marcadores permiten evaluar directamente el grado de afectación neuronal estriatal y, de esta forma, proporcionar indicaciones en aquellos pacientes con respuesta farmacológica insuficiente a la terapia dopaminérgica.

d. *Tomografía por Emisión de Positrones (PET).*

- El PET cerebral con el marcador [¹⁸F]-6-fluorodopa (FDOPA) ha proporcionado la primera demostración *in vivo* del daño del sistema dopaminérgico en pacientes con EP. El marcador es captado por las terminaciones dopaminérgicas nigroestriatales y, posteriormente se metaboliza a [¹⁸F]-dopamina, por lo cual refleja la actividad de la dopa-descarboxilasa y la capacidad de almacenamiento de dopamina de las terminales dopaminérgicas en el estriado. Este método puede identificar de forma fiable la reducción de la captación del marcador, estrechamente relacionada con el número de células en la sustancia *nigra* y con la gravedad de la afectación motora. Se ha observado que la FDOPA puede identificar la presencia de un parkinsonismo en fase precoz o preclínica.
- Otro marcador PET utilizado en la práctica clínica es el [¹¹C]-Raclopride, que se liga selectivamente a los receptores estriatales dopaminérgicos D2.

A partir de lo expuesto en esta sección se concluye que son las técnicas funcionales como el PET y SPECT las que permiten obtener información relevante para el diagnóstico y evolución de la EP. Existen constantes avances en la investigación y desarrollo de nuevos radiofármacos que permitan un diagnóstico más preciso y precoz de esta enfermedad.

1.6 Tratamiento de la EP

Actualmente, no existe una cura para la EP, pero existen fármacos y técnicas quirúrgicas que pueden atenuar los síntomas por periodos prolongados de tiempo.

Tratamiento farmacológico.

Los fármacos disponibles para la enfermedad de Parkinson se dividen en tres categorías [2,7].

La primera categoría comprende a los que funcionan directa o indirectamente para aumentar el nivel de dopamina en el cerebro. Los fármacos más comunes para la enfermedad son precursores de la dopamina. Sustancias como *levodopa* cruzan la barrera hematoencefálica y luego cambian a dopamina. Otros medicamentos imitan a la dopamina o previenen/retrasan su descomposición.

La *levodopa* tiene éxito en la reducción de temblores y otros síntomas de la EP durante las etapas tempranas de la enfermedad. Permite a la mayoría de los pacientes extender el

período de tiempo (a veces por años) en el que pueden llevar vidas relativamente normales y productivas.

La segunda categoría de fármacos para la EP afecta a otros neurotransmisores corporales con el fin de aliviar algunos síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, los fármacos *anticolinérgicos* interfieren con la producción o la captación del neurotransmisor acetilcolina. Estos medicamentos ayudan a reducir los temblores y la rigidez muscular.

La tercera categoría de fármacos comprende aquellos que ayudan a controlar los síntomas no motores de la enfermedad. Por ejemplo, se pueden recetar antidepresivos a las personas con depresión relacionada con la EP.

Cirugía

Los estudios en las últimas décadas han llevado a grandes progresos en las técnicas quirúrgicas y la cirugía se utiliza actualmente en los pacientes con EP avanzada para quienes la terapia farmacológica ya no es efectiva. La estimulación cerebral profunda usa electrodos implantados en una de tres regiones cerebrales: El núcleo subtalámico, el globo pálido o el tálamo. Los electrodos están conectados por un cable bajo la piel a un pequeño dispositivo - generador de pulsos- que se implanta en el tórax bajo la clavícula. El generador de pulsos y los electrodos estimulan el cerebro de forma indolora y ayuda a detener muchos de los síntomas de la enfermedad. La estimulación del globo pálido o del núcleo subtalámico puede reducir el temblor, la bradicinesia y la rigidez. La estimulación del tálamo es útil para reducir los temblores [2,7].

Este trabajo de tesis se enfoca en la utilización y cuantificación de la [^{18}F]-6-fluorodopa en el primer protocolo de EP realizado en Argentina para la evaluación de dicho radiotrazador. En el próximo capítulo se detallan las propiedades de dicho radiofármaco.

2. ¹⁸F-fluorodopa (FDOPA) y el sistema dopaminérgico

2.1 Introducción

Las principales características que hacen apropiado a un ligando para su utilización en estudios de neurotransmisión son: 1) difundir libremente a través de la barrera hematoencefálica; 2) tener baja capacidad de unión no específica y una alta afinidad con el elemento diana (por ej. receptor); 3) tener pocos metabolitos que difundan al cerebro desde el plasma, y 4) tener una actividad específica alta para evitar saturación de los elementos diana [10].

El sistema dopaminérgico puede estudiarse a nivel presináptico, postsináptico e intrasináptico (medición indirecta de neurotransmisores endógenos). El patrón normal de distribución del trazador depende de la distribución normal del elemento sináptico a estudiar [11].

La pérdida de neuronas de la sustancia *nigra* que tiene lugar en la EP repercute de manera directa en todo el sistema nigroestriatal, afectando también a la función de las terminaciones nerviosas dopaminérgicas presinápticas. La función de estas terminaciones dopaminérgicas puede ser estudiada *in vivo* por diferentes vías y tecnologías (SPECT y PET) gracias al desarrollo de radioligandos específicos para los distintos componentes de la sinapsis dopaminérgica [10,11]:

- a) Medida de la actividad de la dopa-descarboxilasa (DDC) (PET).
- b) Estudio de la concentración de los transportadores de dopamina mediante trazadores derivados del tropano (SPECT y PET).

El avance tecnológico de los sistemas de obtención de imágenes junto con los desarrollos en radiofarmacia ha proporcionado un importante volumen de conocimientos sobre los aspectos fisiopatológicos que ocurren en los pacientes con síndromes parkinsonianos.

Respecto a la utilización de la tecnología PET (en la que se centra el presente trabajo de tesis) debe remarcarse que la mayoría de los radionucleidos emisores de positrones presentan vidas medias extremadamente cortas, lo cual requiere su producción cerca del sitio de utilización. Todos son producidos por un ciclotrón [12].

Los más usados son el ^{18}F (vida media de 109,7 minutos), el ^{11}C (vida media, 20,4 minutos), el ^{15}O (vida media, 2,1 minutos) y el ^{13}N (vida media, 10,0 minutos), todos los cuales son capaces de marcar moléculas orgánicas utilizadas en el metabolismo celular [12].

El ^{18}F por su vida media relativamente larga puede ser usado en lugares distantes del sitio de producción. El radiofármaco marcado con ^{18}F más utilizado y comercializado es la ^{18}F -fluoro-desoxi-glucosa (FDG), un derivado de la glucosa que es captado por las células a través de los mismos mecanismos por los que se transporta la glucosa al interior celular.

Se realizan constantes esfuerzos a nivel mundial para marcar diversas moléculas de interés biológico empleando ^{18}F de manera de poder distribuir las y comercializarlas en sitios alejados de los centros de producción.

Una de las moléculas que pudo sintetizarse empleando el ^{18}F es la ^{18}F -fluorodopa (FDOPA). La primera descripción de uso del PET con FDOPA como marcador de las terminaciones dopaminérgicas se realizó en 1983 [10]. En las secciones siguientes se detallan sus principales características.

2.2 Dopamina y FDOPA

La dopamina es sintetizada a partir del aminoácido L-tirosina, el cual es hidroxilado dando lugar a la L-DOPA (*levodopa*), la cual sufre un proceso de descarboxilación, hasta formar la dopamina (Fig.2.1). Ésta es almacenada en el interior de las neuronas, dentro de vesículas, y durante el proceso de neurotransmisión parte del contenido de dichas vesículas son despedidas al espacio exterior entre el botón terminal axonal y la membrana dendrítica de otra neurona; la sinapsis neuronal [13].

La FDOPA se comporta de forma similar a como lo hace la levodopa (tanto la fisiológica como la farmacológica), con una cinética prácticamente idéntica, dando lugar a la ^{18}F -fluorodopamina [10,11,13].

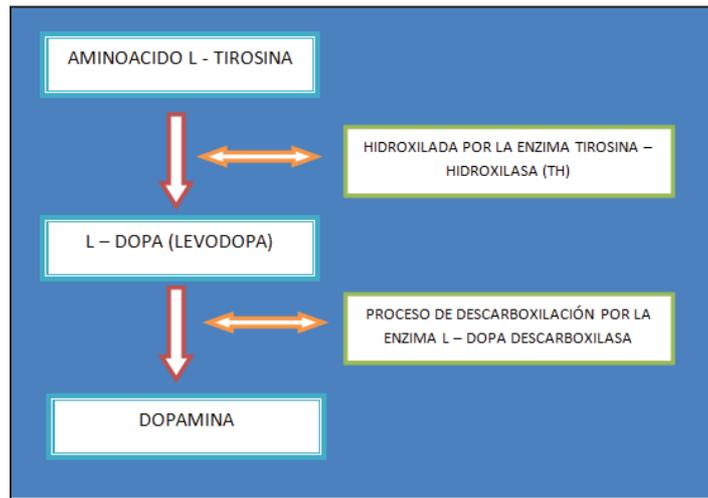


Figura 2.1. Esquema de la síntesis del aminoácido Dopamina.

La FDOPA como la levodopa, atraviesa la barrera hematoencefálica, alcanzando las neuronas dopaminérgicas en el cerebro.

La FDOPA es rápidamente descarboxilada en el núcleo estriado, pero sin sufrir ningún proceso metabólico adicional. Por lo tanto, la FDOPA es un marcador de la integridad de las terminaciones neuronales dopaminérgicas presinápticas del sistema nigroestriado y refleja el transporte de la dopamina en el terminal presináptico, la metabolización de la dopamina por la DDC y la capacidad de almacenamiento de la dopamina [13,14].

Desde la primera descripción de uso del PET con FDOPA como marcador de las terminaciones dopaminérgicas en 1983 se han publicado numerosos trabajos utilizando este marcador en el estudio de la EP, demostrando su capacidad para detectar las alteraciones que se producen en estos pacientes en las fases iniciales de la enfermedad, de conocer las variaciones en pacientes con EP estudiados longitudinalmente y medir los efectos de los tratamientos que puedan modificar el proceso degenerativo de la EP [10,14].

La FDOPA es el trazador PET más utilizado en el estudio de la EP y de los parkinsonismos atípicos, con cifras muy buenas de sensibilidad, especificidad y una buena correlación con la severidad y la progresión de la enfermedad, similares al SPECT cerebral con ^{123}I -FP-CIT (comentado en el capítulo N°1), pero con una mayor resolución espacial de las imágenes estriatales, ya que permite analizar por separado el caudado y el putamen [10,11].

El estudio de PET con FDOPA permite además cuantificar la captación específica absoluta del trazador mediante el valor SUV (*Standard Uptake Value*).

2.3 Imágenes cerebrales con FDOPA. Cuantificación.

Las imágenes que se obtienen con los distintos radiotrazadores SPECT y PET como los ya citados son muy similares y se caracterizan por una elevada captación en estriado (núcleo caudado y putamen), debido a la alta densidad de terminaciones dopaminérgicas existentes en estas estructuras, mientras que en el resto del cerebro la captación es muy baja [10,11]. En la Fig. 2.2 se observa un patrón normal y patológico de la distribución de FDOPA obtenida con un sistema PET. Con fines comparativos se muestra en la Fig.2.3 una imagen SPECT obtenida con ^{123}I -FP-CIT.

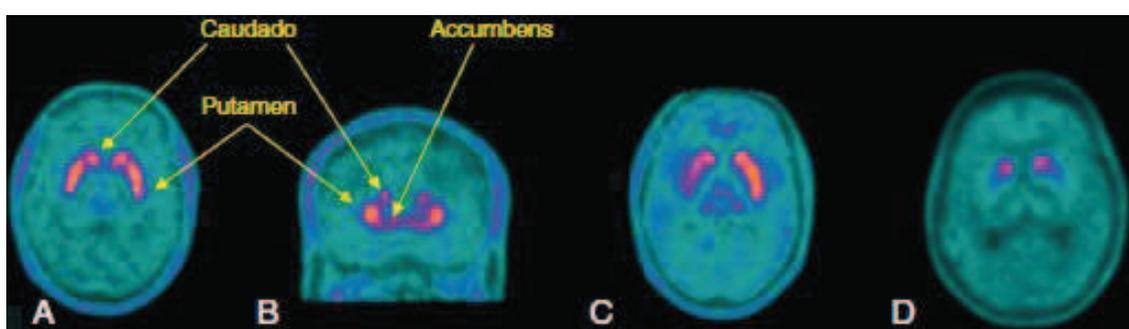


Figura 2.2. Patrones de normalidad y patológicos con FDOPA. (A) Patrón normal, corte axial (B) Patrón normal, corte coronal captación estriatal conservada de ambos caudados, putámenes y accumbens. (C) Patrón patológico 1: hipocaptación en putamen derecho y captación normal del putamen izquierdo y de ambos caudados. (D) Patrón patológico 2: ausencia de captación de ambos putámenes y captación preservada de los caudados [10].

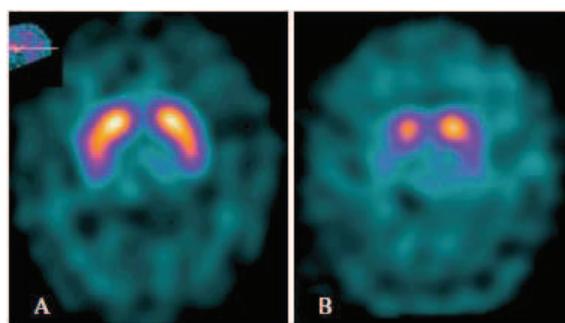


Figura 2.3 Patrón normal (A) y patológico (B) con ^{123}I -FP-CIT [10].

Las imágenes funcionales como las mostradas en las figuras anteriores permiten realizar un análisis cualitativo y cuantitativo. Dado el gran contraste estriado/fondo que ofrecen estas imágenes, el análisis cualitativo se ve facilitado, principalmente cuando el daño estriatal se encuentra en etapas avanzadas.

Sin embargo, el uso de radiotrazadores como la FDOPA en etapas tempranas de la EP o el seguimiento de pacientes para determinar la efectividad de un determinado esquema

farmacológico requiere el análisis cuantitativo de la imágenes dado que los cambios cualitativos pueden no ser lo suficientemente notorios para el especialista o generar dudas.

La cuantificación de la actividad de la FDOPA en los estriados suele realizarse mediante la selección de regiones de interés (ROIs) en los mismos y en regiones de referencia con baja captación como el cerebelo o los lóbulos occipitales [15,16].

Estos índices (relaciones) se conocen como SCR (*Striatum-to-cerebellum*) y SOR (*Striatum-to-occipital cortex*) respectivamente [15,16].

Dichos índices pueden considerar las captaciones máximas en el estriado y en la referencia (SUV_{max}) o las captaciones medias en las mismas (SUV_{mean})

Las regiones de referencia, además de la baja captación de FDOPA, presentan un nivel estable de la misma una vez alcanzado el tiempo para realizar las imágenes según los protocolos utilizados.

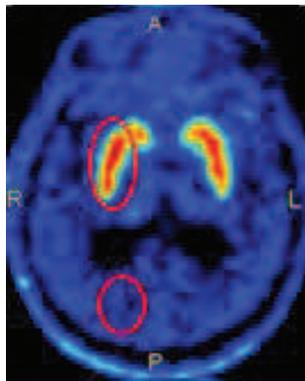


Fig.2.4 Ejemplo de selección de ROIs para la cuantificación de imágenes PET-FDOPA

La selección de ROIs de manera manual (Fig. 2.4) está sujeta a diversas fuentes de error operador-dependiente. Factores como: 1) Tamaño y forma de las ROIs, 2) elección del corte donde se sitúan las mismas y 3) precisión y referencia anatómica para delimitar apropiadamente las regiones de interés, pueden dificultar la repetitividad de las medidas y la comparación de las mismas obtenidas en diversos centros.

En los siguientes capítulos se proponen y evalúan estrategias de cuantificación de FDOPA basadas en técnicas avanzadas de segmentación de imágenes multimodales que minimizan y en algunos casos eliminan los errores cometidos por el procedimiento estándar.

Otras aplicaciones clínicas de la FDOPA han surgido, comenzando en el campo de la oncología (tumores cerebrales y tumores neuroendocrinos) y continuando hasta la evaluación de la hiperinsulinemia congénita en pacientes pediátricos [14]. Estas aplicaciones no son tratadas en el presente trabajo pero ya se realizan en la Argentina.

3. Metodología

3.1 Sujetos analizados

Este trabajo de tesis utiliza las imágenes multimodales (PET/TC/RM) de controles sanos y de pacientes diagnosticados con EP incluidos en un protocolo realizado en el Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC, CABA, Argentina). Se trata del primer protocolo de utilización de FDOPA realizado en América Latina. El radiofármaco fue provisto por laboratorios BACON®.

El protocolo obtuvo aprobación del Comité de Ética en Investigación (CEI) de CEMIC, de la Administración Nacional Argentina reguladora de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) y de la Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN).

Fecha de inicio y fin del estudio: Junio de 2013 a noviembre de 2014.

Se describen a continuación los principales criterios de inclusión y exclusión para pacientes y sujetos control.

- Pacientes

- Criterios de inclusión:*

- a. Cada sujeto debe tener un diagnóstico de EP según los criterios del Banco de Cerebros de Londres, de al menos 5 años de evolución.
- b. Bradicinesia y al menos uno de los siguientes síntomas:
 - Rigidez muscular
 - Temblor en reposo (4 a 6 Hz)
 - Inestabilidad postural
- c. Pacientes adultos ≥ 35 y ≤ 80 años de edad, de ambos sexos.
- d. Pacientes en tratamiento previo con Levodopa por lo menos durante un año y en dosis estables al menos 4 semanas antes de entrar en el estudio.
- e. Pacientes que reciben una o más medicaciones adyuvantes para la EP en tratamiento estable durante al menos 4 semanas antes de entrar en el estudio.
- f. Pacientes con Mini Mental Status (MMSE) de Folstein ≥ 26 .
- g. Pacientes con examen clínico dentro de los límites clínicamente aceptables para el investigador.

Criterios de exclusión:

- a. El sujeto no debe tener Parkinsonismo inducido por fármacos o atípico, ni deterioro cognitivo (ej.: MMSE \leq 26), enfermedad bipolar asociada o trastornos psicóticos.
- b. Los pacientes no deben tener historia de los siguientes aspectos:
 - Accidente Cerebrovascular a repetición.
 - Progresión en pasos de la EP.
 - Traumatismo encefalocraneano a repetición.
 - Encefalitis definitiva.
 - Crisis oculógiras.
 - Tratamiento con neurolépticos al inicio de los síntomas.
 - Remisión sostenida.
 - Signos cerebelosos.
 - Compromiso severo autonómico inicial no relacionado con el tratamiento.
 - Demencia precoz severa con alteraciones de la memoria, el lenguaje y las praxias.
 - Presencia de un tumor cerebral o hidrocefalia comunicante en las neuroimágenes.
 - Respuesta negativa a altas dosis de L-dopa (descartando mala absorción).
 - Accidente cerebrovascular en los 6 meses previos al ingreso al estudio, o un déficit neurológico persistente que pueda interferir con el estudio.
 - Cirugía debido a la EP.

- Controles sanos

Criterios Inclusión:

- a. Hombres y mujeres entre 35 y 84 años de edad inclusive.
- b. Mini Mental Status de Folstein \geq 26

Criterios de exclusión:

- a. Hombres y mujeres menores de 35 años o mayores de 84 años de edad inclusive.
- b. Deterioro cognitivo Mini Mental Status de Folstein \leq 26.
- c. Antecedentes familiares de EP.
- d. Presencia de cualquier signos extrapiramidal o signología parkinsoniana.
- e. Antecedentes de enfermedad neurodegenerativa.
- f. Presencia de síntomas no motores habitualmente vinculados a la EP en estadio premotor como hiposmia, depresión, constipación, trastorno del sueño REM (que no puedan ser explicados por otra causa).
- g. Presencia de demencia.

- h. Presencia de ataxia.
- i. Diagnóstico actual o pasado (en el último año) de depresión mayor, historia de suicidio, manía, psicosis, enfermedad bipolar, trastorno generalizado de ansiedad, abuso de sustancias, trastorno en el control de los impulsos.
- j. Historia de o evidencia actual de cualquier enfermedad relevante que en el contexto del estudio pueda afectar la seguridad del paciente.
- k. Embarazo o amamantamiento.

En el protocolo mencionado se incluyeron 12 pacientes con EP y 7 controles cuyas características se describen en las siguientes tablas (3.1 y 3.2):

Tabla 3.1 (EP)

Edad (años) (media: 65)	Sexo	Duración de la EP (años) (media: 9.5)
56	m	7
73	m	15
76	f	10
59	m	7
62	m	10
41	m	14
67	m	6
79	f	13
58	m	10
80	f	11
75	m	6
51	m	5

Tabla 3.2 (controles)

Edad (años) (media: 58,6)	Sexo
54	m
63	f
60	f
84	m
41	m
54	m
54	f

3.2 Protocolo de adquisición de imágenes FDOPA PET/TC/RM

El estudio ¹⁸F-FDOPA PET/TC se llevó a cabo en todos los pacientes y controles con un equipo Philips Gemini 64 TF con la tecnología *Time of Flight*.

- Los pacientes portadores de EP discontinuaron la medicación antiparkinsoniana por lo menos 12 horas antes del estudio.
- Se administraron 100 mg de carbidopa vía oral 1 hora antes de inyectar la FDOPA.
- Cinco minutos antes de administrar el material radiactivo se volvió a suministrar 50 mg de carbidopa y luego se inyectó 0,05 a 0,07 mCi/kg de actividad durante 30 segundos (medida con un activímetro previo a la inyección).

- A los 75 minutos post-inyección se comenzó la adquisición estática cerebral de la imagen durante 15 minutos.
- Finalizada la adquisición del PET se realizó una TC cerebral con protocolo de baja dosis (120Kv, 50mA). La misma solo fue utilizada para la corrección por atenuación del PET.
- Las imágenes PET se reconstruyeron empleando un algoritmo iterativo (RAMLA 3D) y realizando las siguientes correcciones: a) atenuación, b) radiación dispersa, c) eventos aleatorios y d) tiempo muerto. Las imágenes resultantes poseen un tamaño de voxel de 2mm (isótropo).
- Todos los sujetos bajo estudio se realizaron una RM cerebral volumétrica T1 (1mm de resolución en las tres dimensiones, FOV de 26 cm, matriz de 256x256, TR/TE: 7.5/3.4ms), adquiridas mediante utilización de una bobina NV de 8 canales en un equipo Philips Achieva 1.5T.

3.3 Procesamiento de las imágenes PET y RM

Las imágenes PET (corregidas por atenuación) y RM de cada sujeto estudiado fueron procesadas utilizando el software PNEURO 3.6 del cual la ECyT posee licencia de uso [17]. Este software permite procesar, filtrar, corregir y cuantificar imágenes cerebrales PET y/o de RM. Las tareas de procesamiento se realizaron utilizando una PC (Intel Core i7, 8GB RAM) y Windows 8 como sistema operativo.

La secuencia de procesamiento de las imágenes fue la siguiente:

1. Corregistro espacial.

1.1 Tomando como imagen de referencia al volumen RM y al volumen PET como imagen flotante, este último fue corregido mediante una transformación afín (rotaciones, traslaciones y cambios de escala no isotrópicos) al espacio de referencia (Fig.3.1). El software iguala además los niveles de discretización entre ambas imágenes (tamaño de voxel y cantidad de cortes).

1.2 En cada caso se inspeccionó visualmente el resultado del corregistro.

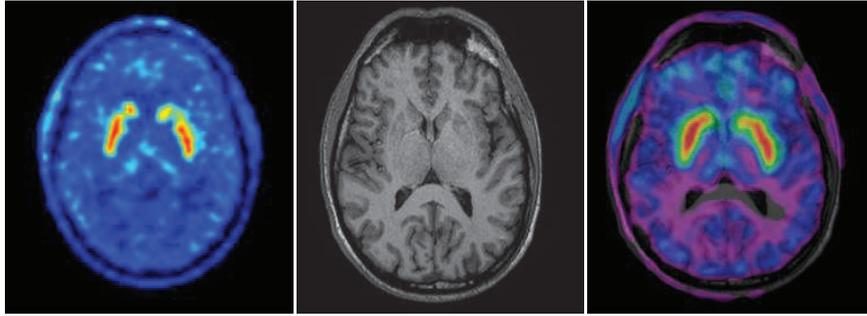


Figura 3.1. FDOPA-PET (izquierda), RMN (centro), correregistro PET/RMN (derecha)

2. Normalización espacial y segmentación del volumen RM.

2.1 Cada volumen RM fue corregido por efecto de *bias*. Este efecto es causado por las inhomogeneidades espaciales del campo magnético, por variación en la sensibilidad de las bobinas y la interacción del cuerpo humano con el campo, entre otros factores. Produce un artefacto de baja frecuencia espacial que genera variaciones de intensidad dentro del mismo tipo de tejido con similares propiedades afectando la segmentación de tejidos [18].

El programa PNEURO utilizado permite la corrección de este efecto mediante la estimación del *bias* y su posterior filtrado espacial. Se utilizaron los parámetros recomendados por el desarrollador del software para imágenes provenientes de resonadores de alto campo. Los detalles de la corrección escapan el alcance de esta tesis y pueden consultarse en [18].

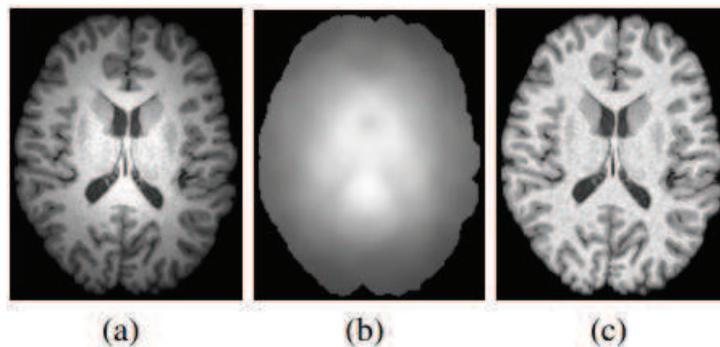


Figura3.2. a) Imagen MR sin corrección de *bias*. b) Estimación del *bias*. c) Imagen corregida.

2.2 Cada volumen RM corregido por *bias* fue segmentado automáticamente en sustancia gris (SG), sustancia blanca (SB) y líquido cefalorraquídeo (LCR) a partir de un atlas de probabilidad de tejidos incluido en el PNEURO. Para realizar esta segmentación el volumen RM es llevado al espacio del atlas de probabilidad de tejidos. De esta manera a cada voxel del volumen RM se le asigna una probabilidad

de pertenecer a alguno de los tres tipos de tejido en función de su intensidad y de su posición en relación al atlas. El volumen segmentado se presenta finalmente en el espacio del paciente o control según corresponda. El programa PNEURO utiliza el algoritmo de segmentación del *Statistical Parametric Mapping* (SPM) [19].

2.3 El volumen RM segmentado en los tres tejidos es normalizado espacialmente al espacio del atlas de Hammers N3083 [20] incorporado en el software. Este atlas cerebral fue realizado a partir de 30 volúmenes RM (T1) de sujetos sanos y segmentados por especialistas mediante regiones de interés (ROIs) en 83 estructuras cerebrales. De forma análoga a lo comentado en 2.2, por intensidad y posición, cada voxel del volumen RM es identificado como perteneciente a una determinada estructura cerebral. Segmentado todo el volumen en las 83 estructuras mediante ROIs, se invierte la transformación espacial y el resultado se presenta en el espacio original del paciente/control (Fig.3.3).

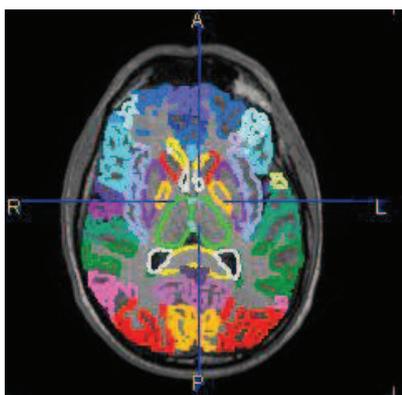


Fig. 3.3 Corte RMN segmentado en regiones anatómicas

2.4 A partir de la segmentación realizada en 2.3 se eligen las estructuras de interés para el presente trabajo (caudados, putámenes y cerebelo) (Fig.3.4).

En este trabajo se toma como región de referencia al cerebelo para realizar las cuantificaciones. Los estudios de sensibilidad/especificidad entre los índices SOR y SCR no muestran diferencias entre ellos [15].

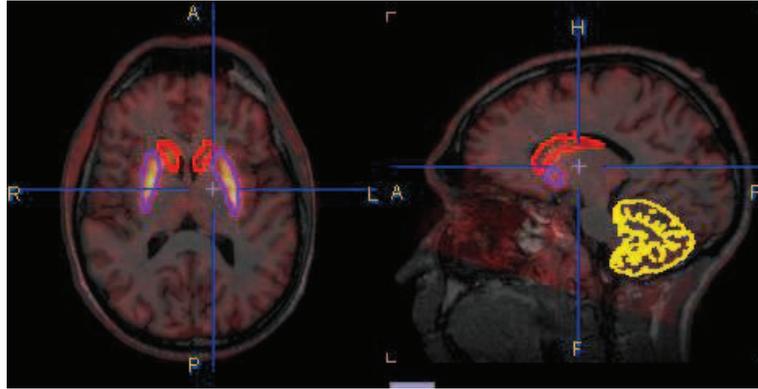


Figura 3.4. Segmentación de caudados, putámenes y cerebelo en imagen PET/RMN

2.5 Dado que el volumen PET se encuentra corregistrado espacialmente al volumen RM, la segmentación de estructuras realizada permite identificar las mismas en la imagen funcional.

3. Cuantificación.

3.1 Una vez delimitadas las estructuras en ambas imágenes el software permite obtener para cada una de ellas el volumen anatómico (cm^3 de tejido) a partir de la RM así como la información funcional dada por el PET (por ej. cuentas totales). A partir del volumen y de las cuentas presentes en cada estructura se puede obtener las cuentas (promedio) por unidad de volumen.

3.2 Las cuentas promedio de FDOPA de putámenes y caudados se expresan en relación al promedio medido en cerebelo dando como resultado los valores de captación normalizada. Se normaliza al cerebelo dado que en esta estructura hay poca concentración de dopamina como se explica en el capítulo N°2.

4. Distribución espacial del radiotrazador FDOPA en putámenes y caudados.

Una vez segmentadas las estructuras de interés mediante ROIs se obtuvieron las coordenadas espaciales (x, y, z) de cada voxel de la imagen PET que componen las mismas. De esta manera y por medio de una planilla de cálculo, es posible ordenar los valores de captación de cada voxel en las direcciones espaciales deseadas. En este trabajo se eligió la dirección anterior-posterior (rostro-caudal).

Para cada plano *y* (coronal) en las imágenes PET, se promediaron los vóxeles pertenecientes a la estructura de manera de obtener un valor único en cada corte. Se repitió el proceso hasta haber recorrido toda la estructura en sentido anterior-posterior (Fig. 3.5).

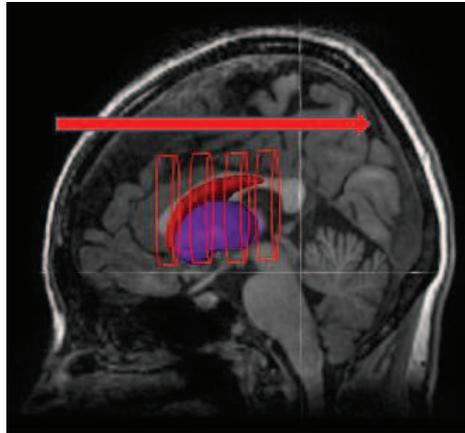


Fig.3.5 Segmentación del estriado en sentido anterior-posterior.

De esta manera se tiene un valor de captación medio para cada plano coronal. Estos valores finalmente se grafican permitiendo obtener un gráfico de la distribución de actividad en el sentido anterior-posterior. Dicha elección se basa en la bibliografía existente que indica que el daño en las estructuras del estriado (putamen y caudado) comienza en el sector posterior y avanza hacia el sector anterior [21,22]. De esta forma, es posible generar curvas, que permiten visualizar cualitativa y cuantitativamente la variación de la captación de la FDOPA en la dirección seleccionada.

3.4 Corrección por efecto volumen parcial.

Las imágenes PET están inherentemente afectadas por el efecto de volumen parcial (EVP). Esto significa que la concentración de actividad medida en una región de interés (principalmente si es pequeña en relación a la resolución espacial del sistema) no representa estrictamente el valor real de la misma (Fig. 3.6) [23].

La baja resolución espacial del sistema causa un “emborronamiento” de las imágenes, de manera que altas concentraciones de actividad (una lesión caliente, por ejemplo) se disemina en los alrededores (efecto *spill-out*). La misma situación se da desde los alrededores hacia la zona de interés (efecto *spill-in*) [24].

Como consecuencia, una lesión caliente o región con alta concentración de actividad aparentará ser más grande y con menos actividad de la que en realidad tiene.

Los fenómenos de *spill-in* y *spill-out* dependen de la geometría de los objetos, de la distribución de actividad, de la resolución espacial del sistema, entre otros factores.

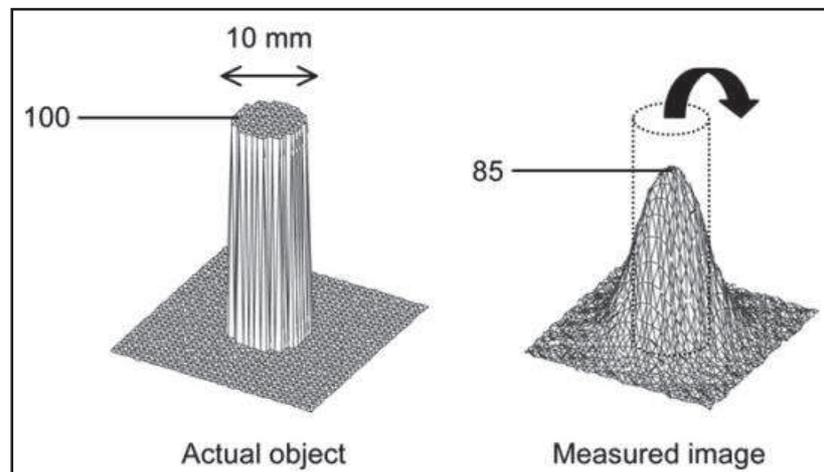


Fig.3.6 Ilustración del efecto de volumen parcial (EVP) [23]

3.4.1 Método utilizado para corregir el EVP.

Se plantea en este trabajo analizar el efecto de la corrección por volumen parcial en la cuantificación de las imágenes ^{18}F -DOPA PET.

Para implementar dicha corrección se utiliza un método basado en el uso de las imágenes PET y RM de cada paciente. Se emplea un algoritmo basado en el método de *Muller-Gartner* que utiliza una estimación de la PSF (*Point Spread Function*) o función de degradación del equipo PET junto con la segmentación del volumen RM en sustancia gris (SG), sustancia blanca (SB) y líquido cefalorraquídeo (LCR) para corregir el fenómeno de *spill-in* (contribución de la actividad dentro de la sustancia blanca sobre la sustancia gris) y *spill-out* (actividad de la sustancia gris que es diseminada en regiones circundantes) [25].

La ecuación N°1 que representa el cálculo de la actividad corregida por EVP en un determinado voxel, C_{pvc} , depende de la actividad medida por el sistema PET, $C_{measured}$, de la actividad medida de la sustancia blanca C_{WM} , de la máscara de segmentación de sustancia blanca WM, de la PSF del sistema PET y de la máscara de segmentación de sustancia gris GM [25]. En la Fig. 3.7 se muestra un esquema del funcionamiento del algoritmo de corrección proporcionado por el desarrollador del software PNEURO.

$$C_{PVC-GM} = \frac{C_{measured} - \overbrace{C_{WM} \times (WM \otimes PSF)}^{\text{Corrección de spill-in}}}{\underbrace{GM \otimes PSF}_{\text{Corrección de spill-out}}} \quad (1)$$

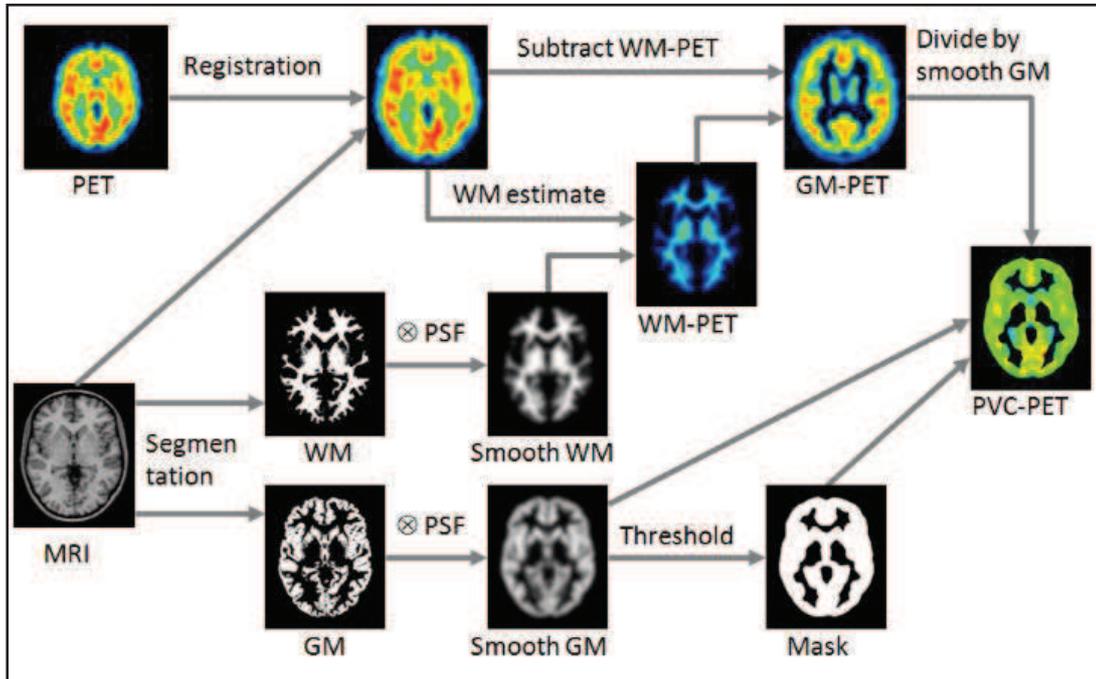


Figura.3.7. Esquema del funcionamiento del algoritmo de corrección del EVP [25].

El algoritmo segmenta el volumen de RM en sustancia gris y en sustancia blanca, obteniendo los respectivos mapas de probabilidad (WM y GM). Cada uno de estos mapas es convolucionado (filtrado) con la PSF del equipo, en este caso una función gaussiana 3D de 5mm de FWHM (valor compatible con el quipo PET del que se obtuvieron las imágenes). Esta función simula la degradación del equipo a las imágenes "reales".

El volumen PET es corregistrado al volumen RM. Con el mapa de WM "degradado" se estima la actividad proveniente de la sustancia blanca. Sustrayendo dicha actividad de la imagen PET medida se estima la actividad solo de la sustancia gris, corrigiendo el efecto *spill-in*. La división de la actividad estimada en la sustancia gris por el mapa GM convolucionado con la PSF del sistema, permite obtener la corrección por *spill out*, A partir de dichas correcciones se realizó el análisis comparativo de la cuantificación del radiotrazador considerando el EVP y en ausencia del mismo.

3.5 Análisis estadístico

Las diferencias entre el grupo control y el de pacientes con EP para los distintos índices de cuantificación analizados en esta tesis se llevaron a cabo en una planilla Excel[®] utilizando el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras independientes. Se fijó un nivel de significación estadística de $p < 0.05$ para considerar las diferencias encontradas.

La elección de este test se basa en que la cantidad de muestras en cada grupo es insuficiente para realizar las pruebas de normalidad necesarias que permiten aplicar el test ANOVA.

4. Resultados

4.1 Introducción

Como se comenta en el capítulo N°2 la manera habitual de cuantificar los estudios de FDOPA es delimitar ROIs en la zona de interés y otras en una región de referencia como el lóbulo occipital o el cerebelo y establecer cocientes (índices SOR y SCR). En dicho capítulo se han mencionado los problemas asociados a esta manera de cuantificar cuando las regiones son elegidas y delimitadas por el operador.

En este trabajo se estudió detalladamente la cuantificación relativa de FDOPA de dos núcleos basales -el putamen y el caudado- que en su conjunto se conocen como núcleo estriado.

Además de los índices cuantitativos se estudió la distribución espacial del radiotrazador como se detalla en el capítulo N°3.

Se presentan a continuación los resultados obtenidos para el grupo control y los pacientes con EP en los que se han evaluado diversos índices para determinar cuáles son los más apropiados y fiables para separar ambas poblaciones. Dicha búsqueda se basó en encontrar un índice que requiera un costo temporal-computacional compatible con la práctica clínica y con la suficiente significancia estadística (SE).

Para cada índice propuesto se evaluó por separado cada putamen y cada caudado. Dichas estructuras fueron segmentadas tal como se describe en el capítulo N°3.

4.2 Índices relativos de cuantificación de estudios con FDOPA

4.2.1 Promedios de captación.

Luego de segmentar las estructuras se obtuvieron las captaciones medias por unidad de volumen (cuentas/cm³ de tejido) en putámenes y caudados y se normalizaron dichos valores a la actividad promedio por unidad de volumen registrada en el cerebelo (Fig.4.1 y Tabla 4.1).

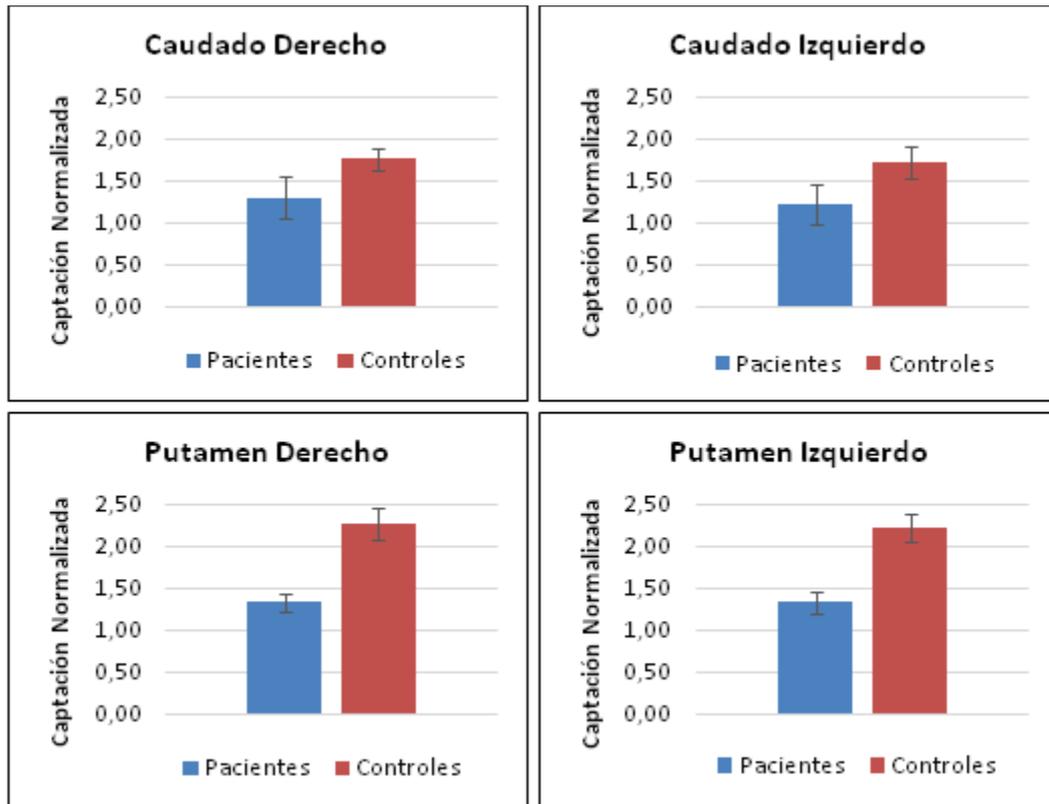


Figura 4.1. Promedios de captación normalizada para putámenes y caudados.

Tabla 4.1

Captación promedio normalizada	Caudado Izquierdo	Caudado Derecho	Putamen Izquierdo	Putamen Derecho
Pacientes	1,23 ±0,24	1,30 ±0,26	1,33 ±0,13	1,34 ±0,11
Controles	1,71 ±0,19	1,76±0,14	2,23 ±0,20	2,23±0,17
Significancia estadística	P<0.004	P<0.003	P<0.0006	P<0.0006

Al considerar estos indicadores se observa una disminución de la captación estadísticamente significativa en los pacientes patológicos comparados con los pacientes controles para ambas estructuras. Sin embargo, la cuantificación de los putámenes arroja una mayor diferencia entre las muestras poblacionales junto a una mayor SE. Estos resultados coinciden con la bibliografía existente que indica que el putamen es la estructura más afectada en la EP [21,22].

El tiempo empleado de procesamiento (desde la carga de las imágenes hasta obtener los índices cuantitativos) es de aproximadamente 20 min. por caso, empleando la configuración de hardware detallada en el capítulo N°3.

4.2.2 Distribución espacial del radiotrazador y cuantificación.

La evidencia experimental disponible indica que el deterioro de los putámenes y caudados en la EP comienza en el sector posterior (caudal) y progresa hacia el sector anterior (rostral). Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a reordenar los vóxeles pertenecientes a los putámenes y caudados de manera de poder analizar su distribución espacial tal como se detalla en el capítulo N°3. A continuación, se muestran los resultados para dos controles y dos pacientes con EP (Fig.4.2-4.3)

Cada valor en la curva es el promedio de captación (cuentas) en el respectivo plano (y) normalizado al promedio de cuentas en el cerebelo. Las restantes curvas de controles y pacientes se muestran en el Apéndice N°1.

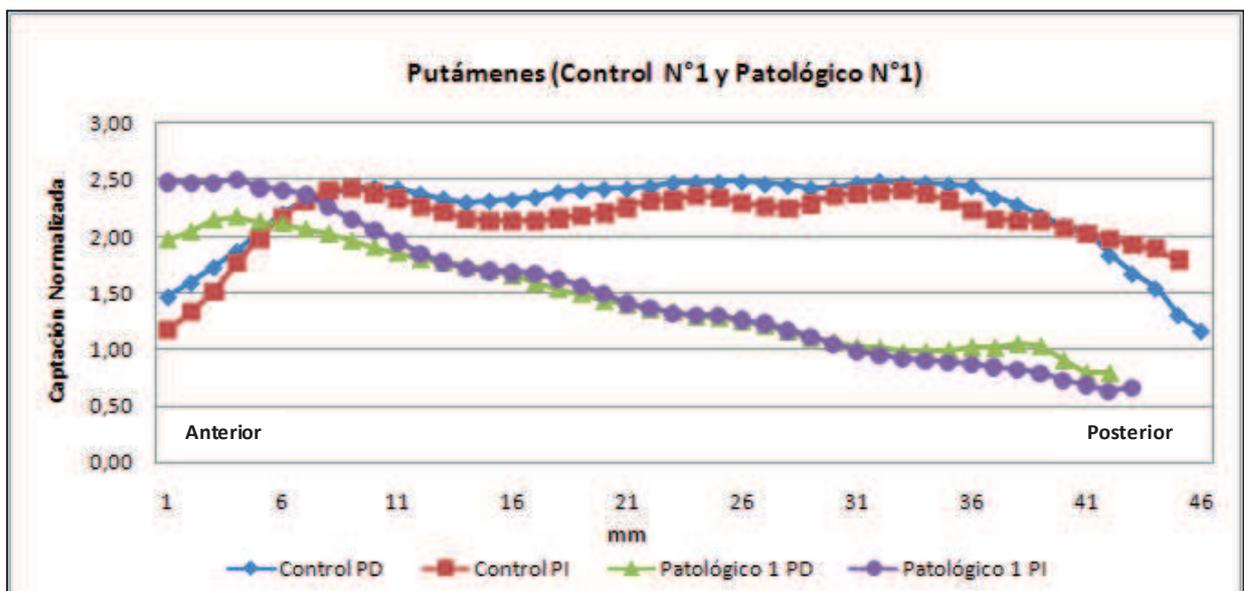
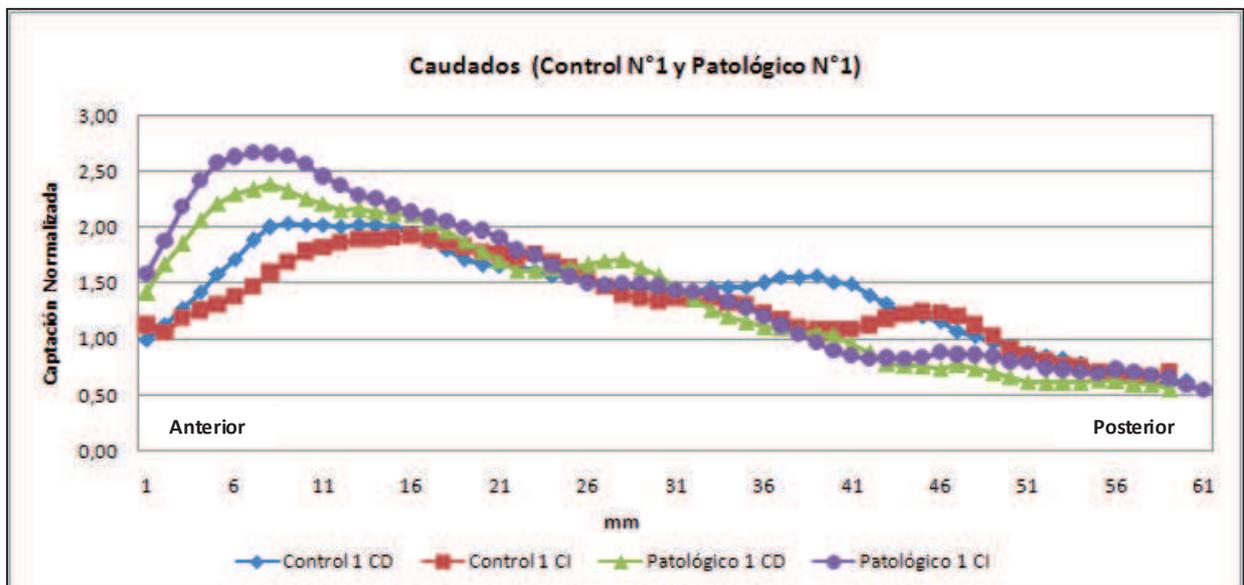


Figura 4.2. Distribución espacial de captación de FDOPA (control N°1 y patológico N°1)

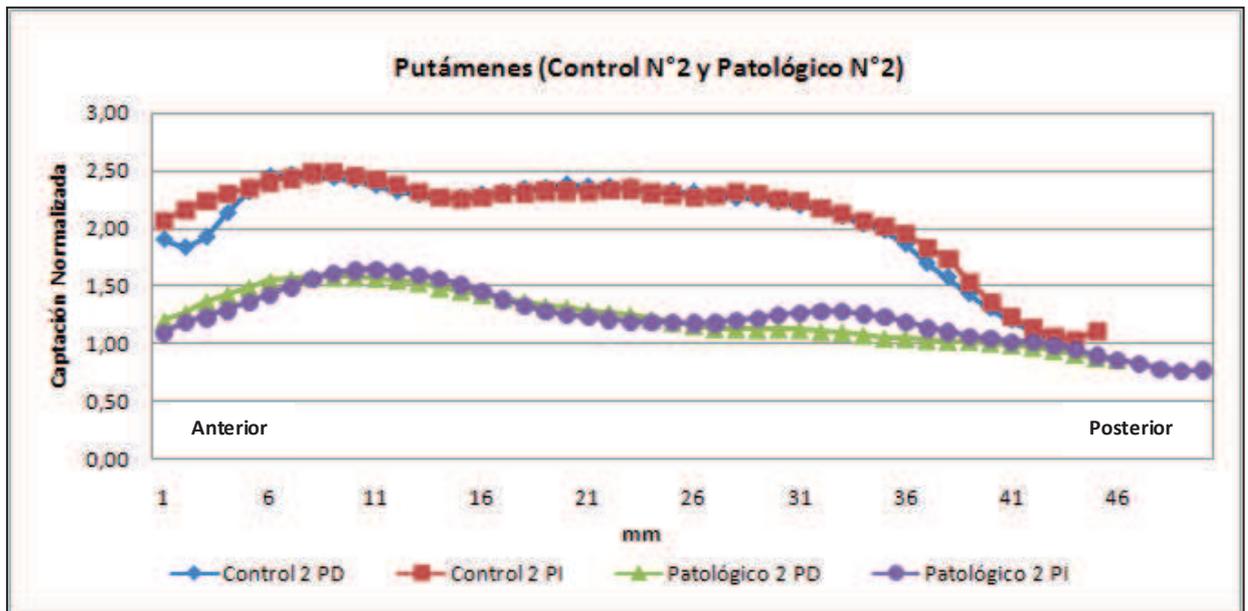
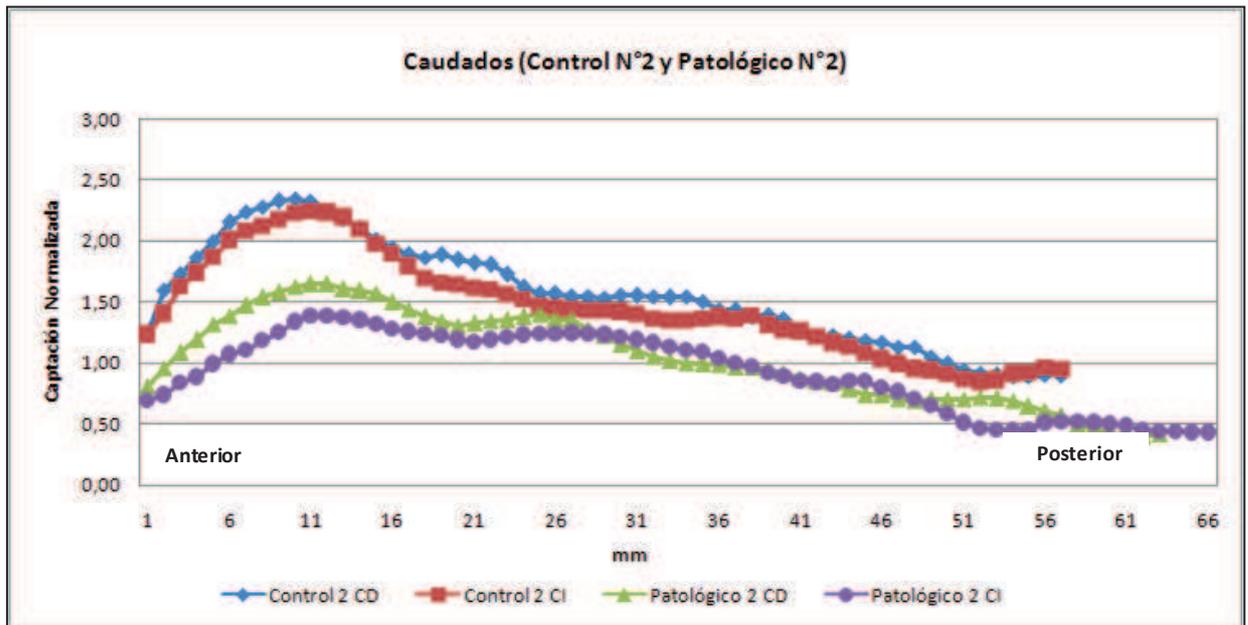


Figura 4.3. Distribución espacial de captación de FDOPA (control N°2 y patológico N°2)

Las curvas se muestran con sus valores medios para cada ROI. Se omiten los desvíos estándar para una mejor apreciación de su comportamiento cualitativo.

Los planos coronales en los que fue segmentada cada estructura para obtener las curvas están equiespaciados a 1 mm (eje horizontal).

El análisis cualitativo de la distribución espacial de la actividad del radiotrazador en putámenes y caudados arroja:

- En los casos patológicos las curvas para caudados y putámenes se comportan de manera similar, con el máximo de captación en el tercio anterior de las estructuras seguido de un decrecimiento hacia el sector posterior de las mismas.
- En el caso de los controles, las curvas para caudados se comportan cualitativamente de manera similar a los patológicos.
- A diferencia de los casos patológicos, los controles presentan, en la mayoría de los casos, un valor de captación relativamente constante en la porción central de las curvas de los putámenes.
- En términos generales, los mínimos de captación de caudados y putámenes se observan el sector posterior de dichas estructuras.
- Las curvas de los putámenes presentan las mayores diferencias en el nivel de captación entre ambos grupos analizados.

4.2.3 Índices de cuantificación basados en la distribución espacial del radiotrazador

A partir de las curvas obtenidas y dado el comportamiento cualitativo observado, se propuso evaluar otros indicadores cuantitativos para determinar si son capaces de establecer diferencias estadísticamente significativas entre controles y pacientes. En todos los casos analizados se utiliza la captación media en el cerebelo como factor de normalización.

4.2.3.1 Índice basado en el máximo de captación de cada curva.

Se consideró cuantificar las diferencias en los grupos tomando el valor máximo de captación (Fig.4.4 y Tabla 4.2). El uso de los máximos de captación (normalizados o absolutos) en una determinada estructura o lesión es una de las maneras de cuantificación más utilizadas en Medicina Nuclear.

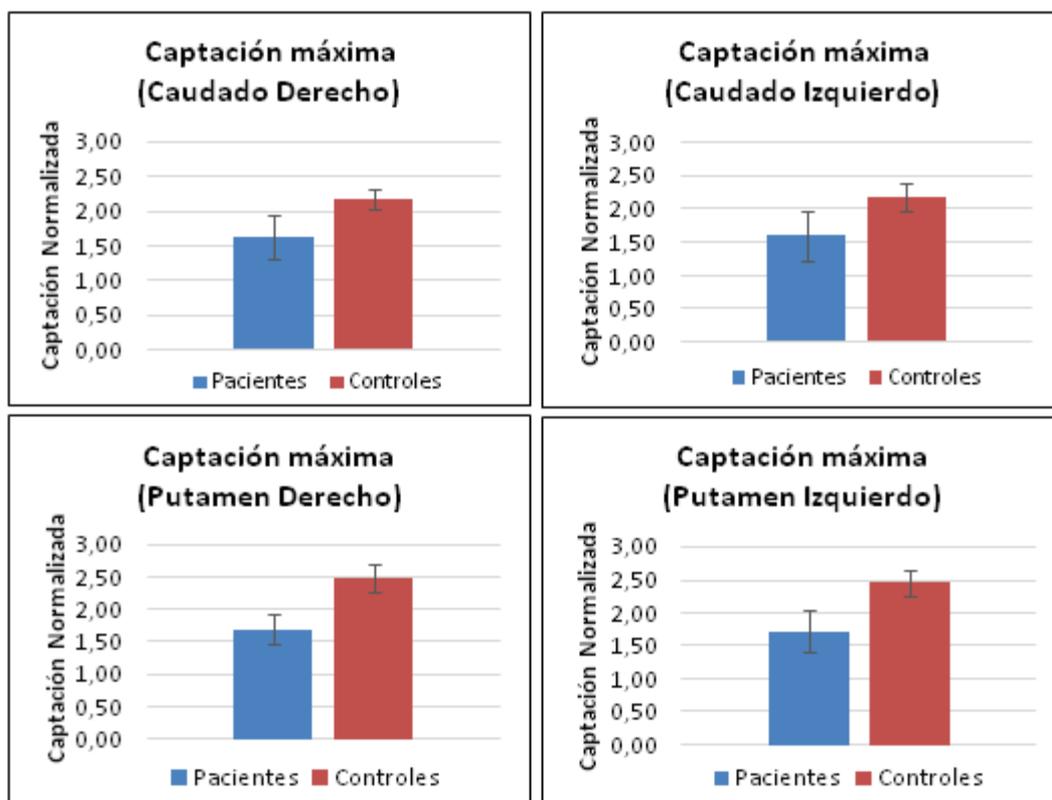


Figura 4.4. Captación máxima de FDOPA para caudados y putámenes.

Tabla 4.2.

Captación máxima normalizada	Caudado Izquierdo	Caudado Derecho	Putamen Izquierdo	Putamen Derecho
Pacientes	1,60 ±0,37	1,63 ±0,32	1,72 ±0,31	1,70 ±0,23
Controles	2,17 ±0,21	2,17±0,14	2,45±0,20	2,50 ±0,22
Significancia estadística	P<0.004	P<0.005	P<0.002	P<0.001

De los resultados pude determinarse que el indicador permite separar los grupos con SE para ambas estructuras, siendo la diferencia entre los putámenes la que presenta mayor significación.

4.2.3.2 Índice basado en la diferencia entre el máximo y el mínimo de captación de FDOPA.

Se calculó la diferencia entre valores máximos y mínimos considerando la curva en su totalidad para cada estructura. Este índice permite evaluar de manera sencilla la caída máxima del nivel de captación en cada caso (Fig.4.5 y Tabla 4.3).

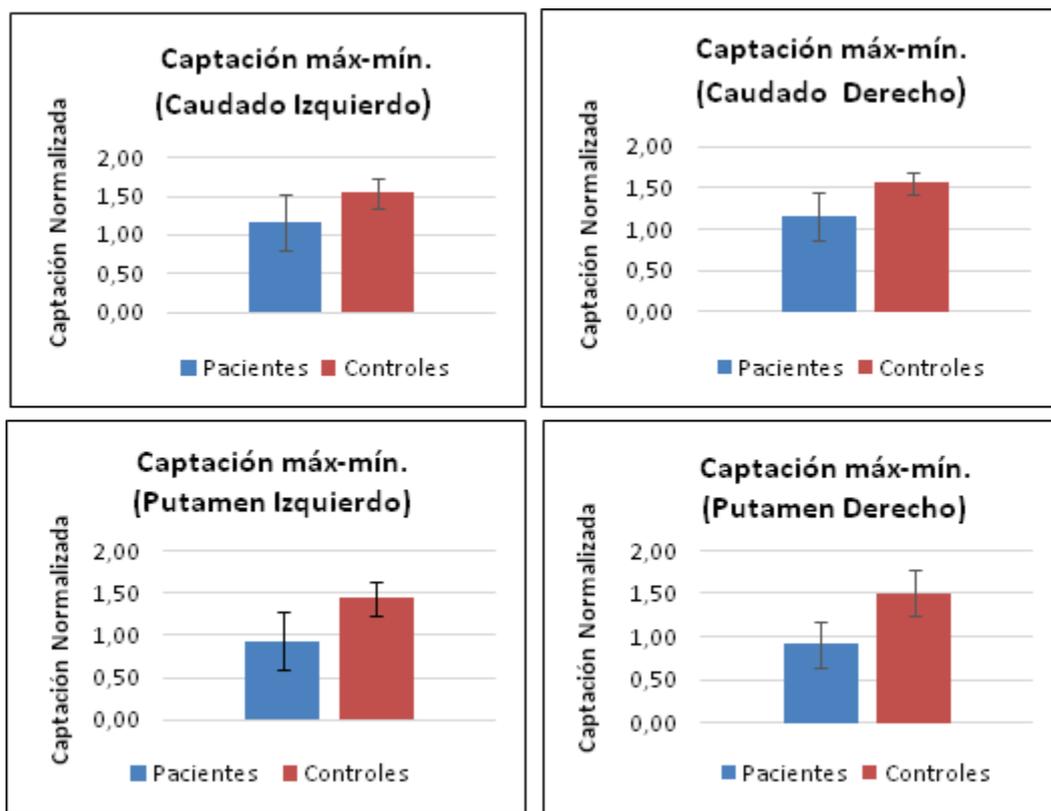


Figura 4.5. Diferencia entre máximos y mínimos de captación para putámenes y caudados.

Tabla 4.3:

Max-min de captación normalizada	Caudado Izquierdo	Caudado Derecho	Putamen Izquierdo	Putamen Derecho
Pacientes	1,16 ± 0,33	1,15 ± 0,30	0,94 ± 0,35	0,92 ± 0,26
Controles	1,53 ± 0,19	1,56 ± 0,12	1,44 ± 0,20	1,52 ± 0,25
Significancia estadística	P<0.005	P<0.005	P<0.004	P<0.002

El indicador separa ambas poblaciones con SE considerando ambas estructuras. La diferencia a favor de los putámenes es menor que en los índices mostrados en las secciones anteriores.

4.2.3.3 Índice basado en el promedio de captación del tercio central de las curvas de captación de FDOPA en putámenes.

Se propone estudiar este indicador dado que en los controles las curvas de captación de los putámenes poseen, en la mayoría de los casos, una región central con un nivel más constante y de mayor magnitud que las correspondientes a los casos patológicos como se muestra en la Fig.4.1 y 4.2. Los resultados se muestran en Fig.4.6 y Tabla 4.4.

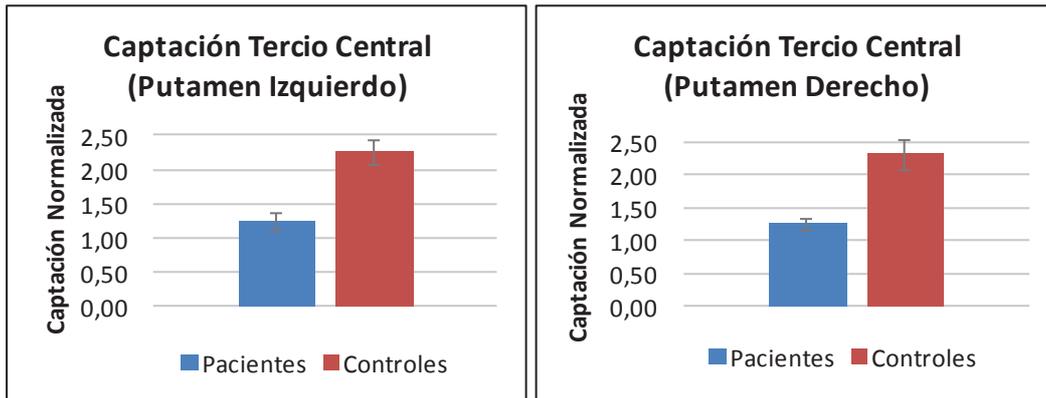


Figura4.6. Captación promedio en el tercio central para putámenes y caudados.

Tabla 4.4.

Captación tercio central normalizada	Putamen Izquierdo	Putamen Derecho
Pacientes	1,26 ± 0,13	1,26 ± 0,09
Controles	2,27 ± 0,18	2,32 ± 0,23
Significancia estadística	P<0.0006	P<0.0003

A partir de los resultados se observa que el indicador cuantitativo permite separar ambos grupos con alta SE.

4.2.3.4 Índice basado en la captación promedio de FDOPA en el tercio posterior de la curva de putámenes.

Dado que el deterioro de putámenes en la EP comienza en el sector posterior (caudal), se consideró la captación promedio del tercio final de la curva de putámenes (Fig 4.7 y Tabla 4.5).

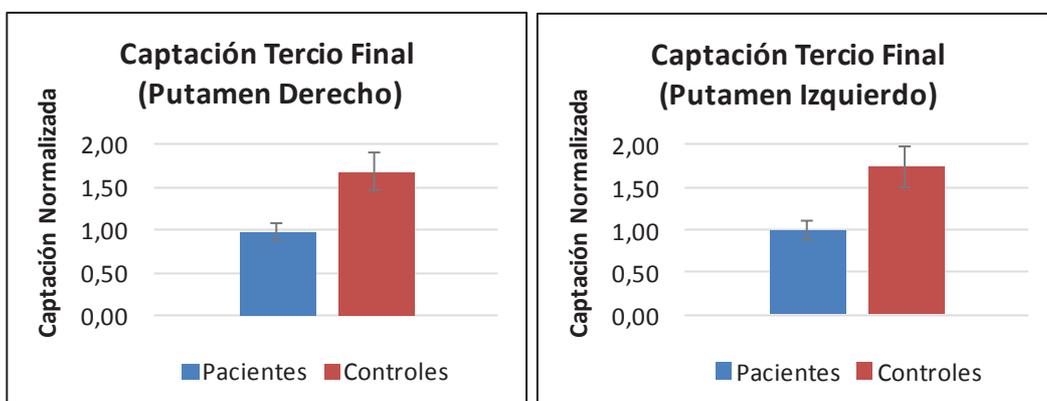


Figura 4.7. Captación promedio tercio final para putámenes y caudados.

Tabla 4.5:

Captación tercio final normalizada	Putamen Izquierdo	Putamen Derecho
Pacientes	1,00 ±0,11	0,97 ±0,10
Controles	1,74±0,24	1,68 ±0,22
Significancia estadística	P<0.0002	P<0.00005

Los resultados muestran que el indicador propuesto permite separar ambas poblaciones con alta SE.

Los índices basados en las curvas de distribución espacial del radiotrazador implican mayor costo temporal y computacional que el primer índice presentado en este capítulo. El tiempo de proceso total aproximado para cualquiera de estos índices (carga de imágenes, segmentación, obtención de las curvas y cálculo de los índices) es de aproximadamente 50 minutos por caso una vez que el usuario posee cierto nivel de entrenamiento.

Si se considera a la SE como un indicador de la fiabilidad del índice propuesto para separar ambos grupos estudiados, pueden ordenarse dichos índices según dicho parámetro (Tabla 4.6 y 4.7). Para ambas estructuras se toma el valor más desfavorable entre izq y der.

Tabla 4.6 (Putámenes)

Indicador	SE
Captación promedio en tercio posterior	p<0.0002
Captación promedio en tercio central	p<0.0003
Captación promedio total	p<0.0006
Captación máxima	p<0.001
Captación max-min	p<0.004

Tabla 4.7 (Caudados)

Indicador	SE
Captación promedio total	p<0.004
Captación máxima	p<0.005
Captación max-min	p<0.005

Todos los índices propuestos poseen una SE que supera el umbral fijado *a priori* (p<0.05). En el caso de los caudados los índices presentan similar SE. En el caso de los putámenes existe una marcada diferencia en los primeros tres indicadores respecto al resto.

4.3 Corrección de Efecto de Volumen Parcial (EVP)

Dado que el daño causado por la EP se manifiesta en primer término y de manera más notoria en los putámenes, se procedió a evaluar el impacto de la corrección del EVP en la cuantificación de FDOPA en dicha estructura.

Se utilizó el procedimiento detallado en el capítulo N°3. En la Fig.4.10 y Tabla 4.6 se observan los resultados obtenidos para los promedios de captación normalizados con y sin corrección por EVP.

A partir de la figura y tabla precedentes se pueden realizar las siguientes observaciones:

1. La cuantificación con corrección de EVP permite separar ambos grupos con significación estadística.
2. Los resultados con corrección de EVP presentan un mayor desvío estándar, hecho que afecta la significación estadística al evaluar la diferencia de grupos en comparación a los resultados sin considerar la corrección por EVP.
3. La corrección por EVP aumenta la captación promedio en los controles y disminuye la misma en los pacientes con EP.
4. La significación estadística del análisis de las diferencias entre grupos es significativamente superior en el caso de no utilizar la corrección por EVP.

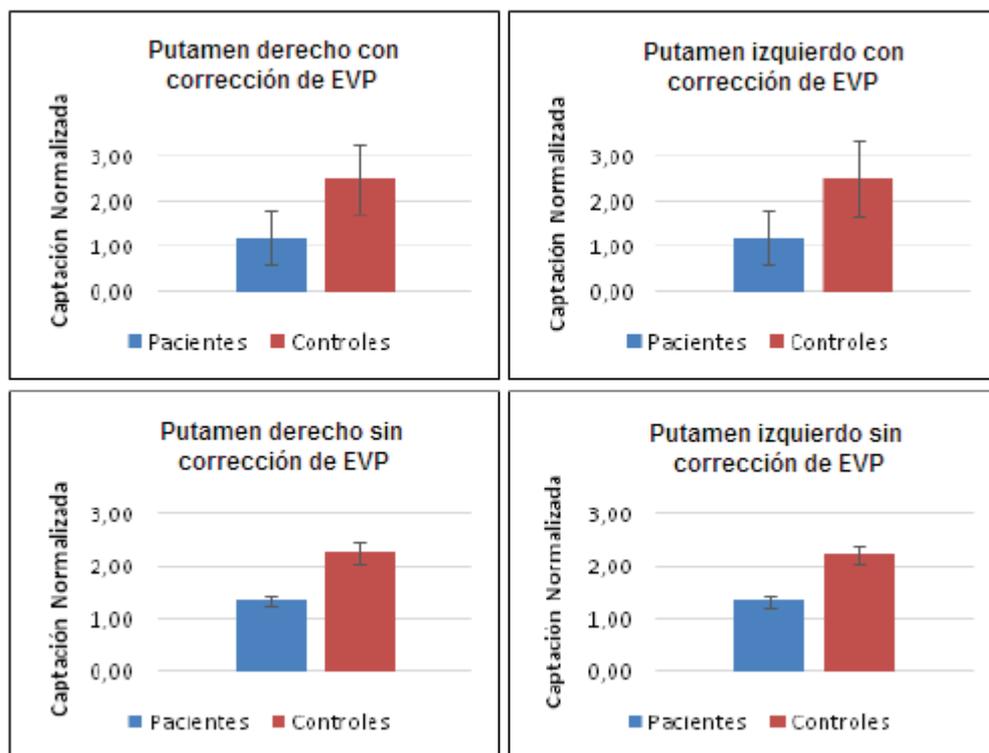


Figura 4.8. Promedios de captación normalizada en putámenes con y sin corrección de EVP.

Tabla 4.6:

Captación promedio normalizada	Putamen Izquierdo con CEVP	Putamen Derecho con CEVP	Putamen Izquierdo sin CEVP	Putamen Derecho sin CEVP
Pacientes	1,21 ±0,59	1,21 ±0,59	1,33 ±0,13	1,34 ±0,11
Controles	2,52 ±0,85	2,52±0,76	2,23±0,17	2,23 ±0,17
Significancia estadística	P<0.01	P<0.01	P<0.0006	P<0.0006

A modo de ejemplo se muestran curvas de distribución espacial de FDOPA para un caso control (Fig. 4.9 y 4.10).

El análisis comparativo de las curvas muestra una diferencia sustancial entre las mismas:

1. En la curva con corrección de EVP se observa un aumento del nivel de captación en la primera mitad (sector anterior) en relación a la curva sin corrección de EVP.
2. La curva con corrección de EVP muestra un descenso abrupto de la captación aproximadamente a la mitad de la misma.
3. En ambas gráficas (con y sin corrección por EVP) se mantienen las diferencias relativas de captación entre ambos putámenes.

Se observaron similares comportamientos en varias de las curvas luego de la corrección por EVP. Principalmente el descenso abrupto de la captación en la mitad de la misma.

En otras curvas se observó que en diferentes puntos no se pudo computar el valor corregido. Posiblemente por alguna división por cero al aplicar la ecuación N°1 de corrección (Capítulo N°3).

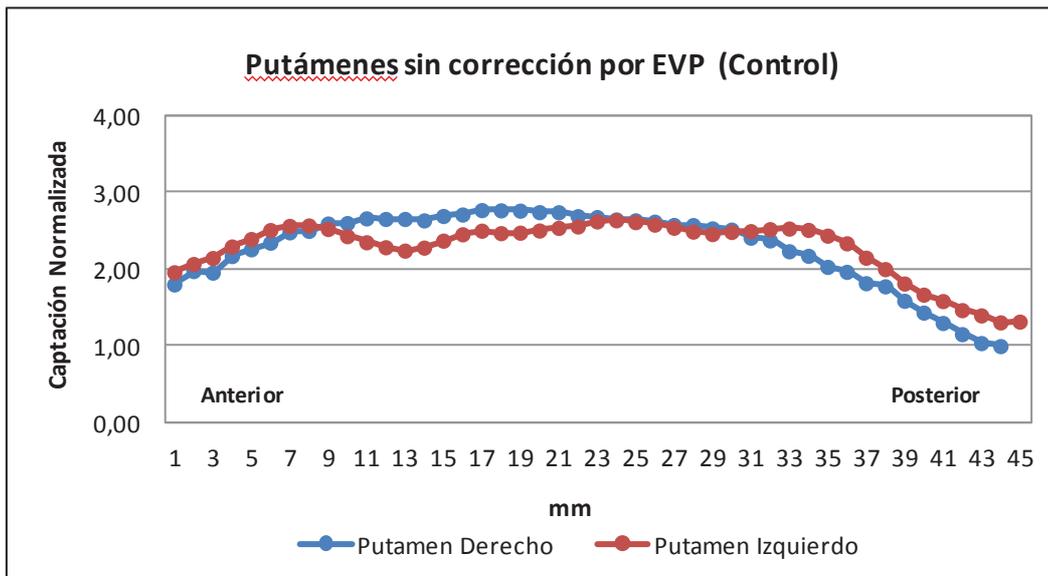


Figura 4.9 Curva de captación de FDOPA sin corrección por EVP

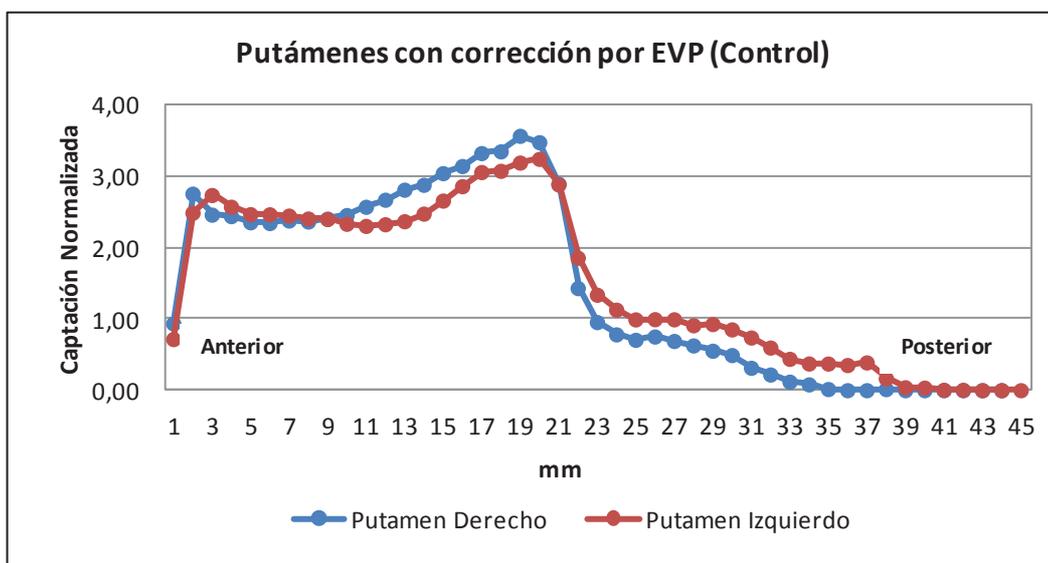


Figura 4.10 Curva de captación de FDOPA con corrección por EVP.

Estos comportamientos sumados al gran desvío estándar en las mediciones en relación a la cuantificación sin corrección por EVP generaron dudas sobre fiabilidad del método usado y se procedió a analizar las posibles causas.

En la figura siguiente (Fig. 4.11) se muestran cortes axiales PET/RM de un caso control luego de la corrección por EVP:

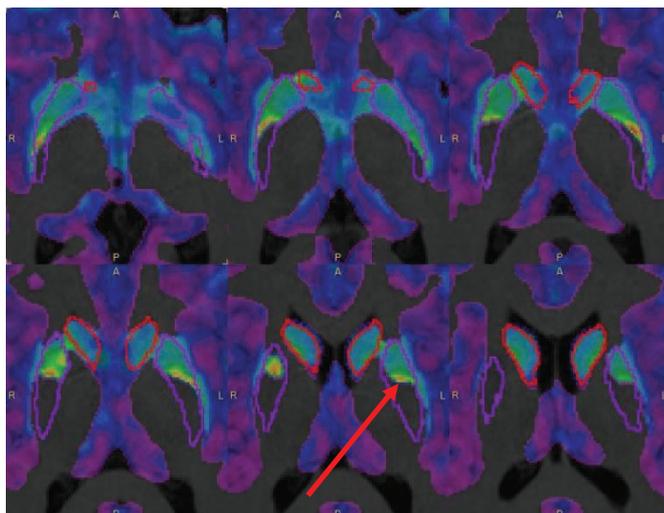


Fig.4.11. Imagen PET/RM corregida por EVP con la segmentación de caudados y putámenes.

Al observar la distribución de actividad dentro de los putámenes se observa una marcada disminución de la misma en la mitad posterior de la estructura (flecha). Este resultado explica el comportamiento de la curva mostrada en la Fig.4.11.

La falta de actividad en el sector medio y posterior de los putámenes luego de la corrección por EVP estaría indicando una sobrecorrección por efecto *spill-in*.

Analizando la bibliografía disponible, el trabajo de Y. Rong (2015) [26] demuestra que los algoritmos de segmentación de RM como el utilizado por el *Statistical Parametric Mapping* (SPM8) -que es el que utiliza el software PNEURO utilizado en este trabajo- segmentan los putámenes asignándole en su sector posterior (caudal) mayor proporción de sustancia blanca de la que realmente corresponde. Si la segmentación asigna mayor proporción de sustancia blanca en los putámenes, el algoritmo de corrección de EVP realizará una sobrecorrección de la actividad en esas zonas por efecto *spill-in*, explicando los resultados observados en el presente trabajo.

Por estos motivos, el análisis de la corrección por EVP no se continuó, mereciendo un análisis más profundo del tema en un futuro trabajo.

En el capítulo siguiente se analizan las conclusiones del presente trabajo.

5. Conclusiones

El presente trabajo de tesis evaluó diferentes indicadores cuantitativos así como la distribución espacial del radiotrazador FDOPA en putámenes y caudados en individuos con EP y controles utilizando técnicas avanzadas de segmentación de imágenes multimodales (PET/RM).

El método de trabajo propuesto permite minimizar diversas fuentes de error operador-dependiente al evitar la necesidad de definir las regiones a cuantificar utilizando ROIs de manera manual. La posibilidad de poder segmentar las estructuras de manera completa utilizando el volumen de RM y un atlas de manera automática es la principal característica de la modalidad aquí estudiada.

A pesar de que la cantidad de sujetos en cada grupo no es elevada, todos los indicadores cuantitativos propuestos reflejan una variación estadísticamente significativa entre ambos considerando el nivel de significación (SE) fijado *a priori* ($p < 0.05$).

Si bien la cuantificación en ambas estructuras analizadas permite separar los grupos considerados, los índices que consideran a los putámenes presentan mayor diferencia (en sus valores medios) y mayor SE. Estos resultados coinciden con la evidencia que indica que los putámenes son las estructuras del estriado más afectadas en la EP.

El análisis de las curvas de distribución espacial de la FDOPA permite observar diferencias cualitativas y cuantitativas entre controles y pacientes con EP. A través de las mismas es posible diferenciar específicamente los sectores más afectados en cada estructura de manera precisa y poder cuantificar la captación de manera sectorizada.

Los índices basados en obtener el promedio de captación en los sectores medios y posteriores de las curvas en el caso de los putámenes fueron los que presentaron mayor SE de todos los evaluados. Sin embargo, el primer índice analizado que considera los promedios totales de cada estructura sin necesidad de obtener las curvas de distribución espacial, posee también una alta SE. En términos costo/beneficio (ver capítulo N°3) este índice es el más apropiado para diferenciar ambos grupos.

En este trabajo y para los grupos considerados se demuestra que no es necesario analizar sectores específicos de caudados y putámenes para distinguir EP de controles.

Debe tenerse en cuenta que los datos utilizados corresponden a pacientes con EP con por lo menos 5 años de evolución al momento de realizarse los estudios PET/RM.

En el caso de utilizar estas estrategias de cuantificación en etapas tempranas de la EP sería conveniente evaluar el estado de las estructuras en sectores específicos como el sector posterior (caudal). Si bien la cuantificación de dicho sector arrojó la SE más elevada de todos los índices analizados, se trata de una región que por su tamaño no pueden descartarse efectos de volumen parcial. Es por eso que en este trabajo se planteó analizar dicho problema utilizando el algoritmo de *Muller-Gatner* implementado en el software PNEURO. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios por una segmentación inapropiada de los putámenes tal como se comenta en el capítulo N°4 y no se continuó su desarrollo. Los problemas a resolver serán analizados en un trabajo futuro.

El método propuesto de análisis y cuantificación puede aplicarse en la práctica clínica diaria otorgándole al profesional médico mayor información para realizar un diagnóstico, seguimiento y analizar el impacto de terapias farmacológicas.

El uso de imágenes multimodales y técnicas de segmentación automáticas de estructuras para la cuantificación de imágenes como las aquí estudiadas ha demostrado mejorar la especificidad y sensibilidad a la hora de identificar casos patológicos de EP en relación a los métodos de manuales [15].

La disponibilidad de una base de controles y de pacientes con EP es esencial para poder brindarle al especialista información cuantitativa confiable. Incrementar el número de sujetos para las mismas es una de las tareas a realizar a partir del presente trabajo.

Se plantea además como trabajo futuro correlacionar los índices cuantitativos aquí estudiados con los datos y pruebas clínicas de cada paciente con EP y determinar la utilidad de dichos indicadores como factores de progresión de la enfermedad.

Bibliografía

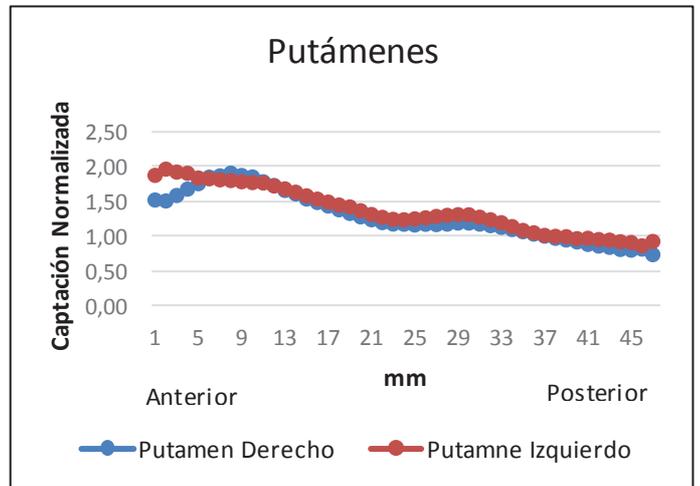
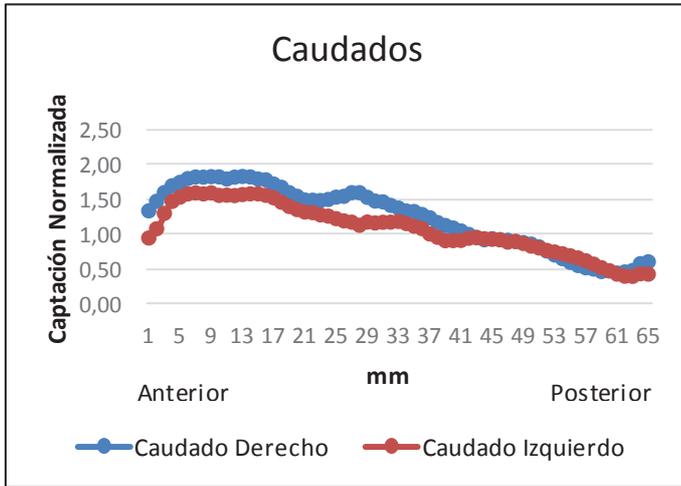
- [1]. S. Silbernagl, F. Lang, *Fisiopatología. Texto y Atlas*, Ed. Panamericana, 3era. ed., 2009.
- [2]. National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health. *Publicación de NIH 07-139s*,
http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/parkinson_disease_spanish.htm#toc (octubre 2016)
- [3]. Asociación Civil Enfermedad de Parkinson, www.aceparparkinson.wix.com (diciembre 2016).
- [4]. S. Lim, J. Fiez, L. Holt, *How may the basal ganglia contribute to auditory categorization and speech perception?* *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8, 230, doi:10.3389/fnins.2014.00230, 2014.
- [5]. G. Leisman, O. Braun-Benjamin, R. Melillo, *Cognitive-motor interactions of the basal ganglia in development*. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8:16, doi:10.3389/fnsys.2014.00016, 2016.
- [6]. A. Avila-Luna, A. Bueno-Nava, *Los ganglios basales: la participación dopaminérgica estriatal*, *Investigación en Discapacidad*, 3(1), pp.19-24, 2014.
- [7]. R. Martínez-Fernández, C. Gasca-Salas, A. Sánchez-Ferro, *Actualización en la Enfermedad de Parkinson*, *Rev. Med. Clin. Condes*, 27(3), pp. 363-379, 2016.
- [8]. J. Jankovic, *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis*, *J Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 79, pp.368-376, 2008.
- [9]. J. Tapia-Núñez, P. Chaná-Cuevas, *Diagnostico de la enfermedad de Parkinson*, *Rev. Neurol.*, 38(1), pp. 61-67, 2004.
- [10]. D. García Solís, *Imagen de neurotransmisión dopaminérgica en los síndromes parkinsonianos*, *Rev Esp Med Nucl*, 24(4), pp. 255-277, 2005.
- [11]. J. Arbizu, M.R. Luquin, J. Abella, R. de la Fuente-Fernández, R. Fernández-Torrón, D. García-Solís, P. Garrastachu, J.M. Jiménez-Hoyuela, M. Llana, F. Lomeña, C. Lorenzo-Bosquet, M.J. Martí, J.C. Martínez-Castrillo, P. Mir, M. Mitjavila, J. Ruiz-Martínez y L. Vela, *Neuroimagen funcional en el diagnóstico de pacientes con síndrome parkinsoniano: actualización y recomendaciones para el uso clínico*, *Rev Esp Med Nucl Imag Mol*, 33(4), pp. 215-226, 2014.
- [12]. J.M. Martí-Climent, I. Peñuelas, R. Calvo, M. Giménez, C. Gámez, J.A. Richter, *Utilización de un ciclotrón para la producción de radionucleidos emisores de positrones*, *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*, 18, pp 261-267, 1999.

- [13]. L. Malgor, M. Valsecia, FARMACOLOGÍA DE LAS DROGAS ANTIPARKINSONIANAS, http://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/5_parkins.pdf (marzo 2017).
- [14]. C. Nami, S. Fanti, ^{18}F -DOPA PET and PET/CT, *The Journal of Nuclear Medicine*, 10 (48), pp. 1577-1579, 2007.
- [15]. A. Struck, L. Hall, J. Kusmirek, C. Gallagher, J. Floberg, C. Jaskowiak, S. Perlman, *^{18}F -DOPA PET with and without MRI fusion, a receiver operator characteristics comparison*, *Am J Nucl Med Mol Imaging*, 2(4), pp.475-482, 2012.
- [16]. K. Kato, T. Odagawa, S. Abe, M. Ikeda, K. Shimamoto, S. Naganawa, *Uptake of F-18 FDOPA in the Corpus Striatum of Normal Brain in F-18 FDOPA PET*, *Radiological Society of North America, Scientific Assembly and Annual Meeting*, 25-30 November 2012, Chicago IL. <http://archive.rsna.org/2012/12043506.html>.
- [17]. PMOD, Biomedical Image Quantification, www.pmod.com (marzo 2017)
- [18]. J. Juntu, J. Sijbers, D. Van Dyck, and J. Gielen, *Bias Field Correction for MRI Images*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 543–551., 2005.
- [19]. Statistical Parametric Mapping (SPM), <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/> (marzo 2017)
- [20]. A. Hammers, R. Allom, MJ. Koepp, SL. Free, R. Myers, L. Lemieux, TN Mitchell, DJ. Brooks, JS. Dunca., *Three-dimensional maximum probability atlas of the human brain, with particular reference to the temporal lobe*. *Hum Brain Mapp*,19(4), pp. 224-247, 2003.
- [21]. C. Juri, V. Wanner, *Neuroimágenes en Enfermedad de Parkinson: Rol de la Resonancia Magnética, el SPECT y el PET*, *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27, pp. 380-391, 2016.
- [22]. J. Puñal-Riobóoa, A. Serena-Puigb, L. Varela-Lemaa, AM. Álvarez-Páezb, A. Ruano-Ravinac, *Utilidad clínica de la ^{18}F FDOPA-PET en trastornos del movimiento. Una revisión sistemática*, *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*, 28, pp.106-113, 2009.
- [23]. M. Soret, S. Bacharach, I. Buvat, *Partial-volume effect in PET tumor imaging*, *J Nucl Med*,48(6), pp. 932-45, 2007.
- [24]. Partial- Volume Correction (PVC), <http://www.pmod.com/files/download/v33/doc/pbas/5017.htm> (octubre 2016)
- [25]. PVC (Brain MR based), <http://www.pmod.com/files/download/v33/doc/pbas/5021.htm> (octubre 2016).

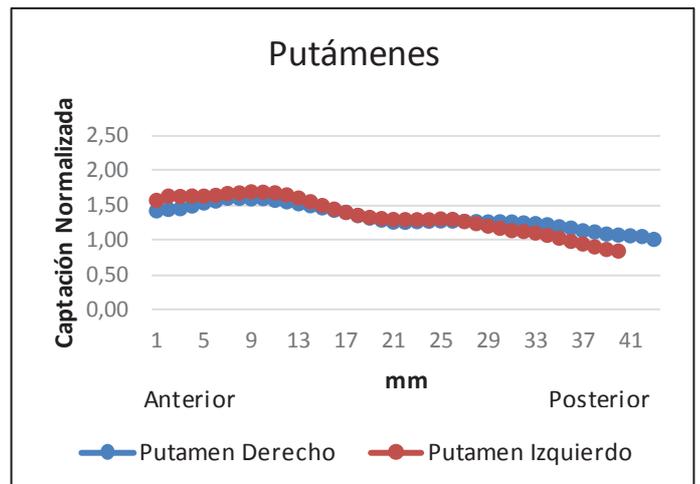
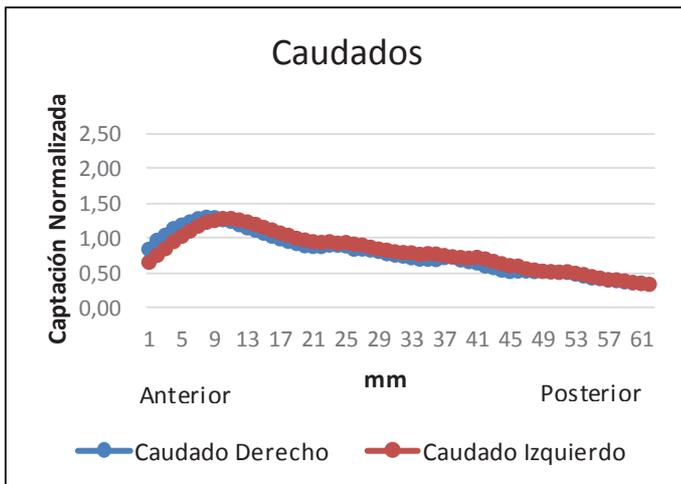
- [26]. Y. Rong, I. Vernaleken, O. Winz, A. Goedicke, F. Mottaghy, E. Kops, *Simulation-based partial volume correction for dopaminergic PET imaging: Impact of segmentation accuracy*, *Z Med Phys*, 25(3), pp. 230-242, 2015.

Apéndice N°1

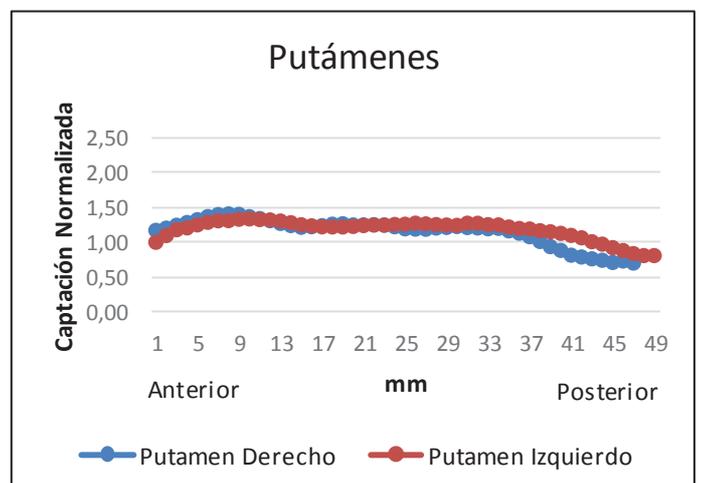
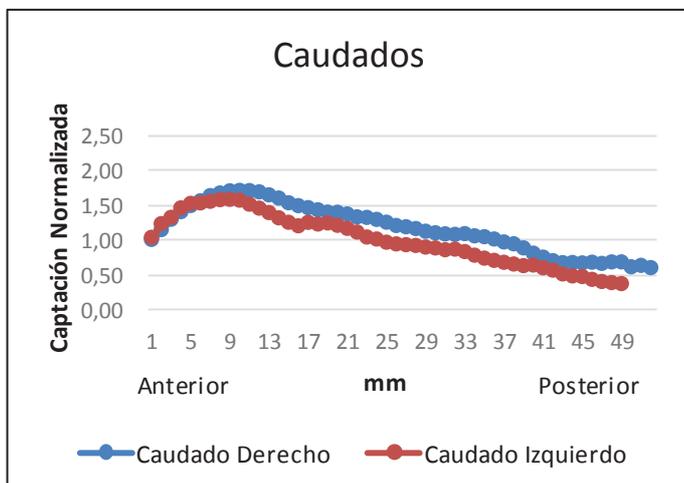
Paciente N°1



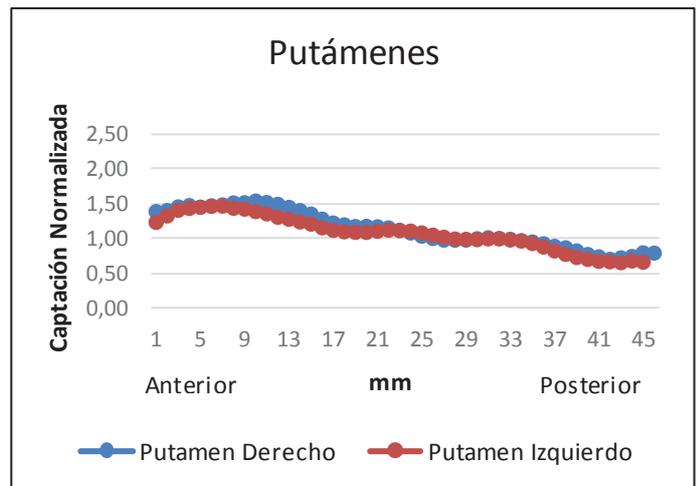
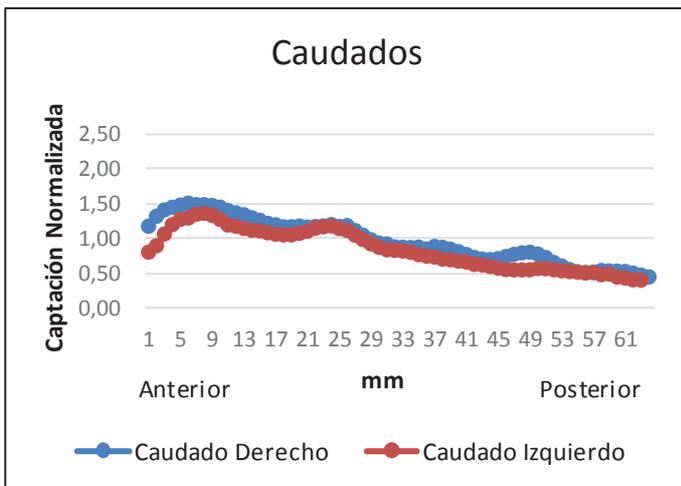
Paciente N°2



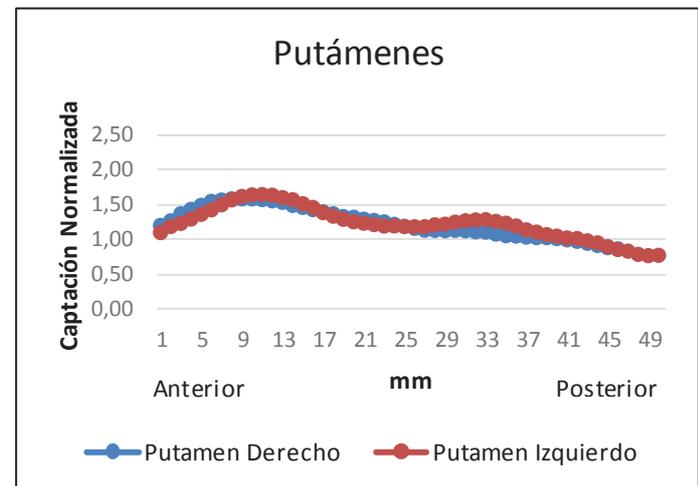
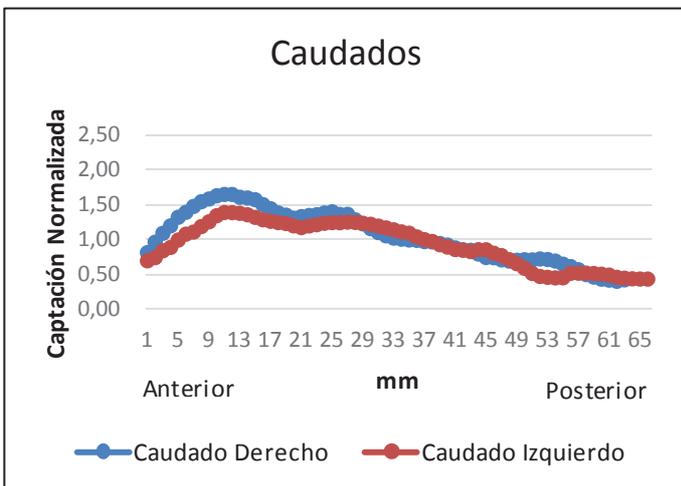
Paciente N°3



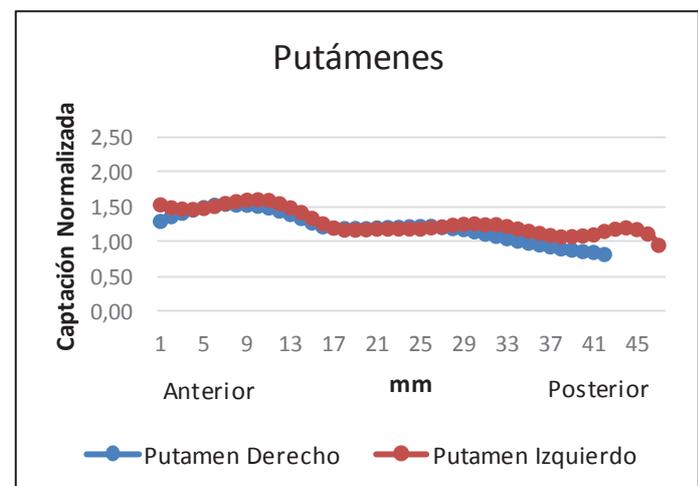
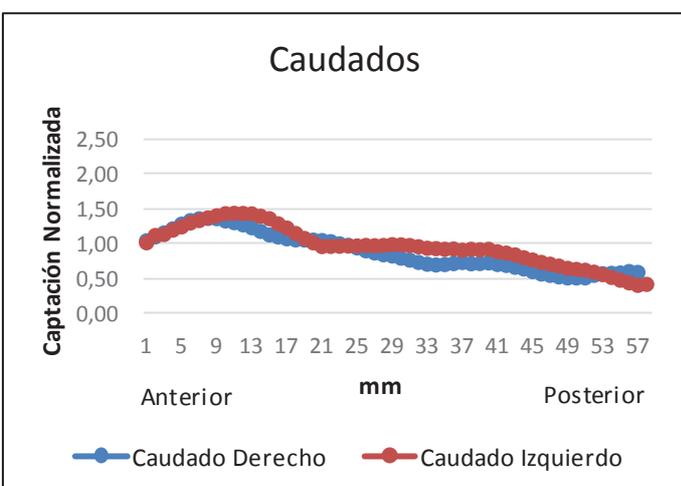
Paciente N°4



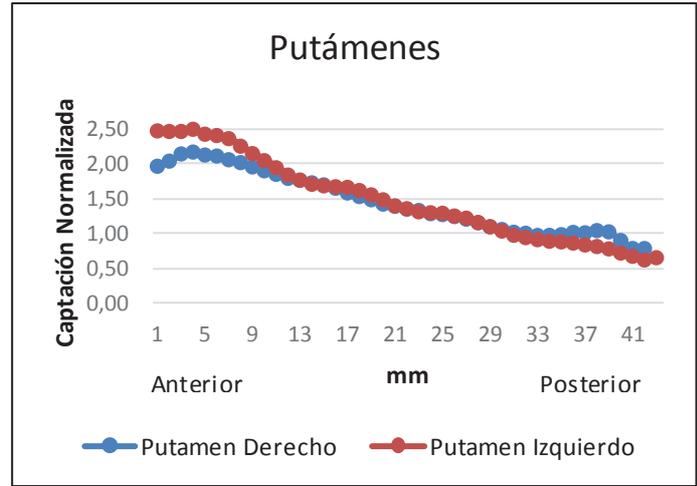
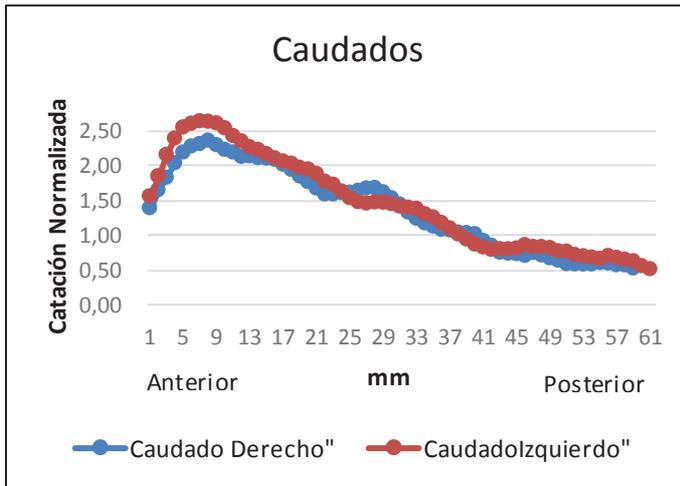
Paciente N°5



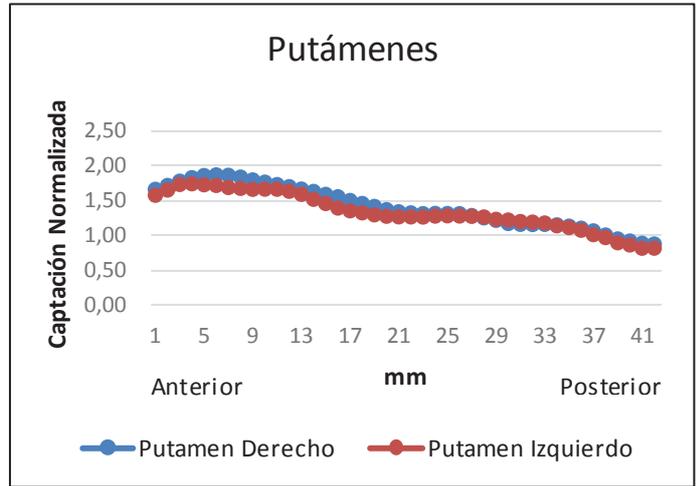
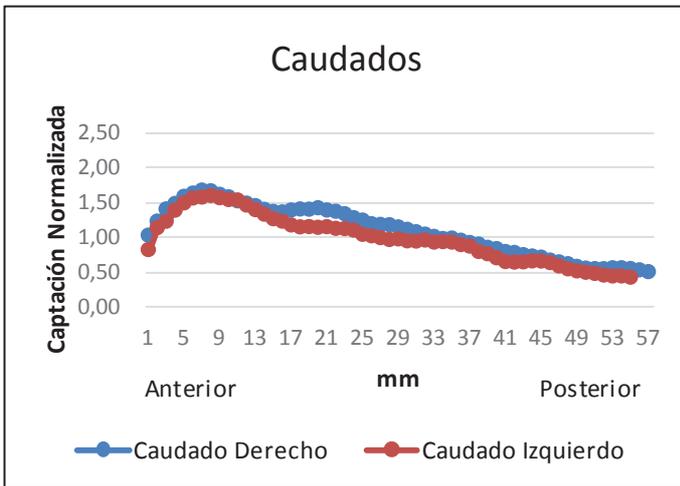
Paciente N°6



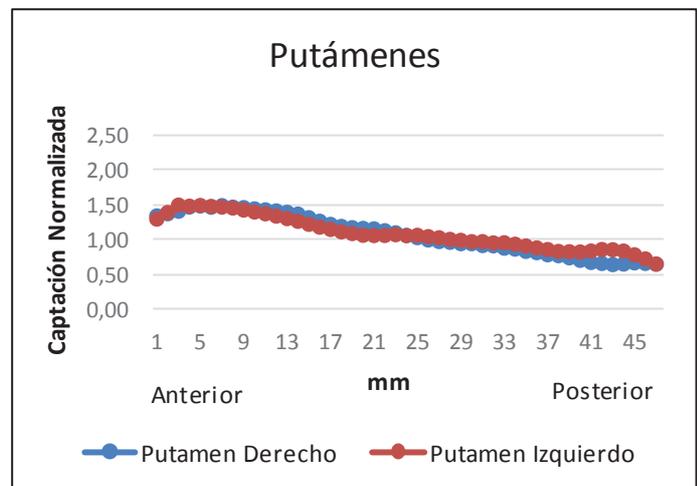
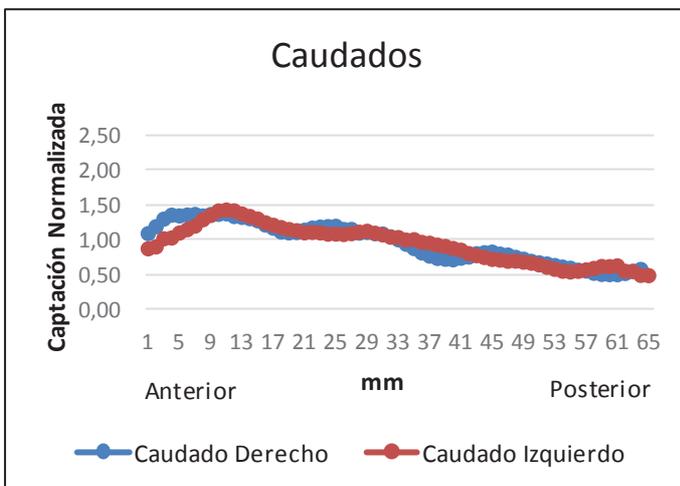
Paciente N°7



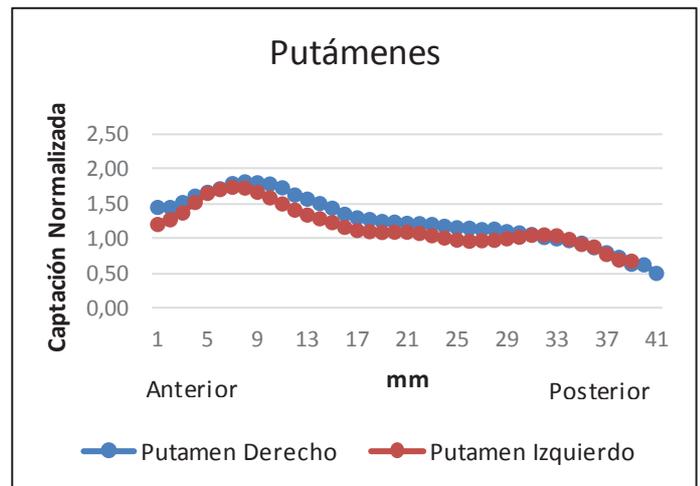
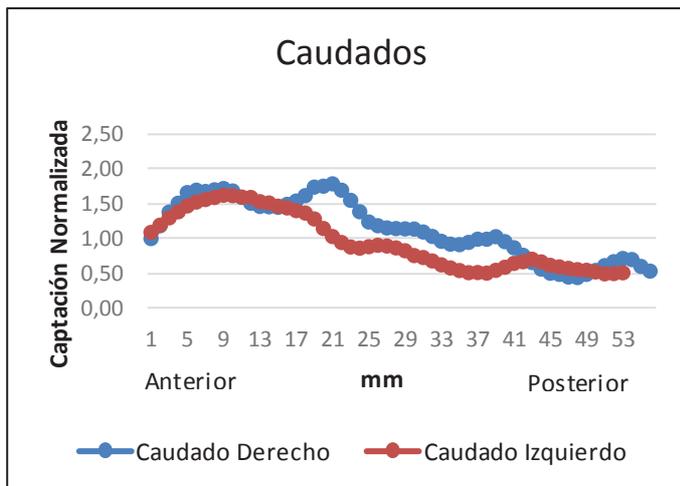
Paciente N°8



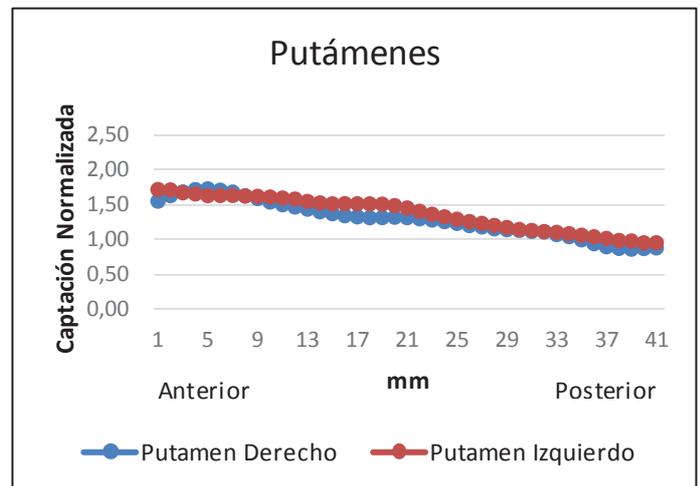
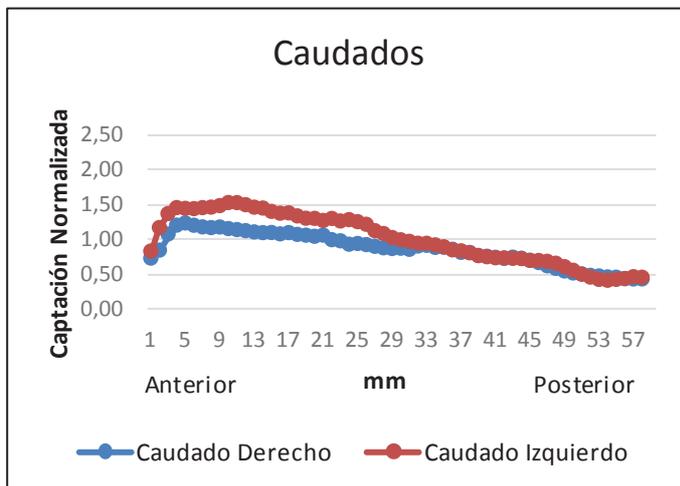
Paciente N°9



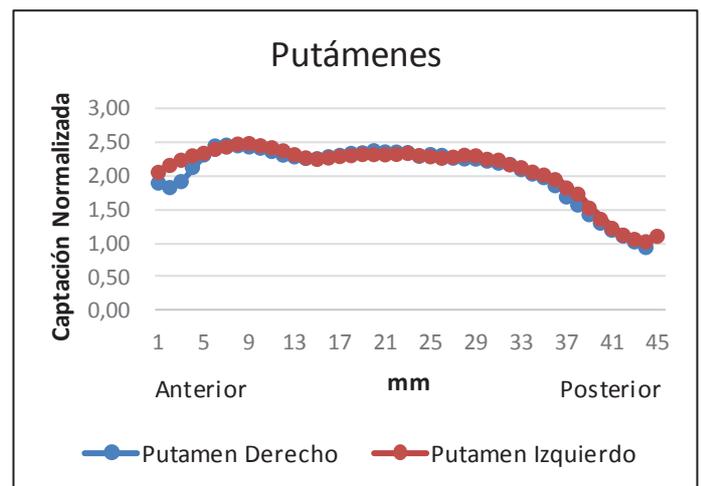
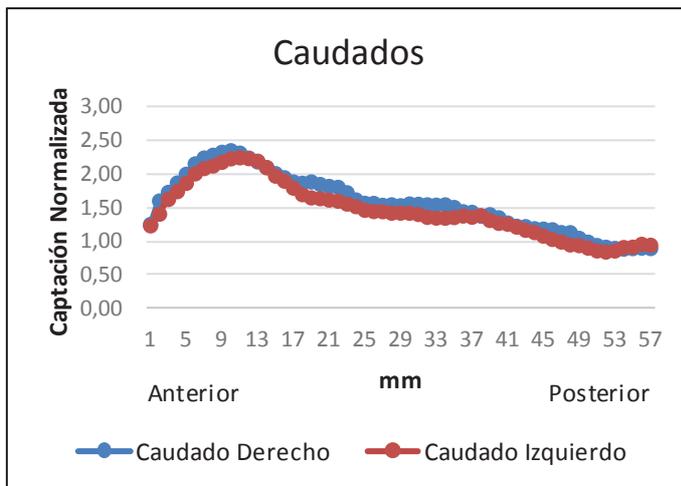
Paciente N°10



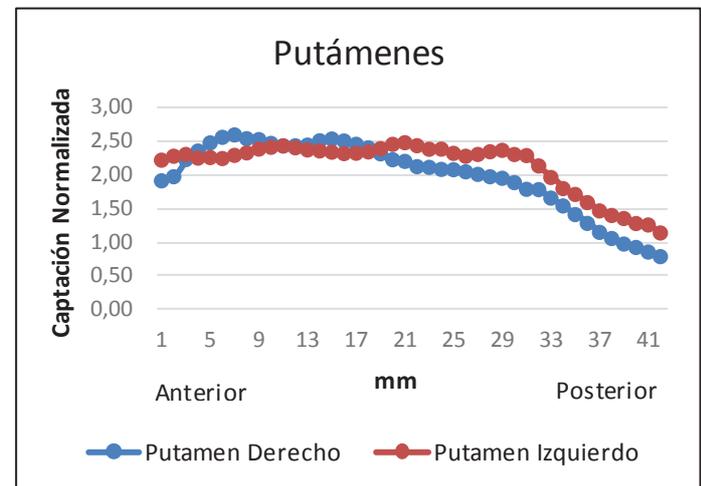
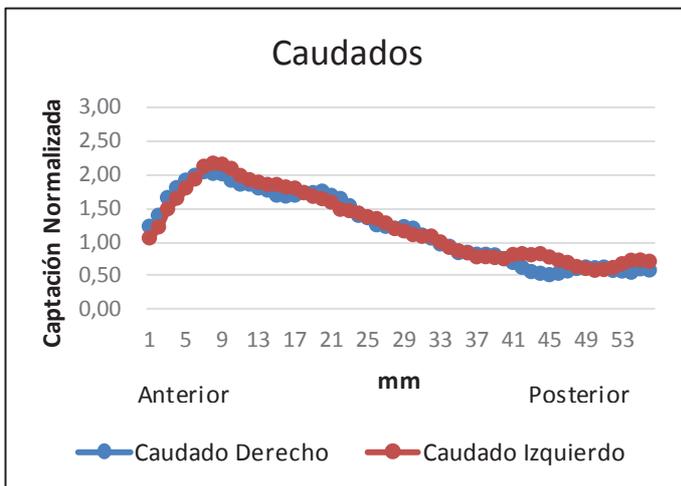
Paciente N°11



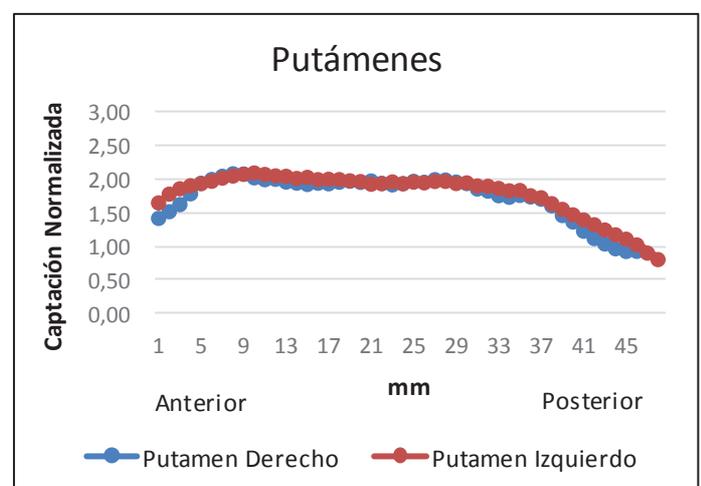
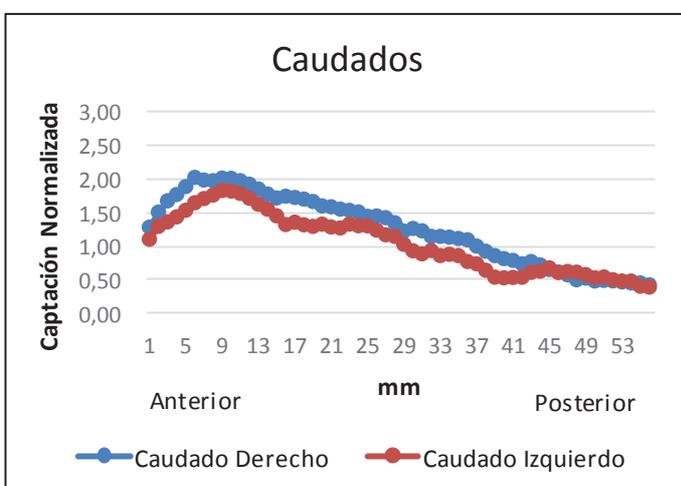
Control N°1



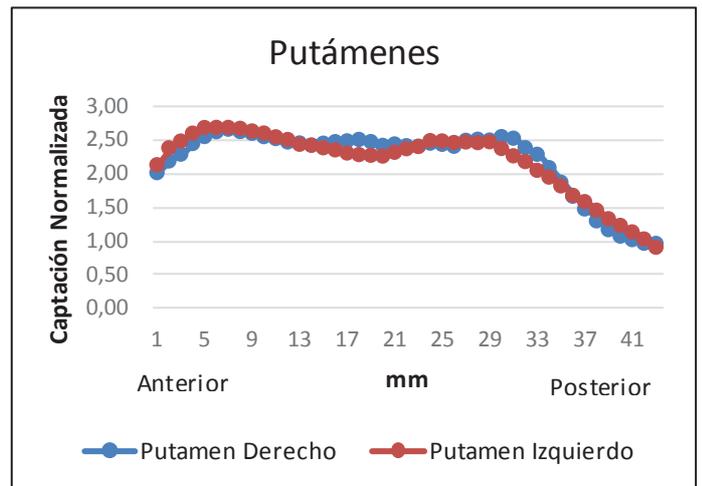
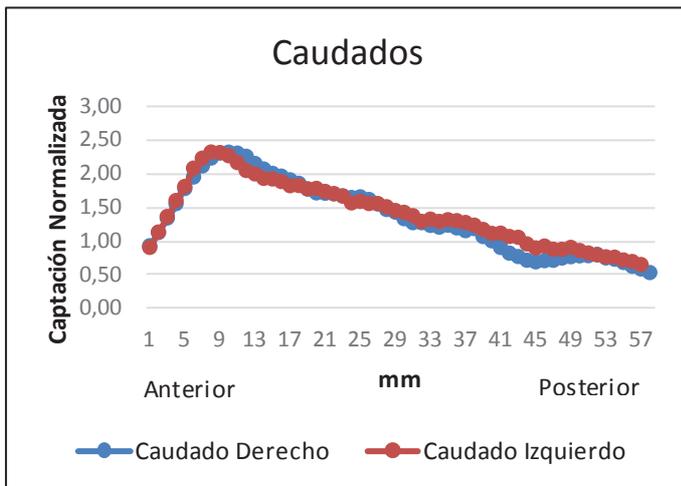
Control N°2



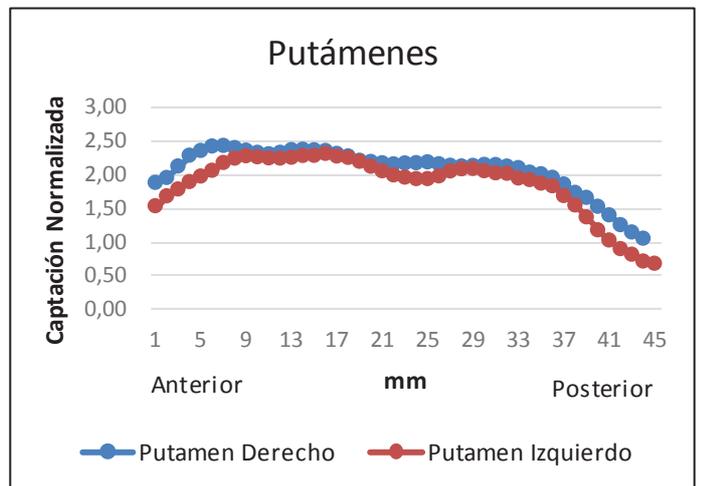
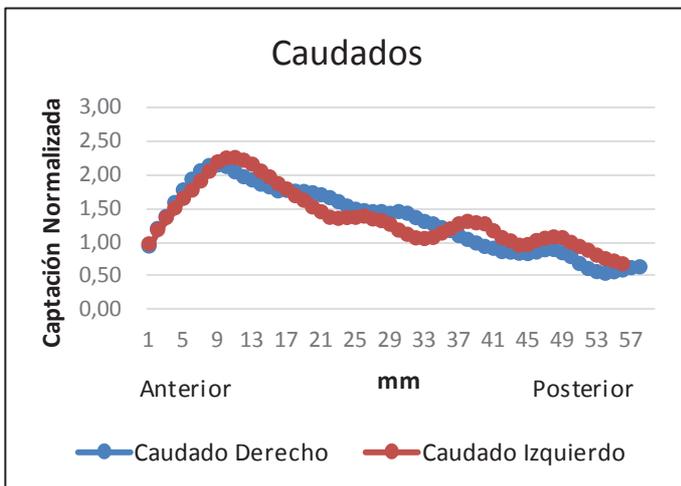
Control N°3



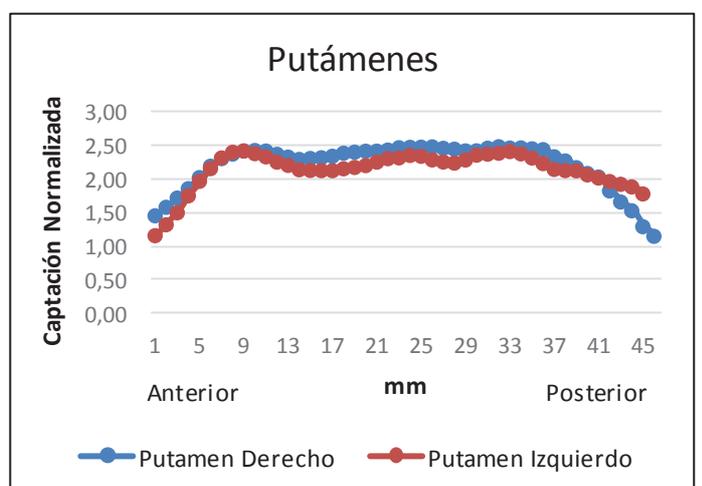
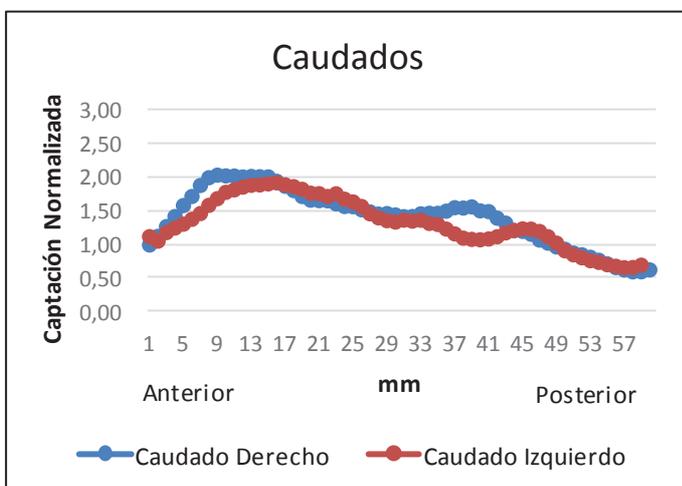
Control N°4



Control N°5



Control N°6



Control N°7

